



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LETÍCIA NAVARRO GORDAN FERREIRA MARTINS

**ESTUDO DE CITOCINAS NO PRODUTO DE
LEUCOAFÉRESE DE PACIENTES COM MIELOMA
MÚLTIPLO ELEGÍVEIS PARA TRANSPLANTE:
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS E
DESFECHO CLÍNICO**

Londrina
2018

LETÍCIA NAVARRO GORDAN FERREIRA MARTINS

**ESTUDO DE CITOCINAS NO PRODUTO DE
LEUCOAFÉRESE DE PACIENTES COM MIELOMA
MÚLTIPLO ELEGÍVEIS PARA TRANSPLANTE:
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS E
DESFECHO CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini
Barbosa

Co-orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Martins, Letícia Navarro Gordan Ferreira.

ESTUDO DE CITOCINAS NO PRODUTO DE LEUCOAFÉRESE DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO ELEGÍVEIS PARA TRANSPLANTE: CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS E DESFECHO CLÍNICO / Letícia Navarro Gordan Ferreira Martins. - Londrina, 2018.
74 f. : il.

Orientador: Décio Sabbatini Barbosa .

Coorientador: Carolina Panis.

(dissertação) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Mieloma Múltiplo - . 2. Citocinas - . 3. Fator de Risco - . 4. Prognóstico - . I. Sabbatini Barbosa , Décio. II. Panis, Carolina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

LETÍCIA NAVARRO GORDAN FERREIRA MARTINS

**ESTUDO DE CITOCINAS NO PRODUTO DE LEUCOAFÉRESE DE
PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO ELEGÍVEIS PARA
TRANSPLANTE:
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS E DESFECHO
CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Co-Orientadora: Profa. Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -
UNIOESTE

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Vanessa Jacob Victorino
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

Londrina, 11 de janeiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pacientes portadores de mieloma múltiplo, que mesmo diante de um momento de fragilidade autorizaram o uso de material biológico desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Décio Sabbatini Barbosa, não só pela orientação e análise estatística, mas sobretudo pela sua paciência, apoio e objetividade em cada etapa deste trabalho.

À Prof. Dra. Carolina Panis, pelo entusiasmo à pesquisa, aos ensinamentos e otimismo, mas principalmente convivência, carinho e apoio em todos os momentos.

Às Prof. Dras. Maria Angelica Ehara Watanabe e Vanessa Jacob Victorino por terem aceito compor a banca examinadora enriquecendo esse trabalho com suas valiosas considerações.

Às Prof. Dras. Marla Karine Amarante e Tânia Mazzuco Longo pela disponibilidade em compor a banca examinadora suplente dessa dissertação.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde pelos ensinamentos e incentivo.

Aos meus colegas pós-graduandos pela amizade, companheirismo e união.

Gostaria de agradecer também a algumas pessoas que contribuíram diretamente na realização deste trabalho, à Dani Luce Doro da Silva, bioquímica do Laboratório de Criopreservação do Hospital Universitário de Londrina que gentilmente ajudou na separação das amostras criopreservadas, à Geise Ellen Broto, pós-graduanda do Laboratório de Pós-Graduação pelo auxílio com análise laboratorial das alíquotas e à Andrea Akemi Morita pela responsabilidade e competência na ajuda com a análise estatística e formatação desta dissertação.

Aos pacientes e seus familiares pela coragem, enfrentamento da doença e confiança acreditados à equipe de Transplante de Medula Óssea e do Hospital Universitário de Londrina.

À equipe de Transplante de Medula Óssea (TMO) e Laboratório de Criopreservação do Hospital Universitário de Londrina pelo trabalho integral e de excelência prestado aos nossos pacientes e familiares.

À equipe médica da Unidade de TMO do HU de Londrina, Cristina Célia Faune, Fausto Celso Trigo e Joana Marcela Ciocari, pelo apoio, amizade e disponibilidade nos meus períodos de ausência durante este projeto.

À nutricionista e fisioterapeuta da Unidade de TMO do HU de

Londrina, Anne Cristine Rumiato e Cristiane Golias Gonçalves pelas valiosas contribuições, compartilhamento de experiências e solidariedade.

Gostaria de agradecer a toda minha família pelo amor e união, especialmente a meus queridos pais Pedro Alejandro Gordan e Orides Navarro Gordan por serem tão presentes e responsáveis pela minha formação pessoal e profissional.

Finalmente, agradeço a meu esposo César Eduardo Castro Ferreira Martins, a meus filhos Henrique e Manuela pela paciência, compreensão nos momentos de ausência, incentivo e amor incondicional.

MARTINS, Letícia Navarro Gordan Ferreira. **Estudo de citocinas no produto de leucoaférese de pacientes com mieloma múltiplo elegíveis para transplante: correlação com fatores prognósticos e desfecho clínico.** 2018. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Uma complexa rede de citocinas no microambiente medular tem sido implicada como importante fator na patogênese do mieloma múltiplo (MM). Várias citocinas em sangue periférico e/ou medula óssea em pacientes com MM têm sido estudadas, porém não há dados na literatura correlacionando citocinas em produto de leucoaférese (células-tronco hematopoiéticas periféricas) como biomarcador prognóstico associado à profundidade de resposta pós-transplante, recaída e mortalidade. Os objetivos desse trabalho foram avaliar os níveis de fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de crescimento transformador-beta1 (TGF- β 1) e interferon-gama (IFN- γ) por ELISA no produto de leucoaférese de pacientes com MM elegíveis para transplante autólogo e avaliar a existência de associação dessas citocinas com número de células CD34⁺/kg mobilizadas e fatores de estratificação de risco, além do impacto na avaliação de resposta ao tratamento (pós-transplante) e sobrevida. Realizado um estudo transversal retrospectivo, na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário de Londrina, no período de setembro/2010 a setembro/2014, com análise dos prontuários e quantificação de citocinas de 27 pacientes. O IFN- γ teve a maior variabilidade nos níveis com 713 pg/mL [443,5-1213,5], enquanto os níveis de TGF- β 1 e TNF- α foram respectivamente, 1238,55 pg/mL \pm 288,84 e 410,5 pg/mL [353-508]. Níveis de TNF- α foram significativamente maiores ($p=0,05$), em pacientes \geq 50 anos (559,6 \pm 73,42 pg/mL) do que em $<$ 50 anos (385,9 \pm 20,16 pg/mL), assim como em pacientes com β 2-microglobulina muito elevada ($>5,5$ ng/mL) versus pacientes com β 2-microglobulina normal ($p=0,05$). Não houve associação de recaída ou óbito com os níveis das citocinas. Houve uma correlação inversa muito significativa entre a mobilização de células-tronco e TGF- β 1 ($r=-0,488$, $p=0,009$). Aos três meses pós-transplante, os níveis de IFN- γ foram significativamente menores nos pacientes em resposta completa (CR) ao tratamento, quando comparados aos pacientes em resposta muito boa (VGPR), 590,9 \pm 88,49 pg/ml versus 990 \pm 107,5 pg/mL, $p=0,01$, respectivamente. Pacientes que perderam (CR para VGPR) ou mantiveram a profundidade de resposta aos três meses pós-transplante (CR ou VGPR), apresentavam nível mediano de IFN- γ 1133 pg/mL e 635 pg/mL, respectivamente, sendo considerados “alto-expressores” de IFN- γ e aqueles com melhora da avaliação de resposta (VGPR para CR) apresentaram nível mediano de IFN- γ 388 pg/mL, portanto “baixo-expressores”. Portanto, uma relevante correlação entre os níveis de IFN- γ com a perda de profundidade de resposta pós-transplante, sugere que o IFN- γ possa ser um importante biomarcador na avaliação de resposta ao tratamento, possibilitando o manejo precoce pós-transplante com terapia alvo-específica.

Palavras-chave: Mieloma múltiplo. Fatores de risco. Prognóstico. Citocinas.

MARTINS, Letícia Navarro Gordan Ferreira. **Study of cytokines in leukapheresis' product in multiple myeloma patients eligible for transplantation: correlation with prognostic factors and clinical outcome.** 2018. 74 p. Dissertation (Master in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

A complex network of cytokines in the bone marrow microenvironment has been implicated as an important factor in the pathogenesis of multiple myeloma (MM). Different cytokines in peripheral blood and / or bone marrow in patients with multiple myeloma have been studied, but there are few data in the literature correlating interleukin in peripheral hematopoietic stem cells (leukapheresis' product) with post-transplant response depth assessment. The objectives of this study were: to assess the profile of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), transforming-beta1 growth factor (TGF- β 1) and interferon-gamma (IFN- γ) in mobilized peripheral stem cells from patients eligible for autologous transplantation with multiple myeloma and to evaluate the association of these cytokines with prognostic factors such as the number of CD34⁺ cells/kg mobilized, disease risk stratification factors, treatment response assessment (pre and post-transplantation) and impact on post-transplant clinical evolution (relapse and death). A retrospective cross-sectional study was carried out at the Bone Marrow Transplantation Unit of the University Hospital of Londrina, from September 2010 to September 2014, with relevant data from the medical records, as well as the laboratory analysis of the cytokines of the 27 patients included in the study. Of the cytokines measured in leukapheresis products, IFN- γ was the one with greater variability at median levels 713 pg/mL [443.5-1213.5], while TGF- β 1 and TNF- α levels were respectively 1238.55 pg/mL \pm 288.84 and 410.5 pg/mL [353-508]. TNF- α levels were significantly higher ($p = 0.05$) in patients > 50 years (559.6 \pm 73.42 pg/mL) than in <50 years (385.9 \pm 20.16 pg/mL), as well as in patients with very high β 2-microglobulin (> 5.5 ng/mL) compared to patients with normal β 2-microglobulin ($p=0.05$). There was no association of relapse or death with TNF- α , TGF- β 1 or IFN- γ levels. There was a very significant inverse correlation between mobilization of stem cells and TGF- β ($r = -0.488$, $p = 0.009$). IFN- γ levels were significantly lower in patients who presented complete response (CR) to treatment compared to patients in very good partial response (VGPR) at three months post-transplant (590.9 \pm 88.49 pg/mL versus 990 \pm 107.5 pg/mL, $p=0.01$), respectively. Patients who lost (CR for VGPR) or maintained response depth at three months post-transplant (CR or VGPR) had a median level of IFN- γ 1133 pg/mL and 635 pg/mL, being considered "high-expressors" of IFN- γ and those with improved response assessment (VGPR to CR) had a median IFN- γ level of 388 pg/mL, hence "low-expressors". Therefore, a relevant correlation between IFN- γ levels and loss of post-transplant response depth suggests that IFN- γ may be an important biomarker in the evaluation of treatment response, allowing early post-transplant management with target-specific therapy.

Key words: Multiple myeloma. Risk factors. Prognosis. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

- Figura 1** – Evolução clonal na patogênese do mieloma múltiplo.....18
Figura 2 – Microambiente medular na patogênese do mieloma múltiplo 19

ARTIGO

- Figure 1** – Patients flow chart43
Figure 2 – Spearman´s correlation coefficient between between albumin and β 2-microglobulin (A), between CD34⁺cells/kg and TGF- β 1(B) and between CD34⁺cells/kg and age at diagnosis (C).....49
Figure 3 – Cytokine levels according to age at diagnosis in multiple myeloma patients50
Figure 4 – Comparative analysis of cytokine levels regarding β 2-microglobulin in multiple myeloma patients50
Figure 5 – Comparative analysis of cytokines levels and response assessment in multiple myeloma patients51
Figure 6 – Comparative analysis of IFN- γ and patients pre and post-transplant assessment51

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Critérios diagnósticos para mieloma múltiplo revisados pelo IMWG	24
Tabela 2 – Estadiamento prognóstico de Durie-Salmon	25
Tabela 3 – Sistema de estadiamento prognóstico (ISS)	26
Tabela 4 – Anormalidades citogenéticas no mieloma múltiplo.....	26
Tabela 5 – Anormalidades citogenéticas no mieloma múltiplo (mSMART).....	27
Tabela 6 – Sistema de estadiamento prognóstico revisado (R-ISS).....	27
Tabela 7 – Critérios de resposta ao tratamento do IMWG	29

ARTIGO

Table 1 – Patient baseline characteristics	47
Table 2 – Cytokine levels assay.....	48
Table 3 – Cytokine levels, risk stratification and post-transplant outcome in multiple myeloma patients	48
Table 4 – Impact of β 2-microglobulin and CD34 ⁺ cells/Kg on relapse.....	52
Table 5 – Impact of CD34 ⁺ cells/Kg on death (overall survival)	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACD-A	Solução de citrato de dextrose anticoagulante-A
CD	Diferenciação de <i>cluster</i>
CM	Componente monoclonal
CR	Resposta completa
CR-s	Resposta completa estrita
CTD	Ciclofosfamida + talidomida + dexametasona
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CyBorD	Ciclofosfamida + bortezomibe + dexametasona
DHL	Desidrogenase láctica sérica
DP	Progressão de doença
DRM	Doença residual
EBMT	<i>European Group for Blood and Marrow Transplantation</i>
ED	Doença estável
EFP	Eletroforese de proteínas
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FLC	Cadeia leve livre
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítica
Hb	Hemoglobina
HD	Hiperdiplóide
HU	Hospital Universitário de Londrina
IEFP	Imunoeletroforese de proteínas
IF	Imunofixação
IFISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente na interfase
IFN- γ	Interferon-gama
Ig A	Imunoglobulina A
Ig D	Imunoglobulina D
Ig E	Imunoglobulina E
Ig G	Imunoglobulina G
Ig H	Imunoglobulina de cadeia pesada
IL	Interleucina
IMiD	Imunomoduladores
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>

ISS	<i>International Staging System</i>
M	Monoclonal (componente-M, proteína-M)
MGUS	Gamopatia monoclonal de significado indeterminado
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
MR	Resposta mínima
mSMART	<i>Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy</i>
NHD	Não-hiperdiplóide
PET	Tomografia por emissão de pósitron
PR	Resposta parcial
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B (NFk-B)
RANKL	Ligante do receptor ativador do NFk-B
R-ISS	<i>Revised International Staging System</i>
RNM	Ressonância nuclear magnética
SD	Doença estável
SG	Sobrevida global
SLP	Sobrevida livre de progressão
sMM	<i>Smoldering Myeloma</i>
TACTH	Transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas
TC	Tomografia computadorizada
TD	Talidomida + dexametasona
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador-beta1
TMO	Transplante de Medula Óssea
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VAD	Vincristina + doxorubicina + dexametasona
VEG	Fator de crescimento endotelial vascular
VGPR	Resposta parcial muito boa
VTD	Bortezomibe (Velcade)+ talidomida + dexametasona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	MIELOMA MÚLTIPLO	17
2.1	DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	17
2.2	FATORES QUE AFETAM A BIOLOGIA.....	17
2.3	CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS.....	22
2.4	SISTEMAS DE ESTADIAMENTO E FATORES DE RISCO PARA ESTRATIFICAÇÃO	24
2.4.1	Sistema de Estadiamento de Durie-Salmon	24
2.4.2	Sistema de Estadiamento do <i>International Staging System</i>	25
2.4.3	Sistema de Estadiamento do <i>Revised International Staging System</i>	26
2.4.4	Outros Fatores de Risco.....	27
2.5	CRITÉRIOS DE RESPOSTA AO TRATAMENTO.....	28
2.6	TRATAMENTO EM PACIENTES ELEGÍVEIS AO TRANSPLANTE E SOBREVIVÊNCIA	31
3	OBJETIVOS	33
4	DESENHO DO ESTUDO, PACIENTES E MÉTODOS	33
4.1	DELINEAMENTO.....	33
4.2	POPULAÇÃO	34
4.3	AMOSTRA	34
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	34
4.5	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	35
4.6	MOBILIZAÇÃO, COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO.....	35
4.7	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS.....	36
4.8	ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS	37
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5	ARTIGO CIENTÍFICO	39
6	CONCLUSÃO	60

7	REFERÊNCIAS	61
8	ANEXOS	68
	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Coleta de Células-Tronco Hematopoiéticas	68
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas.....	70
	ANEXO C – Aprovação do Projeto pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP)/Plataforma Brasil	73

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica maligna amplamente estudada, pois ainda se trata de uma doença incurável. A heterogeneidade do MM reflete não só nas curvas de sobrevida que variam de poucos meses a mais de 10 anos, mas também no entendimento da sua patogênese (1). Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados para elucidação da biologia do MM, uniformização dos critérios diagnósticos e de profundidade de resposta ao tratamento, além da identificação de biomarcadores e fatores prognósticos. Desta forma, houve um impacto substancial no tratamento do MM com melhora do tempo e qualidade de resposta às estratégias terapêuticas atuais (2). O tratamento do MM para os pacientes elegíveis para transplante consiste em quimioterapia indutória, seguida de mobilização, coleta de células-tronco por aférese (se doença estável ou responsiva), quimioterapia de alta dose com o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) e, finalmente; consolidação e/ou manutenção pós-transplante, de acordo com resposta terapêutica obtida.

Algumas ferramentas e alguns biomarcadores são utilizados para determinar a estratificação de risco dos pacientes com MM. Entre eles, o algoritmo do *International Staging System* (ISS) baseado nos parâmetros de β 2-microglobulina e níveis de albumina e o *Revised International Staging System* (R-ISS) que recomenda a combinação do ISS com os níveis de desidrogenase láctica sérica (DHL) e a hibridização *in situ* fluorescente na interfase (iFISH) (3-5). Os altos níveis de β 2-microglobulina refletem a presença de grande massa tumoral e alteração na função renal, os baixos níveis de albumina são resultantes da secreção de citocinas inflamatórias no microambiente medular e o aumento de DHL denota a agressividade da doença, sugerindo alto índice de proliferação e/ou presença de massa tumoral (extra-óssea e extramedular) (4-7). A análise iFISH detecta a presença de anormalidades cromossômicas que também são elementos que definem a característica biológica no MM, caracterizando o paciente em baixo (standard) ou alto risco (8-11).

O microambiente medular tem sido um dos focos de interesse na compreensão da patogênese do mieloma múltiplo: evolução clonal maligna, progressão e sobrevida da doença, assim como a falha ao tratamento. O nicho

da medula óssea é um modulador primário, com propriedade de permitir infiltração, crescimento, proliferação, adesão e migração celular, mediadas por fatores inflamatórios (citocinas, quimocinas, adipocinas e fatores de crescimento) e vias de sinalização endócrinas. Por isso, a complexa interação existente no microambiente medular tem grande importância no crescimento de células malignas (plasmocitárias), citotoxicidade das células saudáveis, bem como a resistência às drogas empregadas no tratamento do mieloma (2, 12-16).

Vários estudos têm sido descritos envolvendo citocinas, tanto em sangue periférico quanto em medula óssea de pacientes com MM. Dentre as citocinas estudadas, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), fator de crescimento transformador-beta1 (TGF- β 1) e interferon-gama (IFN- γ) são citocinas com grande relevância nos tumores e estão estreitamente envolvidas na interação entre as células plasmocitárias e as células do microambiente medular, além de relacionadas a características clínico-patológicas e curvas de sobrevida do MM (15-18).

Portanto, o nosso estudo teve como finalidade caracterizar o perfil das citocinas de TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ no produto de leucoaférese (células-tronco periféricas) de pacientes com MM elegíveis para transplante. Essa caracterização permite identificar as citocinas como possíveis fatores prognósticos e avaliar o impacto clínico pós-TACTH das mesmas, não só nas curvas de sobrevida, mas também na profundidade de resposta ao tratamento, possibilitando intervenção terapêutica precoce como a consolidação e/ou manutenção.

2 REVISÃO DE LITERATURA

MIELOMA MÚLTIPLO

2.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

O MM é um câncer caracterizado pela proliferação clonal maligna das células plasmocitárias no microambiente da medula óssea (MO), com a presença de proteína monoclonal no sangue ou urina e associação com disfunção orgânica (1). Acomete 1% de todos os cânceres e aproximadamente 10% das neoplasias hematológicas. Esta doença afeta discretamente mais o sexo masculino em relação ao feminino, é duas vezes mais frequente na população afro-americana e a idade mediana ao diagnóstico é de aproximadamente 65 anos (19,20). Na população brasileira, em estudo de Hungria e colaboradores (21), observou-se uma prevalência discretamente maior em homens (50,3%) do que nas mulheres (49,7%), acometimento mais comum nos caucasianos e idade mediana ao diagnóstico de 60,5 anos.

2.2 FATORES QUE AFETAM A BIOLOGIA

A patogênese e progressão do MM são alvo de ampla investigação, já que é considerado uma doença clonal evolutiva que progride de uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance), para uma fase intermediária do MM (sMM: *smoldering myeloma*) e finalmente para o MM sintomático (lesão de órgão alvo) (19). Sugere-se que ocorra um evento inicial no centro germinativo num estágio precoce das células B, facilitado por um processo de hipermutação somática, e mais tardiamente um outro evento oncogênico nas células plasmocitárias, caracterizando um clone (*founder clone*). Durante a evolução de MGUS para sMM e; finalmente para MM, ocorrem novas mutações (mutações *de novo*) e formação de subclones (S1/S2) determinando a heterogeneidade clínica e biológica da doença (Figura 1) (13,14,22).

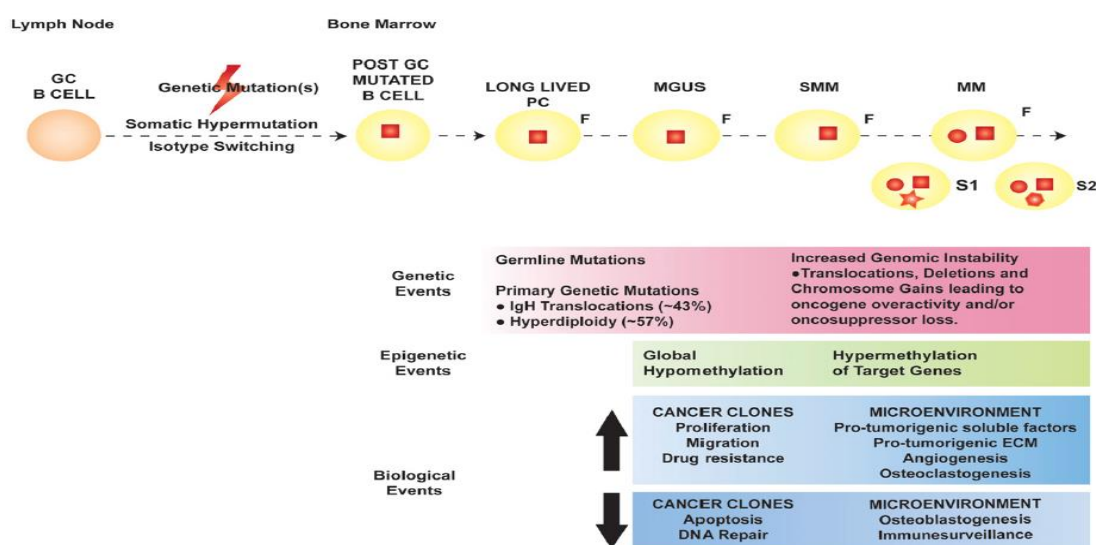


Figura 1 – Evolução clonal na patogênese do mieloma múltiplo

GC: Centro Germinativo; PC: Células Plasmocitárias; MGUS: Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; SMM: *Smoldering Myeloma*; MM: Mieloma Múltiplo; F: *Founder clone*; S: Subclones; IgH: Imunoglobulina de Cadeia Pesada

Fonte: Bianchi and Munshi. *Blood* (2015)

Embora nas três etapas evolutivas do MM, os pacientes tenham as mesmas mutações iniciais e a maioria das anormalidades cromossômicas do MM sintomático, isso não é suficiente para a progressão da doença (13). As mutações somáticas que ocorrem no MM podem ser caracterizadas como hiperdiplóides (HD) pela presença de trissomias dos cromossomos (3,5,7,9,11,15,19 e 21) ou não-hiperdiplóides (NHD) incluindo as translocações t(4;14), t(11;14), t(14;16) e t(14;20), que envolvem a translocação precoce com genes da cadeia pesada de Ig (13, 23-27). As células plasmocitárias saudáveis da medula óssea apresentam como imunofenotipagem CD38⁺, CD138⁺, CD19⁺, CD45⁺ e CD56⁻, já os plasmócitos mielomatosos são CD38⁺, CD138⁺, porém são CD19⁻ (90%), CD45⁻ (99%) e CD56⁺ (70%) (28,29).

Outras condições mais complexas ocorrem no microambiente medular como eventos epigenéticos (hipometilação/ hipermetilação de genes alvo) e eventos biológicos como mutação/ativação/supressão de oncogenes que propiciam a ativação de vias de sinalização; e, conseqüentemente, a expansão de clones malignos (progressão ciclo celular e/ou bloqueio da apoptose), neoangiogênese e osteoclastogênese (13). As vias de sinalização mais descritas no MM são Ras-MEK/ERK/MAPK (*mitogen-associated protein kinase*), PI3K

(*fosfatidil-inositol3-kinase*)/AKT, notch, WNT (*wingless*), NF- κ B (*fator nuclear-kappa B*) e IL-6R (*IL-6 receptor*)/STAT3-JAK (30,31).

A complexidade da patogênese do MM e dificuldade no seu entendimento não envolve apenas os fatores genéticos, epigenéticos e biológicos das células mielomatosas. O microambiente medular é um nicho dinâmico de interação bidirecional entre as células plasmocitárias e outras células como osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, células estromais, fibroblastos, adipócitos, osteoclastos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos (Figura 2) (14,15). Essa interação entre as células neoplásicas e as demais células do microambiente promove a liberação de quimiocinas, citocinas e outros fatores solúveis que produzem uma situação inflamatória/imunossupressora causando progressão de doença, resistência a drogas, neo-angiogênese, destruição óssea e disfunção imunológica (13, 14, 22,23).

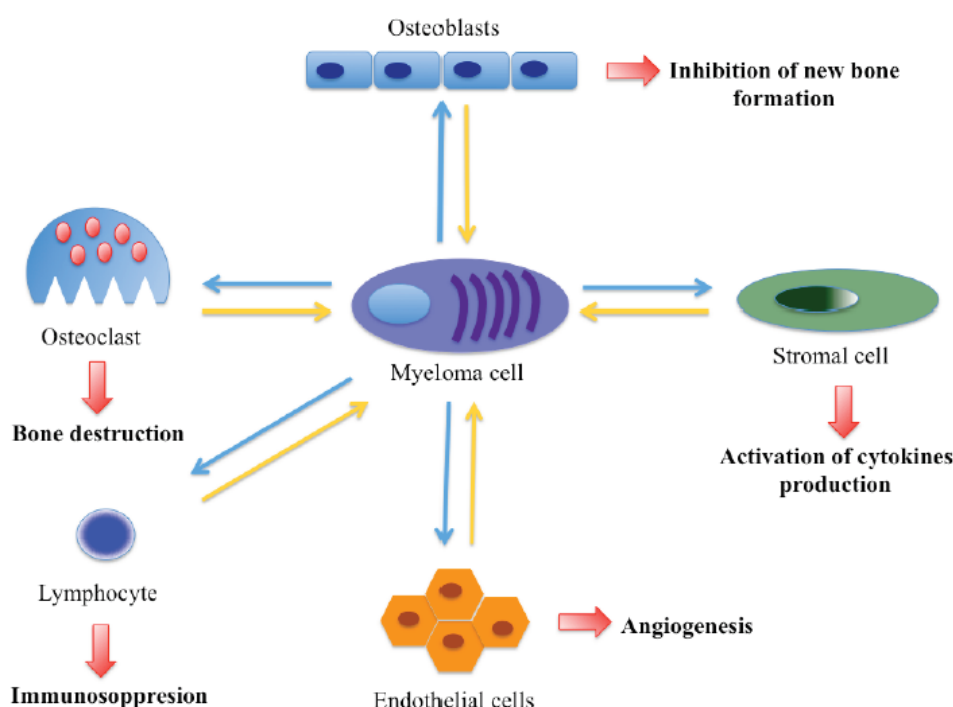


Figura 2 – Microambiente medular na patogênese do mieloma múltiplo

Fonte: Bianchi and Munshi. *Blood* (2015)

Considerando o impacto de diferentes citocinas e fatores de crescimento (mediadores inflamatórios) envolvidos na patogênese do mieloma é pertinente a busca de biomarcadores que possam auxiliar o diagnóstico e prognóstico da doença (12,16). As numerosas citocinas secretadas pelas células

estromais da medula óssea e células mielomatosas incluem IL-6, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF: *vascular endothelial growth factor*), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α : *tumor necrosis factor*), fator de crescimento transformador beta-1 (TGF- β 1: *transforming growth factor beta-1*), IL-1, IL-4, IL-8, IL-10, IL-15, IL-17, IL-21, IL-22, interferon-gama (IFN- γ : *interferon-gamma*), entre outros fatores. Essas citocinas promovem a sobrevivência da células plasmocitárias malignas através da ativação de vias de sinalização (32).

Dentre as citocinas envolvidas na patogênese do MM foram avaliadas no nosso estudo:

Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)

O TNF- α é uma citocina inflamatória com amplo espectro de atividade biológica, incluindo a função de diferenciação e transformação do linfócito B no microambiente medular através de uma complexa rede de comunicação com as células estromais, estímulo a angiogênese, o qual pode induzir a da apoptose das células do MM (32). Neste contexto, muitos autores correlacionaram o nível de TNF- α sérico com parâmetros clínicos do mieloma múltiplo com resultados bastante contraditórios. Jurisic e colaboradores encontraram aumento significativo no nível sérico de TNF- α , entre os diferentes estágios de mieloma múltiplo e voluntários sem a doença, porém em outros estudos esta diferença não foi demonstrada (32-36). Uma correlação positiva entre os níveis séricos elevados de TNF- α e número de plasmócitos da medula óssea também foi descrita, sugerindo a conexão desta citocina com a estimativa de massa tumoral do mieloma múltiplo, assim como o número de lesões osteolíticas e DHL elevado (32). Como o TNF- α atua diretamente no nicho medular, a análise dessa citocina na medula óssea tem sido relacionada ao pior prognóstico e pior resposta ao tratamento do MM, no entanto pouco se conhece sobre a evolução pós-transplante do paciente com mieloma múltiplo e análise de citocinas no produto de leucoaférese (37,38).

Fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1)

O TGF- β 1 é uma citocina que regula uma variedade de processos

celulares fisiológicos, incluindo a proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência e imunidade. A precisa elucidação da função dessa citocina, requer um melhor conhecimento dos mecanismos que envolvem a supressão contra promoção tumoral, portanto o TGF- β 1 pode produzir efeitos intrínsecos dicotômicos. Um importante aspecto da sua função é sua interação com proteínas do microambiente tumoral (39).

Nos pacientes com MM, o TGF- β 1 prejudica a hematopoiese atuando sobre os progenitores hematopoiéticos e células mesenquimais do estroma, além de aumentar a atividade das lesões osteolíticas via estimulação do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL: *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) e da sobrevivência dos osteoclastos. Isto sugere que o bloqueio da sinalização do TGF- β 1 pode melhorar o microambiente medular e reduzir a progressão tumoral, além da estabilização das lesões líticas. Apesar da importância do TGF- β 1 na oncogênese e na doença óssea do mieloma múltiplo, a maioria de seus antagonistas não foram seletivos contra a doença, sendo potenciais causadores de efeitos adversos (39). O TGF- β 1 também atua na adesão e na migração de células-tronco da medula óssea para a periferia (CD34⁺) numa relação inversa (38). Portanto, a eficácia da mobilização é inversamente relacionada ao nível de TGF- β 1, por isso o aumento do TGF- β 1 é um componente crucial para o desenvolvimento da mielofibrose (40,41).

Interferon- γ (IFN- γ)

O IFN- γ , é uma potente citocina, também conhecida como interferon imune, que promove tanto imunomodulação como supressão da tumorigênese e da infecção. Sob imunovigilância, células T, células *natural Killers* (NK) e macrófagos se deslocam para o sítio tumoral, desencadeando imunidade anti-oncogênica através da secreção de várias moléculas citotóxicas, entre elas, IFN- γ e TNF- α . Apesar da atividade anti-tumoral induzida pelo IFN- γ , as células cancerígenas possuem diversos mecanismos de escape da sinalização anticâncer dessa citocina (42). Tumores podem escapar da imunovigilância através da expressão de moléculas que inibem a resposta imune antitumoral, tal como ligante-1 da morte celular programada (PD-L1: *programmed cell death ligand-1*)

superexpresso no MM (43). As células T dos pacientes com MM apresentam maior proporção de PD-1 e produzem IFN- γ , estimulando o PD-L1 das células do mieloma com desregulação da função efetora das células T e escape tumoral. Na doença avançada do MM (refratária/recaída), o nível de expressão de PD-1 é mais elevado e está relacionado com pior resposta ao tratamento (14). O resultado do uso de inibidor PD-L1 (anti-PD-L1) no MM como agente único ainda é limitado e associado à importante toxicidade, porém combinações terapêuticas com novos agentes têm sido estudadas como possíveis estratégias (15). Em 1994, Palumbo relatou um caso de um paciente com MM com redução do componente M após 6 meses do uso de IFN- γ recombinante, manutenção dos níveis da paraproteína M por 16 meses de seguimento e inibição da reabsorção óssea. Portanto, sugeriu um forte efeito anti-mieloma e anti-osteolítico do IFN- γ *in vivo* (44). O IFN- γ é uma citocina direta ou indiretamente envolvida nos mecanismos de ação de diferentes tratamentos empregados no MM.

2.3 CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico do MM sintomático consiste na identificação de 10% ou mais de plasmócitos monoclonais na medula óssea (mielograma e/ou biópsia de medula óssea) ou presença de plasmocitoma em biópsia de tecido associado ao componente monoclonal sérico ou urinário e lesão em órgão-alvo representada por hipercalcemia, insuficiência renal, anemia ou lesão óssea (45).

No MM, a proliferação clonal de células plasmocitárias resulta na secreção monoclonal de imunoglobulinas intactas ou cadeias leves livre (FLC). Este componente anormal de imunoglobulina é denominado de proteína monoclonal, componente M ou paraproteína. O nível sérico de proteína M mensurável é definido como banda sérica de proteína >0,5-1g/dL e excreção de componente M na urina >200 mg/24 horas. A eletroforese de proteínas consiste no aumento homogêneo e fusiforme de um tipo específico de imunoglobulina, geralmente na fração gama, menos frequente na fração beta, com a mesma mobilidade eletroforética levando à produção de uma curva com base estreita conhecida como pico monoclonal. Já a imunoeletroforese/imunofixação, detecta o isotipo específico de cadeia pesada IgG-IgA-IgM-IgE-IgD, enquanto

kappa-lambda indicam o tipo de cadeia leve do componente M. Mais de 97% dos pacientes apresentam MM secretor com paraproteína detectável no soro e/ou urina, no entanto alguns pacientes apresentam apenas FLC na urina, ou seja, a imunoglobulina intacta não é mensurável no soro, considerados secretores de cadeia leve urinária. Quando a paraproteína M não é detectável no soro e/ou urina por eletroforese e/ou imunofixação é recomendada a pesquisa de cadeias leves livres de imunoglobulina pelo método de nefelometria. O nível de FLC mensurável no sangue é de 100 mg/L e existe uma anormalidade na relação kappa:lambda (0,26-1,65 – valor normal). No mieloma secretor, o componente M serve como principal marcador tumoral bioquímico para tratamento inicial e na avaliação de resposta, nortando o retratamento na progressão da doença. A magnitude do componente M (g/L) é um parâmetro de monitorização de resposta na maioria dos pacientes, mas não serve para monitorar pacientes com mieloma FLC apenas ou mieloma não secretor. O FLC é o marcador tumoral utilizado nos pacientes oligosecretores (sem componente M mensurável) e a plasmocitose medular (imunohistoquímica) é o único marcador disponível para monitorização nos pacientes não secretores (46).

Os critérios diagnósticos foram revisados pelo *International Myeloma Working Group* (IMWG) e mais três biomarcadores específicos foram incluídos: células plasmocitárias clonais na medula óssea $\geq 60\%$, nível sérico de FLC ≥ 100 mg/L e >1 lesão focal na ressonância magnética (pelo menos 5 mm) (Tabela 1) (9). Por isso, quando houver suspeita clínica de MM, a presença de proteína M deve ser investigada através da combinação de eletroforese de proteínas (EFP), imunoeletroforese de proteínas/imunofixação (IEFP/IF) e nível sérico de FLC. Cada novo biomarcador está associado com aproximadamente 80% de risco de progressão para lesão de órgão-alvo, portanto a atualização nos critérios diagnósticos representa uma mudança no paradigma do diagnóstico precoce, permitindo a introdução do tratamento antes dos danos aos órgãos-alvo (9).

Tabela 1 - Critérios diagnósticos para mieloma múltiplo revisados pelo IMWG

Plasmócitos monoclonais na medula óssea \geq 10% e/ou plasmocitoma extramedular

Presença da proteína monoclonal sérica e/ou urinária \geq 500 mg/24 h

Evidência de lesão em órgãos-alvo (atribuídas à proliferação plasmocitária)

Presença de um ou mais dos seguintes fatores:

- Hipercalemia: Cálcio sérico > 11 mg/dL ou $0,25$ mmol/L $>$ valor referência normal
- Insuficiência Renal: Creatinina sérica ≥ 2 mg/dL
- Anemia: Hemoglobina < 10 g/dL ou queda > 2 g/dL do valor normal
- Lesão óssea: Uma ou mais lesão osteolítica no raio-X de esqueleto, tomografia computadorizada (TC) ou TC por emissão de pósitron (PET/TC)

Presença de um ou mais dos seguintes biomarcadores:

- células plasmocitárias clonais na medula óssea $\geq 60\%$
 - nível sérico de cadeias leves livres de imunoglobulina (FLC: *free light chain*) ≥ 100 mg/L
 - >1 lesão focal na ressonância magnética (pelo menos 5 mm)
-

Fonte: IMWG Am. J. Hematol. (2016)

2.4 SISTEMAS DE ESTADIAMENTO E FATORES DE RISCO PARA ESTRATIFICAÇÃO

A variabilidade na evolução clínica no MM depende de vários fatores prognósticos capazes de estratificar os pacientes em grupos de risco e desta forma instituir a intensidade do tratamento, conforme o grupo e; assim, como proporcionar informação individualizada sobre o prognóstico do paciente. Por isso, sistemas de estadiamento foram desenvolvidos para avaliação do prognóstico baseados nos achados clínicos e laboratoriais dos pacientes (1).

2.4.1 Sistema de Estadiamento de Durie-Salmon

O estadiamento de Durie-Salmon tem sido empregado, desde 1975 pela categorização dos pacientes com MM em estadios I, II e III, dependendo do grau de anemia, hipercalemia sérica, nível sérico e urinário do componente monoclonal e presença de lesões líticas; e, subdivididos em estadios A ou B, dependendo do nível sérico de creatinina (Tabela 2) (46).

Tabela 2 – Estadiamento Prognóstico de Durie-Salmon

Estádios	Critérios
I	Baixa massa tumoral ($<0,6$ células $\times 10^{12}/m^2$) Todos os seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Hb $>10,5g/dL$ • Cálcio $\leq 12mg/dL$ • IgG $< 5g/dL$ ou IgA $< 3g/dL$ • Proteinúria de Bence Jones $<4g/24h$ • Ausência de lesões ósseas maiores
II	Intermediário (entre estadio I e III)
III	Alta massa tumoral ($1,2 \times$ células $\times 10^{12}/m^2$) Qualquer um dos seguintes: <ul style="list-style-type: none"> • Hb $<8,5g/dL$ • Cálcio sérico $>12mg/dL$ • IgG $>7g/dL$ ou IgA $>5g/dL$ • Proteinúria de Bence Jones $>12g/24h$ • Múltiplas lesões líticas ou fraturas
A	<ul style="list-style-type: none"> • Função renal normal (< 2.0 mg/100 mL)
B	<ul style="list-style-type: none"> • Função renal alterada (≥ 2.0 mg/100 mL)

Fonte: Durie and Salmon. Cancer (1975)

2.4.2 Sistema de estadiamento do *International Staging System* (ISS)

O algoritmo do ISS é um sistema que emprega outras ferramentas e biomarcadores para estratificação de risco do mieloma baseando-se nos parâmetros de altos níveis de $\beta 2$ -microglobulina (grande massa tumoral e alteração na função renal) e baixos níveis de albumina (secreção de citocinas inflamatórias no microambiente medular) (Tabela 3). O score do ISS identificou os pacientes em três diferentes grupos prognósticos: ISS I, ISS II e ISS III, com sobrevida global respectivamente, de 62, 44 e 29 meses (3). O score ISS pode ser aplicado aos pacientes brasileiros com MM, conforme estudo realizado de 1998 a 2004 (21).

Tabela 3 – Sistema de Estadiamento Prognóstico - *International Staging System*

Estádios	Critérios
I	β 2-microglobulina sérica < 3,5 mg/dL e albumina \geq 3,5 g/dL
II	Não preenchem os critérios dos estádios I e III
III	β 2-microglobulina sérica > 5,5 mg/ dL

Fonte: Griep et al. JCO (2005)

2.4.3 Sistema de Estadiamento do *Revised International Staging System* (R-ISS)

O nível da desidrogenase láctica sérica (DHL) também é um relevante biomarcador e seu nível acima da normalidade denota agressividade do MM, sugerindo alto índice de proliferação e/ou presença de massa tumoral (extra-óssea e extramedular) com pior sobrevida global (4,5,7). As anormalidades cromossômicas detectadas por *FISH* (hibridização *in situ* fluorescente na interfase), também são elementos que definem a característica biológica no MM, caracterizando-se como risco standard a ausência de deleção, del(17p), translocação t(4;14) (p16, q32) e alto risco a presença de pelo menos uma das anormalidades cromossômicas citadas, com pior sobrevida global (Tabela 4) (6,8,22,48). Outra estratificação de risco citogenética, sugerida pela *Mayo Clinic*, foi a estratificação mSMART (Tabela 5) que classifica a translocação (4;14) em risco intermediário, já que representa um grupo heterogêneo em relação à sobrevida, quando existe associação de outros fatores prognósticos e tratamento utilizado (49-52).

Tabela 4 – Anormalidades citogenéticas no mieloma múltiplo

Grupo de risco	Anormalidade citogenética	Incidência (%)
Risco standard	hiperdiploidia	50%
	t(11;14)	15%
	t(6;14)	5%
Alto risco	ganho(1q)	35-40%
	t(4;14)	15%
	del(1p)	10%
	del(17)	10%
	t(14;16)	2-3%
	t(14;20)	1%

Fonte: Morgan et al. Nature Reviews Cancer (2012) e Chesi & Bergsagel. Int J Hemat (2013)

Tabela 5 – Anormalidades citogenéticas no mieloma múltiplo (mSMART)

Grupo de risco	Anormalidade citogenética	Incidência (%)
Risco standard	trissomias t(11;14) t(6;14)	75%
Risco intermediário	t(4;14) ganho(1q)	10%
Alto risco	t(14;16) t(14;20) del(17p)	15%

Fonte: Mayo Clin. Proc (2013)

O consenso do *International Myeloma Working Group* (IMWG) recomenda a combinação do FISH, nível de DHL e estadiamento ISS para estratificação de risco do MM, o *Revised International Staging System* (R-ISS) apresentado na Tabela 6 (4).

Tabela 6 – Sistema de Estadiamento Prognóstico Revisado - *Revised International Staging System* (R-ISS)

Sobrevida	Estadio I	Estadio II	Estadio III
Mediana SLP (meses)	ISS I e risco standard citogenético por FISH e DHL normal	Não preenche critérios do estadio I ou III	ISS III e alto risco citogenético por FISH <u>ou</u> DHL elevado
	66	42	29
Mediana SG (meses)	Não atingida	83	43

SLP: Sobrevida livre de progressão; SG: Sobrevida global; FISH: Fluorescence *in situ* hybridization; Risco standard citogenético por FISH = sem anormalidade citogenética, Alto risco citogenético por FISH = del (17p) e/ou t(4;14) e/ou t(14;16); DHL: desidrogenase láctica.

Fonte: Palumbo, *et al.* JCO (2015)

2.4.4 Outros Fatores de Risco

Outros fatores prognósticos com impacto na sobrevida estão relacionados às características intrínsecas da célula tumoral, do paciente e combinação de ambos: morfologia plasmablástica (uma associação entre a morfologia mais imatura com pior prognóstico) (53), infiltração de plasmócitos na medula óssea (presença de um padrão difuso de infiltração, relacionada com pior

prognóstico), índice proliferativo do plasmócito mielomatoso elevado com menor sobrevida (54-56), imunofenótipo das células mielomatosas, subtipo cadeia imunoglobulina (MM IgA, IgD e IgE são de pior prognóstico) e nível de proteína-M (57), doença extramedular e extensão de lesões óssea focais (58,59) plaquetopenia, anemia, insuficiência renal (60), idade, performance status, comorbidades e fatores sócio-demográficos e resposta ao tratamento (61).

2.5 CRITÉRIOS DE RESPOSTA AO TRATAMENTO

A avaliação de resposta à terapia ou progressão de doença no MM têm sido modificada nos últimos anos, em decorrência do surgimento de novos agentes terapêuticos e da melhoria ao acesso a exames mais sensíveis para detecção de doença, incluindo a doença residual mínima. Dessa forma, a variação de marcadores bioquímicos, como o componente-M sérico e urinário, FLC, plasmocitose de medula óssea e exames de imagem para detecção de plasmocitomas e lesões ósseas devem ser periodicamente avaliados na prática clínica, no mínimo a cada 3 meses e geralmente a cada 4 semanas como realizados em ensaios clínicos (46).

Em 2006, o *International Myeloma Working Group* (IMWG) redefiniu critérios de resposta, propostos anteriormente pelo *Myeloma Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT), devido à substancial implementação da terapêutica do MM nas últimas décadas, com a introdução de vários novos agentes, com diferentes mecanismos de ação, resultando na melhora nas taxas de resposta e tempo de resposta ao tratamento. Aos critérios de resposta ao tratamento pelo IMWG, houve a inclusão do conceito de resposta completa estrita (CR: *complete response stringent*) determinada pela normalização da dosagem sérica de cadeias leves livres, a resposta parcial muito boa (VGPR: *very good partial response*) passou a ser caracterizada por redução de $\geq 90\%$ componente M sérico e a exclusão da confirmação das variações séricas do componente-M a cada seis semanas (62). Em 2016, o *International Myeloma Working Group* (IMWG) revisou critérios de resposta, conforme disposto na Tabela 7 (2).

Tabela 7 – Critérios de resposta ao tratamento do IMWG

Tipo de resposta	Critérios de resposta
CRs	<ul style="list-style-type: none"> • Mesmos critérios da CR e • Razão FLC normal • Ausência de plasmócitos clonais na biópsia de medula óssea confirmada por imunohistoquímica
CR	<ul style="list-style-type: none"> • IF sérica e urinária: negativas • Desaparecimento de plasmocitomas • $\leq 5\%$ de plasmócitos no aspirado de medula óssea
VGPR	<ul style="list-style-type: none"> • IF sérica e/ou urinária: positiva • EFP sem pico monoclonal ou • Redução $\geq 90\%$ do componente M (CM) sérico e nível componente M urinário $<100\text{mg}/24\text{h}$
PR	<ul style="list-style-type: none"> • Redução do componente M sérico $\geq 50\%$ e redução do componente M urinário $\geq 90\%$ ou para $< 200\text{mg}/24\text{h}$ • Se CM sérico e urinário não mensurável, redução $\geq 50\%$ FLC • Se CM sérico e urinário e FLC não mensuráveis, redução $\geq 50\%$ plasmócitos clonais na medula óssea (se plasmócitos $\geq 30\%$) • Se presente, redução $\geq 50\%$ do plasmocitoma
MR	<ul style="list-style-type: none"> • $\geq 25\%$ mas $\leq 49\%$ de redução do componente monoclonal sérico • Redução no componente m urinário em 50-89% • Se presente, redução $\geq 50\%$ do plasmocitoma
SD	<ul style="list-style-type: none"> • Não preenche critérios p/ CRs, CR, VGPR, PR, MR ou PD • Melhor descrita para descrever tempo para progressão
DP	<p>Aumento em 25% do menor valor confirmado de resposta:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Componente monoclonal M sérico (aumento absoluto ≥ 0.5 g/dL) • Componente monoclonal M sérico aumentado $\geq 1\text{g}/\text{dL}$, se o menor valor do componente M foi $\geq 5\text{g}/\text{dL}$ • Componente monoclonal M urinário (aumento absoluto $\geq 200\text{mg}/24\text{h}$) • Se CM sérico e urinário não mensurável, diferença entre a FLC envolvida e não envolvida (aumento absoluto ≥ 10 mg/dL) • Se CM sérico/urinário e FLC não mensuráveis, plasmócitos

DP

- clonais na medula óssea (aumento absoluto $\geq 10\%$)
- Aparecimento de novas lesões, aumento $\geq 50\%$ de mais de uma lesão, aumento $\geq 50\%$ de plasmócitos circulantes (mínimo de 200 células/uL)

CRs: Resposta completa estrita; CR: Resposta completa; VGPR: Resposta parcial muito boa; PR: Resposta parcial; MR: Resposta mínima; SD: Doença estável; DP: Progressão de doença; CM: Componente monoclonal; FLC: Free light chain (cadeias leves livres); IF: Imunofixação; EFP: Eletroforese de proteínas.

Fonte: *Lancet Oncol.* (2016)

A uniformização do consenso dos critérios de resposta incorporada aos ensaios clínicos permitiu uma melhor comparação entre as diferentes medicações, combinação de drogas e estratégias terapêuticas, apesar do avanço no tratamento nos últimos anos. No entanto, mesmo com a introdução de novos agentes ao tratamento do mieloma, a maioria dos pacientes recidivam a doença, mesmo após atingir resposta completa estrita (CRs), refletindo a não detecção da doença com técnicas de avaliação de resposta recomendadas. Por isso, novos métodos para detecção e quantificação dos níveis de doença residual mínima (DRM) na medula óssea e extramedular têm sido estudados para serem incorporados aos critérios de resposta ao tratamento, já que o nível de DRM indetectável por métodos convencionais é provavelmente o fator limitante para a manutenção de sobrevida (livre de progressão e global) a longo prazo. Os métodos de avaliação de DRM na medula óssea são citometria de fluxo multiparamétrica (marcadores de superfície para distinção de células plasmocitárias normais e do MM), ASO (*allele-specific oligonucleotide*)- qPCR (método molecular para identificação e quantificação de rearranjo gênico específico de cadeia pesada de imunoglobulina) e sequenciamento next-generation (amplificação e sequenciamento de segmentos gênicos de imunoglobulina). A avaliação de DRM extramedular é realizada através de ressonância nuclear magnética (RNM) e 18F-fluorodeoxiglicose, tomografia por emissão pósitron (18F-FDG-PET). Porém, esse estudo é um dos primeiros estudos na avaliação de doença residual mínima como critério de resposta; e, investigações futuras nesta direção e conhecimento de aspectos biológicos do MM serão necessários, para determinar em que nível a DRM é clinicamente relevante e quando deve ser avaliada (2).

2.6 TRATAMENTO EM PACIENTES COM ELEGIBILIDADE AO TRANSPLANTE E SOBREVIDA

O tratamento do MM está indicado para o paciente sintomático, definido pelo acrônimo - CRAB: C- hipercalcemia; R- insuficiência renal (renal failure); A- anemia; B- lesões ósseas (bone disease), enquanto a observação clínica é preconizada para o mieloma assintomático. A melhora na sobrevida não havia sido observada, quando comparada à instituição de tratamento precoce para pacientes assintomáticos e o início dos sintomas e/ou lesão em órgãos-alvo (1). Porém, em 2016, após revisão dos critérios diagnósticos pelo IMWG e inclusão dos três biomarcadores específicos (células plasmocitárias clonais na medula óssea $\geq 60\%$, nível sérico de FLC ≥ 100 mg/L e mais de uma lesão óssea focal (pelo menos 5 mm) na ressonância magnética), houve uma mudança no paradigma do tratamento, permitindo a introdução do mesmo antes dos danos aos órgãos-alvo (9). Ensaios clínicos estão em andamento, para determinar se novos agentes podem atrasar a progressão do mieloma assintomático (32).

O esquema de tratamento consiste na terapia de indução seguida de quimioterapia em altas doses para pacientes elegíveis para o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas (TACTH) (idade, performance status e comorbidades). O conceito do TACTH foi desenvolvido nos anos 80 e desde meados de 1990 é considerado tratamento standard de primeira linha para pacientes com MM e função renal normal (63). A sobrevida global e qualidade de vida do MM melhorou muito nos últimos 15 anos com o surgimento da talidomida, bortezomib e lenalidomida, mais evidentemente nos pacientes com menos de 65 anos e elegíveis para o TACTH. Esses agentes terapêuticos podem ser utilizados antes e após o TACTH com objetivo de melhorar a taxa de resposta e prolongar sua duração (64-66). Um estudo realizado com 4990 pacientes tratados com quimioterapia convencional e quimioterapia em altas doses, mostrou que pacientes que atingiram resposta completa após indução tiveram maior SLP e SG, do que aqueles que obtiveram resposta parcial (59-89 x 39-60 meses). Portanto, a obtenção de melhor resposta à indução do tratamento, antes do transplante (status pré-TACTH), traduz em melhores resultados, com sobrevida mais prolongada pós-transplante (67,68). Recentemente, novos agentes terapêuticos promissores foram aprovados como o carfilzomib, pomalidomida, panobinostat, ixazomib, elotuzumab e daratumumab para tratamento do mieloma

múltiplo recidivado, porém o mecanismos de ação de algumas drogas ainda não está totalmente elucidado. A talidomida, lenalidomida e pomalidomida são agentes denominados imunomoduladores (IMiDs); bortezomib, carfilzomib e ixazomib são inibidores de proteassoma e finalmente, o elotuzumab e daratumumab são anticorpos monoclonais anti-SLAMF7 e anti-CD38 (32). O uso de novos agentes, rotineiramente utilizados, como parte do regime de indução antes do transplante resulta em substancial melhora na profundidade de resposta pré-TMO. Portanto, vários estudo com esses agentes também têm sido propostos no pós-transplante como consolidação e manutenção, objetivando melhora nas curvas de sobrevida (69).

O transplante alogênico está associado com maiores riscos de complicações e mortalidade, portanto é realizado com pouca frequência e em casos selecionados (68).

A atualização de critérios diagnósticos, indução mais efetiva, estratégias de consolidação e manutenção pós-transplante, incluindo novos agentes terapêuticos, revolucionaram o paradigma do tratamento do MM. Embora, nas últimas décadas houve um significativo avanço no tratamento do paciente com MM, com conseqüente impacto na sobrevida, a doença ainda permanece incurável (68). Neste contexto, nos últimos anos, existe um paradigma do tratamento intermitente *versus* contínuo do MM, a tendência do uso de novos agentes terapêuticos como primeira linha de terapia, além do tratamento baseado em fatores de risco.

Portanto, o presente estudo avaliou a possibilidade de correlacionar as citocinas TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ como biomarcadores de desfecho clínico pós-transplante (profundidade de resposta e sobrevida livre de progressão e global), já que essas citocinas foram descritas previamente associadas a parâmetros clínicos, carga tumoral, osteólise e cinética da mobilização das células-tronco e tratamento do MM (18, 33-36,38,44).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral foi caracterizar no produto de leucoaférese, o perfil das citocinas TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ de pacientes portadores de MM elegíveis para transplante correlacionando-as com fatores prognósticos e de desfecho clínico.

Objetivos específicos:

- Quantificar as citocinas TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ no produto de leucoaférese
- Correlacionar o perfil das citocinas com quantidade de células-tronco mobilizadas
- Correlacionar o perfil das citocinas com fatores prognósticos clínicos e laboratoriais dos pacientes com MM elegíveis para transplante
- Correlacionar o perfil das citocinas no desfecho clínico pós-transplante (recaída, óbito e profundidade de resposta ao tratamento)

4 DESENHO DO ESTUDO, PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

A coleta das amostras dos participantes foi autorizada com assinatura dos Termos de Consentimentos Livre e Esclarecido para Coleta e para o Transplante de Células-Tronco de Sangue Periférico (Anexos A e B), documentação exigida pelo Sistema Nacional de Transplante e conduzida de acordo com a Declaração de Helsinki (2008). Este projeto foi aprovado pelo parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos/Plataforma Brasil, sob o número 1.389.996, em 18/01/2016 e pelo Comitê de Ética Institucional (Anexo C). Está disponível para consulta na Plataforma Brasil sob o número CAAE 50070515.0.0000.0107.

Trata-se de um estudo transversal retrospectivo, com pacientes com diagnóstico de MM elegíveis para transplante, referenciados pelos hematologistas e oncologistas de Londrina e Macrorregião Norte do Paraná.

4.2 POPULAÇÃO

A população do estudo foi composta de 45 pacientes portadores de MM submetidos ao transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas periféricas atendidos na Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital Universitário de Londrina/ Universidade Estadual de Londrina (HU/UEL), no período de setembro/2010 a setembro/2014.

4.3 AMOSTRA

A amostra foi não probabilística de conveniência, constituída de 27 pacientes com diagnóstico de MM e elegíveis para transplante, avaliados conforme critérios de inclusão e exclusão (Figura 3).

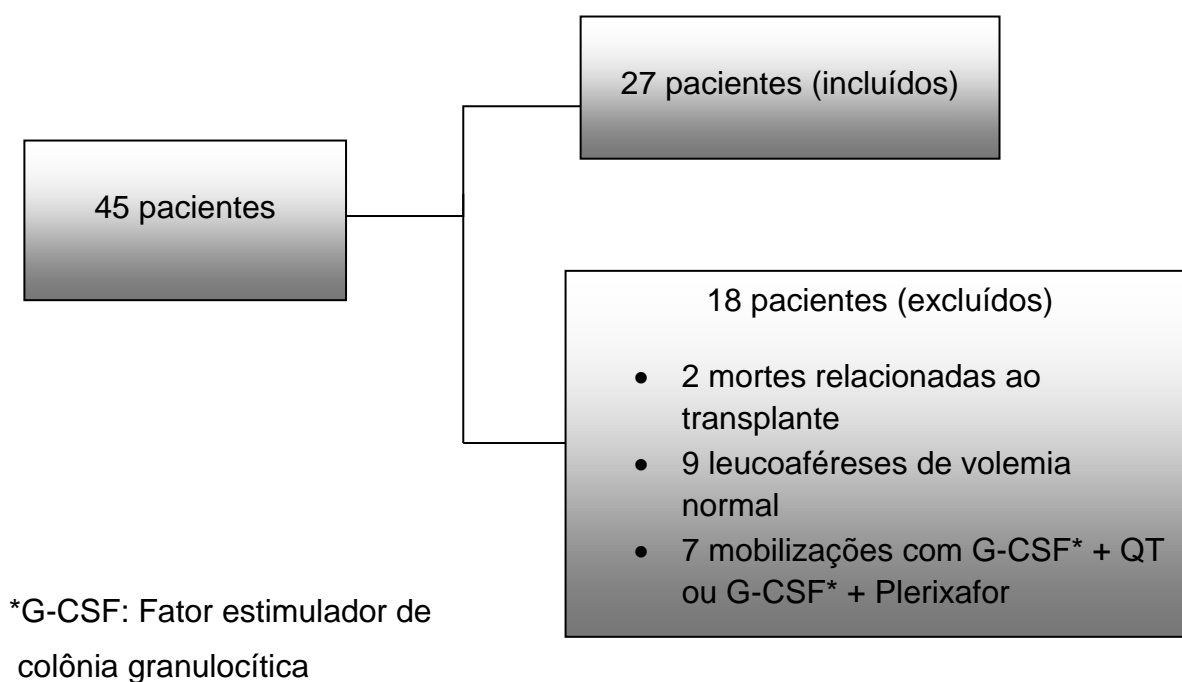


Figura 3. Fluxograma dos pacientes.

Fonte: Próprio autor

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes com MM, referenciados pelos hematologistas e oncologistas de Londrina e Macrorregião Norte do Paraná, elegíveis para

transplante, mobilizados com fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) exclusivamente e submetidos à leucoaférese de grande volume (processamento de seis volemias). Os critérios de inclusão foram preenchidos por 27 pacientes. O diagnóstico, tratamento e avaliação da profundidade de resposta ao tratamento (pré-TACTH) foram realizados de acordo com os critérios propostos pelo *International Myeloma Working Group*, já os critérios de elegibilidade para transplante, foram avaliados conforme Portaria Ministério da Saúde nº 2.600, de 21 de outubro de 2009 - Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.

4.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Pacientes submetidos à coleta de células-tronco periféricas com outras estratégias de mobilização (associação de G-CSF com quimioterapia ou Plerixafor) e evoluíram com mortalidade relacionada ao transplante (<100 dias). Entre os pacientes excluídos, dois apresentaram mortalidade relacionada ao transplante (< 100 dias do procedimento), por infecção nos D+32 e D+43, nove pacientes foram submetidos à leucoaférese de volemia normal (processamento ≤ 3 volemias) e sete pacientes foram mobilizados com esquemas diferentes (G-CSF com adição de quimioterapia ou Plerixafor).

4.6 MOBILIZAÇÃO, COLETA E CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

Os pacientes com MM elegíveis para transplante foram submetidos à mobilização e coleta de células-tronco periféricas com o mesmo protocolo clínico, que consiste na aplicação de Filgrastima (G-CSF - fator estimulador de colônia granulocítica) na dose de 10 μ g/kg/dia divididas em duas aplicações subcutâneas/dia por cinco dias consecutivos. No quarto dia (D4) do processo de mobilização foi feita contagem de células CD34⁺ periféricas por citometria de fluxo (Citômetro FacsCanto II) buscando-se CD34⁺ ≥ 10 μ g/mL. A leucoaférese foi realizada no dia seguinte (D5 da mobilização), com objetivo mínimo de coleta de 2 x 10⁶ células CD34⁺/kg para transplante (1 ou 2 procedimentos de leucoaférese), em máquina de aférese Cobe Spectra), com processamento de seis volemias, em cada dia de aférese, através de um cateter

venoso central, de duplo lúmen com calibre 11 french. Os anticoagulantes utilizados durante o procedimento foram ACD-A: *anticoagulant citrate dextrose solution-A* e heparina, conforme protocolo institucional para coleta de grande volume. Ao término da aférese, o produto de células-tronco foi encaminhado ao Laboratório de Criopreservação do Hospital Universitário de Londrina para processamento e armazenamento até o momento do transplante. O processamento de CTHP para fins de transplante autólogo envolveu várias etapas até a criopreservação. Primeiramente, foi realizada a pesagem e armazenamento da bolsa em geladeira (2-6°C) para a realização tanto da contagem de células nucleadas totais (CNT- leucócitos totais) quanto das células CD34⁺. Com o resultado do número de células foram realizados os cálculos do número de CNT/kg ($\times 10^8$) e de células CD34⁺/Kg ($\times 10^6$), cálculos da concentração celular em cada bolsa (aproximadamente 2,5 - 3,0% CNT/Kg por bolsa) e número de bolsas a serem criopreservadas. O preparo do produto de leucoaférese é contido de 50 mL células + 40 mL de plasma autólogo + 10 mL dimetilssulfóxido a 10% DMSO - solução crioprotetora), sem solução tampão ou albumina humana, resultando num volume final de 100 ml cada bolsa que será armazenada a - 86°C (freezer Indrel) até o momento do transplante. O teste de viabilidade celular pelo método de coloração pelo azul de Trypan foi realizado antes, após a adição da solução crioprotetora (DMSO) e imediatamente após o degelo no momento do transplante. Apesar de haver diferença entre a viabilidade nos três momentos de avaliação, essa diferença não refletiu no tempo de recuperação hematológica pós-transplante dos pacientes. Assim como a viabilidade celular, a análise microbiológica também foi realizada como controle de qualidade do produto de leucoaférese antes da criopreservação e no dia do transplante.

4.7 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS

Uma alíquota de células-tronco criopreservadas nas mesmas condições para transplante (células-tronco + plasma autólogo + dimetilssulfóxido) foi separada da última bolsa de criopreservação do produto da primeira aférese (D#1) e armazenada em um vial. Nesta alíquota de 50 uL de amostra pura, conduzidas em duplicata, foram determinados os níveis das citocinas TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ , todas ao mesmo momento (dezembro 2016), imediatamente

após o degelo, pelo método de ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay* (e-Biosciences, EUA), no aparelho Victor Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA). Os pacientes foram agrupados em “alto ou baixo-expressor” conforme com o nível basal mediano de IFN- γ , já que houve uma grande variabilidade nos níveis dessa citocina (70).

4.8 ANÁLISE DE PRONTUÁRIOS

Foram obtidas informações relevantes nos dados de prontuários dos 27 pacientes com MM, conforme consenso do IMWG. O agrupamento das variáveis foi realizado, conforme justificativas descritas em literatura. A variável subtipo de mieloma foi dicotomizada em dois grupos, imunoglobulina G (IgG) ou IgG com associações, representado pelos subtipos de maior prevalência e melhor prognóstico (3) e imunoglobulina A (IgA), cadeia kappa ou IgA com associações. Os pacientes com estadiamento ISS foram agrupados em ISS I e grupo ISS II ou ISS III, conforme estratificação de risco de melhor e pior prognóstico, respectivamente (3,4). Quanto à resposta ao tratamento (status pré e pós-TCTH), um grupo ficou definido como aqueles que obtiveram resposta completa (CR) ou resposta muito boa (VGPR) e o segundo grupo representado por aqueles em resposta parcial (PR) pré ou pós-transplante, diante da correlação de melhor a resposta obtida ao tratamento com melhor sobrevida livre de progressão (SLP) (71). Os pacientes foram avaliados em relação à resposta ao tratamento em resposta completa, resposta parcial muito boa e resposta parcial, de acordo com a redução do componente M sérico e/ou urinário à eletroforese de proteína e imunofixação, redução de plasmocitomas e infiltração de plasmócitos na medula óssea. Houve limitação da realização de citogenética (FISH), pesquisa de cadeia leve livre e doença residual mínima por citometria de fluxo pela indisponibilidade sócio-econômica, portanto os pacientes não foram avaliados quanto à resposta completa estrita. Em relação ao tratamento de indução do mieloma (pré-TMO), os pacientes foram divididos de acordo com o número de ciclos de indução (≥ 4 ciclos ou < 4 ciclos) e de acordo com o número de linhas de terapias recebidas (≤ 1 linha ou > 1 linha de tratamento), ou seja, em relação à boa resposta terapêutica indutória ou não (9). A heterogeneidade do tratamento da indução do MM deve-se ao fato dos

pacientes terem sido tratados em diferentes centros de referência. Para o tempo de recaída, os pacientes foram agrupados em um grupo com recaída ≤ 18 meses (recaída precoce) e em outro com recaída >18 meses ou sem recaída, já que os pacientes com recaída precoce não apresentam benefício do segundo transplante versus tratamento com novos agentes (72).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada conforme a distribuição dos dados (teste da normalidade), sendo os resultados apresentados acompanhados da média e desvio padrão de cada grupo (distribuição normal) ou conforme mediana de cada grupo com intervalo de variação, dispostos de acordo com intervalo interquartil de 25-75% (distribuição não normal). Características dos pacientes foram testadas utilizando testes de Qui Quadrado (χ^2). Para estudo da correlação clínica destes achados, foram realizados estudos de correlação de Pearson ou Spearman. As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste ANOVA (três grupos) e pós-teste de Dunn. Para todas as análises, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A sobrevida global foi calculada a partir da data do diagnóstico até o óbito. A sobrevida livre de progressão foi calculada a partir da data do diagnóstico até a data da progressão (recaída). As sobrevidas foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* e as diferenças foram comparadas pelo teste de *log-rank*. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no software GRAPHPAD Prism 6.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

5 ARTIGO CIENTÍFICO

Interferon-gamma in mobilized stem cells: a possible prognostic marker in early post-transplant management in multiple myeloma.

Is IFN- γ a predictor of loss of response?

Letícia Navarro Gordan Ferreira Martins^a, Andrea Akemi Morita^a, Geise Ellen Broto^a, Érika Tatakura^b, Suellen dos Santos Silva^c, Ivete Conchon^c, Wander Rogério Pavanelli^c, Carolina Panis^{b*}, Décio Sabbatini Barbosa^{a*}

^aPostgraduate Program in Health Sciences Center, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

^bLaboratory of Inflammatory Mediators, State University of Western Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão, PR, Brasil

^cDepartment of Pathological Sciences, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil

These authors equally contributed to the study.*

Corresponding Author:

Letícia Navarro Gordan Ferreira Martins
Rua Luis Lerco, 797, casa 53 Terra Bonita
CEP: 86047-610
Londrina-PR, Brasil
Phone: 55 (43) 33712751/ 55 (43) 988151896
Fax: 55 (43) 3371-2749
E-mail: leticiagordan@hotmail.com

Source of research assistance: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ABSTRACT

Introduction: A complex network of cytokines in the bone marrow microenvironment has been implicated as an important factor in the pathogenesis of multiple myeloma (MM). Different cytokines have been studied in MM, both in peripheral blood and/or bone marrow, but there are no data correlating cytokines in leukapheresis' product with post-transplant response depth to treatment.

Material and Methods: In a retrospective cross-sectional study, levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α), transforming growth factor beta-1 (TGF- β 1) and interferon gamma (IFN- γ) in peripheral blood stem cells (PHSC) of patients with MM eligible for transplantation were evaluated. Association of these cytokines with some factors such as mobilized CD34+cells/kg, staging, response to treatment and outcome were analyzed.

Results: IFN- γ levels in leukapheresis' product were significantly lower in patients who achieved complete response (CR) three months post-transplant when compared to patients in very good partial response (VGPR) (590.9 ± 88.49 pg/mL versus 990 ± 107.5 pg/mL, $p=0.01$), respectively. The median baseline IFN- γ level was 635 pg/mL. Patients who lost and maintained a depth of response at the third-month post-transplant had a median level of IFN- γ 1133 and 635 pg/mL, respectively, being considered "high-expressors" of IFN- γ , while those reaching improved response were called "low-expressors" (median level IFN- γ 388 pg/mL). Overall and progression-free survival did not have statistically significant correlation with TNF- α , TGF- β 1 or IFN- γ , as well as TNF- α and TGF- β 1 levels with post-transplant response assessment.

Conclusion: IFN- γ in PHSC seems to be an important biomarker of loss of response in MM, suggesting early post-transplant therapeutic management.

KEY WORDS: multiple myeloma, risk factors, prognosis, cytokines

INTRODUCTION

Multiple myeloma (MM) is a malignant hematologic malignancy that is widely studied, but it is still an incurable disease. The heterogeneity of MM reflects not only in outcome ranging from few months to more than 10 years, but also in the understanding of its pathogenesis.¹ In the last two decades, several studies have been done to elucidate the biology of MM, standardization of diagnostic criteria and response to treatment, as well as the identification of biomarkers and prognostic factors. Thus, there was a substantial impact on the treatment of MM with an improvement of duration and quality of response to current therapeutic strategies.² MM treatment for patients eligible for transplantation consists of induction chemotherapy followed by mobilization, stem cell collection (if stable or responsive disease), high-dose chemotherapy with autologous transplantation, and finally; consolidation or post-transplant maintenance.

Several biomarkers and tools are used to determine risk stratification of patients with MM. Among them, International Staging System (ISS) algorithm is based on β 2-microglobulin and albumin levels and the Revised International Staging System (R-ISS), which recommends the combination of ISS with serum lactate dehydrogenase (LDH) and fluorescence *in situ* hybridization at the interphase (iFISH).³⁻⁵ High levels of β 2-microglobulin reflect the presence of a large tumor mass and alteration in renal function. Low levels of albumin result from the secretion of inflammatory cytokines in the bone marrow microenvironment, and the increase in LDH denotes disease aggressiveness, suggesting high proliferation index and/or presence of tumor mass (extrabone and/or extramedullary).^{6,7} FISH detects the presence of chromosomal abnormalities that are also elements that define biological characteristics in MM, stratifying in low (standard) or high-risk patients.⁸⁻¹⁰

Bone marrow microenvironment has been a focus of research in understanding MM's pathogenesis: malignant clonal evolution, progression and survival of the disease, as well as treatment failure. Medullary niche is a primary modulator, capable of allowing infiltration, growth, proliferation, adhesion and cell migration, mediated by inflammatory factors (cytokines, chemokines, adipokines and growth factors) and endocrine signaling pathways. Therefore, the complex interaction in the bone marrow microenvironment has great importance in the growth of malignant cells (plasmocytes), cytotoxicity of healthy cells, as well as the resistance to drugs used in the treatment of myeloma.^{2,11-15}

Several studies have been described involving cytokines in both peripheral blood and bone marrow of MM patients. Among cytokines studied, tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), transforming-beta1 (TGF- β 1) and interferon-gamma (IFN- γ) are cytokines highly relevant in tumors, closely involved in the interaction between plasma cells and bone marrow microenvironment and related to clinicopathological characteristics and outcome of MM.¹⁶⁻²⁰

Therefore, our study aimed to characterize cytokine profile of TNF- α , TGF- β 1 and IFN- γ in leukapheresis' product (peripheral stem cells) of patients with transplant-eligible MM. Thus, these cytokines could be identified as possible prognostic factors associated with clinical impact after TACTH, not only in survival outcomes, but also in response depth to treatment, allowing an early post-transplantation management as consolidation and/or maintenance.

MATERIALS AND METHODS

Study Design and Sampling

Participant's sample collection was authorized by signing of the Free and Informed Consent Terms for Collection and Transplantation of Peripheral Blood Stem Cells, documentation required by the National Transplant System and conducted according to the Declaration of Helsinki (2008). Plataforma Brasil approved this project under the number 1.389.996, on January 18th of 2016 and also by the Institutional Ethics Committee on Human Research. It is available for consultation at Plataforma Brasil under the number CAAE 50070515.0.0000.0107.

A retrospective cross-sectional study with all MM patients submitted to autologous hematopoietic stem cell transplantation (N=45) from September 2010 to September 2014, at Bone Marrow Transplantation Unit (BMT) of the University Hospital of Londrina/State University of Londrina. Patients were referred by oncohaematologists, from Londrina and North Macroregion of Paraná State-Brazil for evaluation of eligibility for transplantation. Diagnosis, treatment and response evaluation (pre-HSCT) were performed according to the criteria proposed by the International Myeloma Working Group (IMWG). Of these 45 patients, 27 fulfilled the inclusion criteria, that is, mobilization with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) exclusively and

submitted to high-volume leukapheresis (six processed total blood volume). Among the excluded patients, two had transplant-related mortality (<100 days of the procedure), due to infection in D+32 and D+43, nine patients underwent leukapheresis of normal volume (≤ 3 volumes) and seven patients were mobilized with different regimens (granulocyte colony-stimulating factor - G-CSF with the addition of chemotherapy or Plerixafor™) (Figure 1).

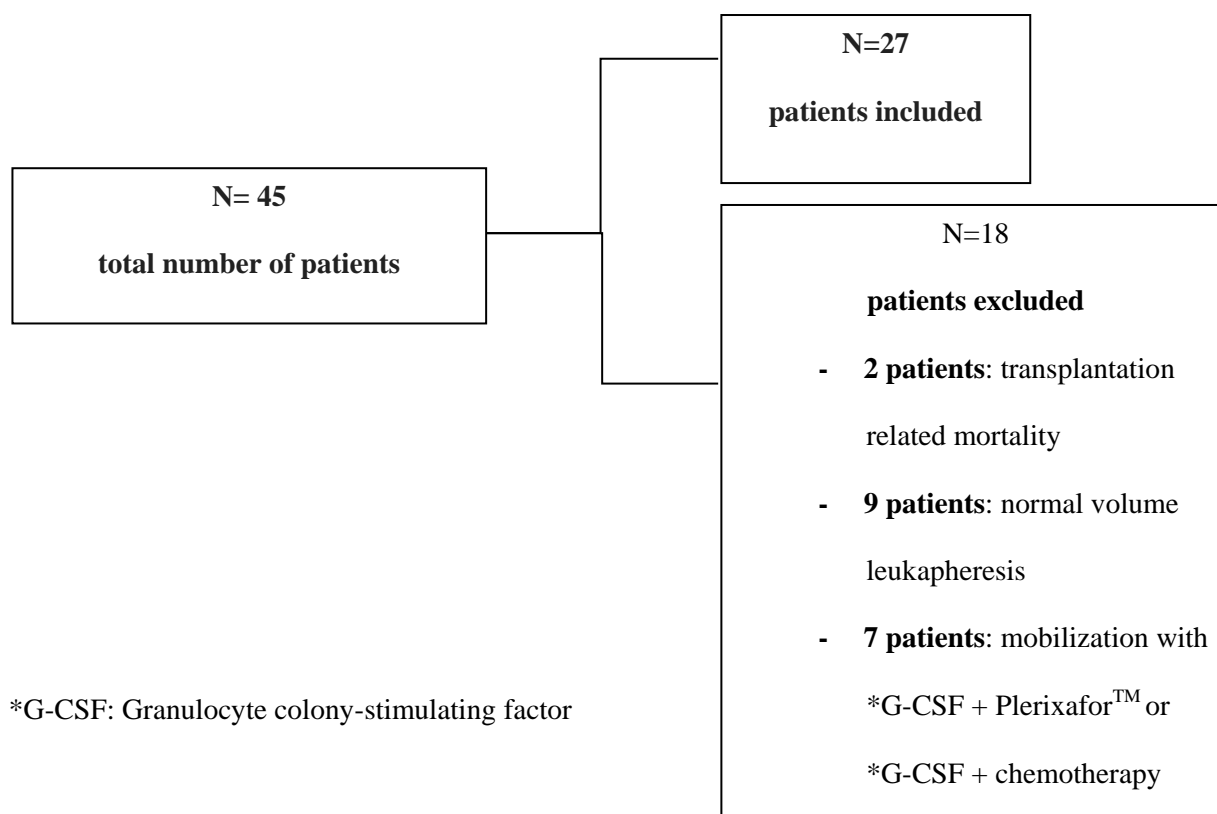


Figure 1. Patients flow chart.

Although patients received different induction treatment regimens for MM, all patients were submitted to mobilization and peripheral stem cells harvesting with the same clinical protocol. They received 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ of Filgrastim (G-CSF) twice a day, subcutaneous, during five consecutive days for mobilization. On the fourth day (D4) of the mobilization process, peripheral $\text{CD}34^+$ cells were counted by flow cytometry (FacsCanto™II Cytometer, BD Biosciences) aiming at least $\text{CD}34^+ > 10 \mu\text{g}/\text{ml}$. Leukapheresis was performed from the fifth day of mobilization, harvesting at least 2×10^6 $\text{CD}34^+$ cells/kg for transplantation (1 or 2 procedures), in CobeSpectra/TerumoBCT apheresis' machine, processing six volemiams in each day, through an 11 French double lumen central venous catheter. Anticoagulants used during the procedure were

anticoagulant citrate dextrose solution-A (ACD-A) and heparin, according to the institutional protocol for large volume collection. At the end of apheresis, the stem cell product was sent to the Laboratory of Cryopreservation of the University Hospital of Londrina for processing and storage until the moment of transplantation. CTHP processing for autologous transplant involved several steps. First, the leukapheresis' product was weighed and stored in a refrigerator (2-6 ° C), until total nucleated cell count (TNC-total leukocytes) and CD34⁺ cells count. After cellularity results, calculation of the number of TNC/kg (x10⁸) and of CD34⁺ cells/kg (x10⁶), cell concentration (approximately 2.5-3.0% TNC/Kg per bag) and number of bags to be cryopreserved were performed. Leukapheresis' product (50 mL cells + 40 mL autologous plasma + 10 mL dimethylsulfoxide 10% (DMSO cryoprotective solution) without buffer solution or human albumin) resulted in a final volume of 100 ml in each bag, which were stored at - 86°C (Indrel freezer) until the transplant. Cell viability test by the Trypan blue staining method was performed prior and post to DMSO addition and immediately after thawing at the time of transplant. Although there was a difference between the viability at the three moments of evaluation, this difference did not reflect on post-transplant hematologic recovery time. Besides cell viability, microbiological analysis was also performed as leukapheresis' product quality control before cryopreservation and on the day of transplantation.

Cytokines level assay

An aliquot containing 50 uL of cryopreserved stem cells plus plasma and DMSO, under the same conditions as stem cells for transplantation, was obtained from the last cryopreservation bag of the first day apheresis' product and stored in a vial. TNF- α , TGF- β 1 and IFN- γ levels were all performed at a same time (December 2016), in a duplicate sample, immediately after samples' thawing by enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA according to the manufacturer's conditions (e-Biosciences, USA) and quantified in Victor Multilabel Plate Reader (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Patients were classified into groups, according to median basal level of IFN- γ in "high or low-expressors".

Study population

Relevant information on the diagnosis of MM was obtained according to IMWG's consensus and ISS risk factors for disease. The heterogeneity of the treatment of MM induction is due to the fact that the patients were treated at different reference

centers, with different numbers of induction cycles and therapies lines, according to the best therapeutic response obtained. Response criteria assessment was classified in complete response, very good partial response and partial response, based on serum and/or urinary monoclonal component by protein electrophoresis and immunofixation, reduction of plasmocytomas and percentage of plasma cells in the bone marrow. Complete stringent response was not reported, since no free light chain and minimal residual disease by flow cytometry were performed. There was limited cytogenetic analysis, free light chain screening and minimal residual disease by flow cytometry due to socioeconomic unavailability. TNF- α , TGF- β 1 and IFN- γ levels (in pre-HSCT) were all correlated with clinical-laboratory prognostic factors and MM outcome.

Statistical analyses

Statistical analyses was performed according to data distribution (normality test) and results presented were followed by the mean and standard deviation of each group (normal distribution) or as the median of each group with a range of variation, arranged according to the interquartile range of 25-75% (non-normal distribution). Patient characteristics were tested using Chi-squared test. Correlation analyses were performed by Pearson's or Spearman's tests. Continuous variables were analyzed by ANOVA (three groups) and confirmed by Dunn's post-test. For all statistical analyses p values <0.05 were considered statistically significant. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until death. Progression-free survival (PFS) was calculated from date of diagnosis until date of progression (relapse). Survival (OS and PFS) was estimated using the Kaplan-Meier method and differences in survival were compared by the log-rank test. All statistical analyses was conducted on GraphPad Prism 6.0 software (GRAPHPAD Software, San Diego, CA) and Standard Package for Social Sciences, version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

RESULTS

Participant's characteristics were described in Table 1. In this study, 51.9% of the patients involved were male while 48.1% were female. Mean age at diagnosis were 55 ± 9 years and most of the patients (74.1%) were stratified according to ISS, in stages II/III at diagnosis. Treatment employed was heterogeneous, including radiotherapy, thalidomide and dexamethasone (TD), cyclophosphamide, thalidomide and dexamethasone (CTD), bortezomib, thalidomide and dexamethasone (VTD), cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone (CyBorD) and vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD). Most patients received more than 4 cycles of induction to achieve a better pre-transplant response depth, but only 22.8% of patients received more than one induction treatment line. Regarding evaluation of pre-transplant response, 85.1% of the patients achieved complete response (CR) or (VGPR - very good partial response). The mean stem cell harvested was 3.4×10^6 CD34⁺ cells/kg in one or two high volume leukapheresis procedures. Each variable was categorized into different groups according to relevant literature data. The subtype of myeloma was dichotomized in two groups: immunoglobulin G (IgG) or IgG with associations, represented by subtypes of higher prevalence and better prognosis³ and immunoglobulin A (IgA), kappa chain or IgA with associations. Patients were staged into ISS I or ISS II and ISS III group, according to risk stratification of better and worse prognosis, respectively.^{3,5} Concerning on treatment response (pre and post-HSCT status), one group was defined as those who had achieved CR or VGPR and the second group represented by those in partial response (PR), given the correlation between the better response obtained to the treatment with better progression-free survival (PFS).²¹ Regarding induction treatment (pre-HSCT), patients were divided into the number of induction cycles (> 4 or < 4 cycles) and number of prior lines of therapy (< 1 or > 1 line of therapy), according to response evaluation after induction.⁸ For the time of relapse, patients were grouped into relapse ≤ 18 months (early relapse) and into relapse > 18 months or no relapse, since patients with early relapse do not benefit from the second transplantation versus treatment with novel agents.²² Three months after high-dose chemotherapy, 87.9% of the patients were in CR or VGPR.

Table 1. Patients baseline characteristics.

Parameters		Values	%	p-value
Age (years)		55±9		-
Gender	Female	13	48.1	0,85
	Male	14	51.9	
Hemoglobin (g/dL)		10.18±2.49	-	-
Bone marrow plasma cells (%)		42.66±8.6	-	-
Immunoglobulin subtype IgG or IgG + association		14	51.9	0,85
IgA or IgA+ association or kappa chain		13	48.1	
Albumin (g/dL)		3.77±0.75	-	-
Osteolytic lesions	Yes	20	74	0,01*
	No	7	26	
Extramedullary plasmocytoma	Yes	7	26	0,01*
	No	20	74	
β2- microglobulin (ng/mL)		4.85 [2.52-7.47]	-	-
ISS stratification	I	7	25.9	0,01* (I x II/III)
	II	6	22.2	
	III	14	51.9	
LDH (U/L)		202 [131.75-292.75]	-	-
Number of prior lines of therapy (induction)	≤ 4 cycles	9	33.3	0,08
	> 4 cycles	18	66.7	
Lines of treatment (induction)	1 line of therapy	21	77.2	0,004*
	> 1 line of therapy	6	22.8	
Pre-HSCT response assessment	CR	11	40.7	<0,001*
	VGPR	12	44.4	
	PR	4	14.9	
Post-HSCT response assessment	CR	10	37	<0,001*
	VGPR	14	51.9	
	PR	3	11.1	
CD34 ⁺ cells/kg (x10 ⁶)		3.4 [2.4-5.3]	-	-
Relapse	Yes	12	44.4	0,85
	No	15	55.6	
Death	Yes	9	33.3	0,08
	No	18	66.7	

*Indicates significant statistical difference (p<0.05) by Qui-square test.

LDH: serum lactate dehydrogenase; HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; CD34: cluster of differentiation 34; CR: complete response; VGPR: very good partial response; PR: partial response.

About cytokines profile in leukapheresis' product performed by ELISA assay, IFN-γ was the one with greater variability at median levels 713 pg/mL [443.5-1213.5], so patients were grouped into "high or low expressors", according to median basal level of this cytokine as well as applied in Szmigielska-Kaplon *et al* study.²³ TGF-β1 and

TNF- α levels were respectively 1238.55 pg/mL \pm 288.84 and 410.5 pg/mL [353-508], as described in Table 2. Leukapheresis' product samples were immediately thawed, thus reflecting the composition of the cell/protein product mobilized from the medullary microenvironment to the periphery. There was no relationship between IFN- γ levels and cell concentration, cell viability, number of CD34⁺ cells/kg ($\times 10^6$), total nucleated cells - TNC/kg ($\times 10^8$), despite leukapheresis' product freezing and thawing. Cytokine parameters were correlated with ISS risk stratification and post-transplant outcome (relapse and death) without significant results (Table 3).

Table 2. Cytokine levels assay.

Parameters	Values
IFN- γ (pg/mL)	713 [443.5-1213.5]
TGF- β 1 (pg/mL)	1238.55 \pm 288.84
TNF- α (pg/mL)	410.5 [353-508]

Values are presented as median and range of variation according to the interquartile range of 25-75% (non-normal distribution) or mean \pm standard error of means (normal distribution).

IFN- γ : interferon gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1; TNF- α : tumor necrosis factor alpha

Table 3. Cytokine levels, risk stratification and post-transplant outcome in multiple myeloma patients.

	IFN- γ *	TGF- β 1*	TNF- α *
Risk Stratification			
ISS I	751.4 \pm 131.5 pg/mL	1331 \pm 112 pg/mL	374.9 \pm 33.86 pg/mL
ISS II	708.7 \pm 180.5 pg/mL	1274 \pm 114.3 pg/mL	496.9 \pm 95.83 pg/mL
ISS III	869.1 \pm 109.8 pg/mL	1170 \pm 78.61 pg/mL	457.3 \pm 35.54 pg/mL
Relapse			
Yes	838.3 \pm 115.1 pg/mL	1241 \pm 73.86 pg/mL	487.9 \pm 51.04 pg/mL
No	758.7 \pm 104.9 pg/mL	1236 \pm 86.1 pg/mL	407.5 \pm 34.89 pg/mL
Death			
Yes	838 \pm 136 pg/mL	1252 \pm 85.21 pg/mL	478.3 \pm 61.33 pg/mL
No	768.7 \pm 92.33 pg/mL	1230 \pm 75.48 pg/mL	424.2 \pm 32.48 pg/mL

*Indicates no significant statistical difference ($p > 0.05$) between risk stratification, relapse or death between cytokine levels

IFN- γ : interferon gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1; TNF- α : tumor necrosis factor alpha; ISS: International Staging System.

As expected, significantly inverse correlation of albumin with $\beta 2$ -microglobulin was found ($r = -0.515$, $p=0.012$), since most patients were staged as ISS II/III (74.1%) reflecting a higher disease severity.^{3,9} $CD34^+$ cells/kg count also had an inverse correlation with age ($r = -0.396$, $p= 0.040$), that is better mobilization of stem cells due to better hematopoietic reserve in younger patients.²⁴ In relation to cytokine levels, there was a very significant inverse correlation between $CD34^+$ cells/Kg counts with TGF- $\beta 1$ ($r=-0.488$, $p=0.009$) (Figure 2 A,B,C).

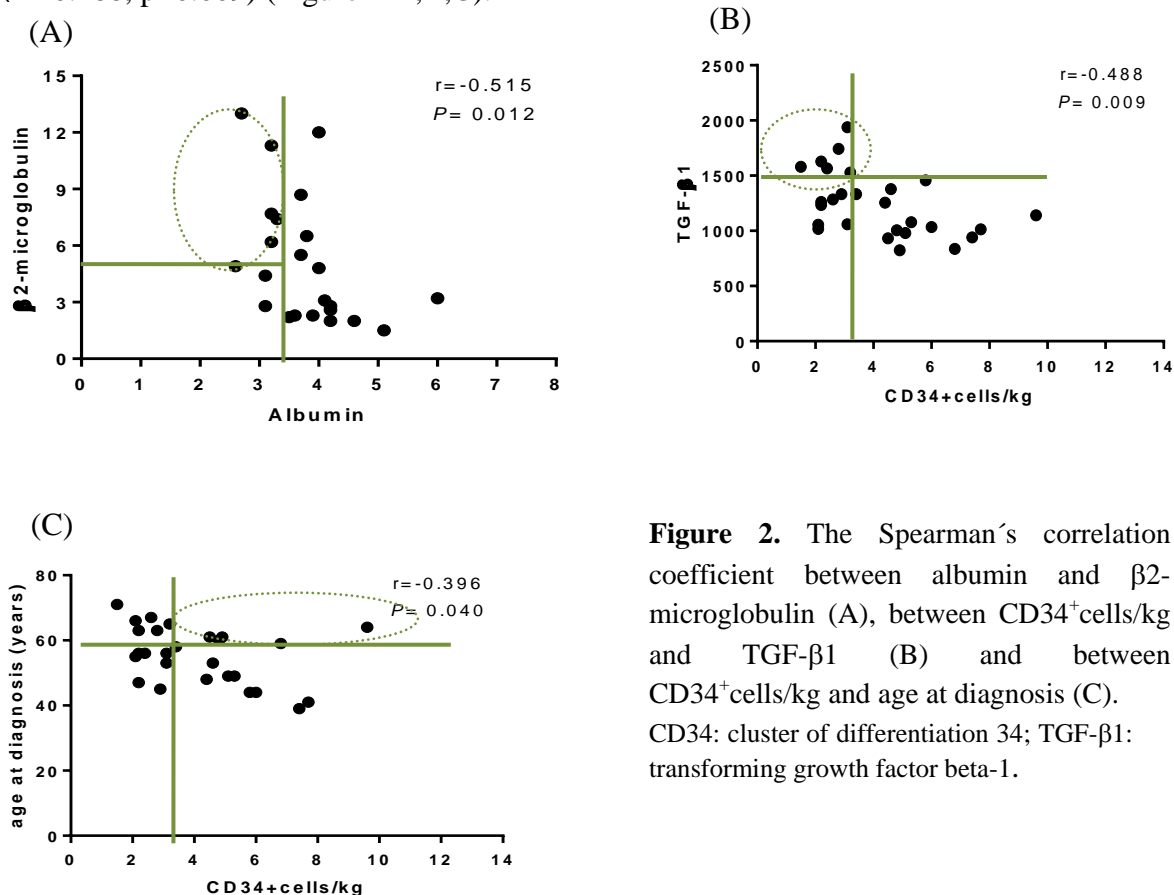


Figure 2. The Spearman's correlation coefficient between albumin and $\beta 2$ -microglobulin (A), between $CD34^+$ cells/kg and TGF- $\beta 1$ (B) and between $CD34^+$ cells/kg and age at diagnosis (C). $CD34$: cluster of differentiation 34; TGF- $\beta 1$: transforming growth factor beta-1.

TNF- α was significantly higher in patients older than 50 years (559.6 ± 73.42 pg/mL) versus patients younger than 50 years (389.5 ± 20.16 pg/mL), as well as in patients with very high $\beta 2$ -microglobulin (> 5.5 ng/mL) versus patients with normal $\beta 2$ -microglobulin, both correlations with $p=0.05$ (Figure 3 and 4).

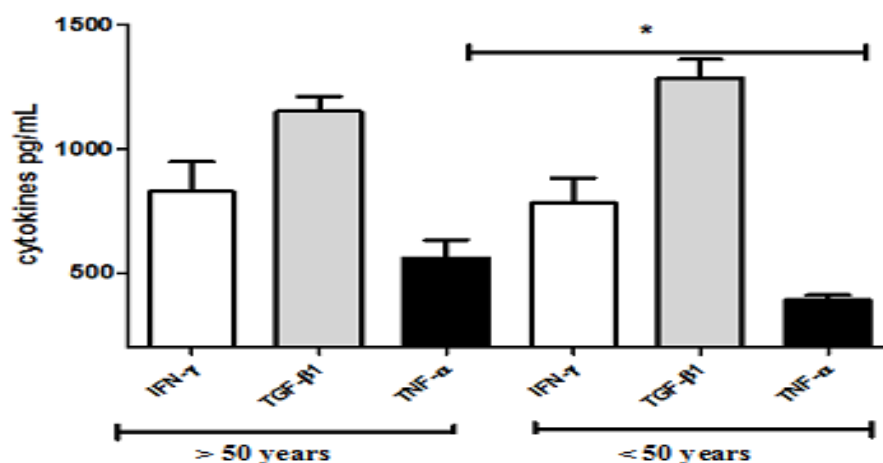


Figure 3. Cytokine levels according to age at diagnosis in multiple myeloma patients. Data are represented as mean with standard errors of the means. *Indicates significant statistical difference ($p < 0.05$) when comparing the levels of TNF- α between groups. IFN- γ : interferon-gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1; TNF- α : tumor necrosis factor- alpha

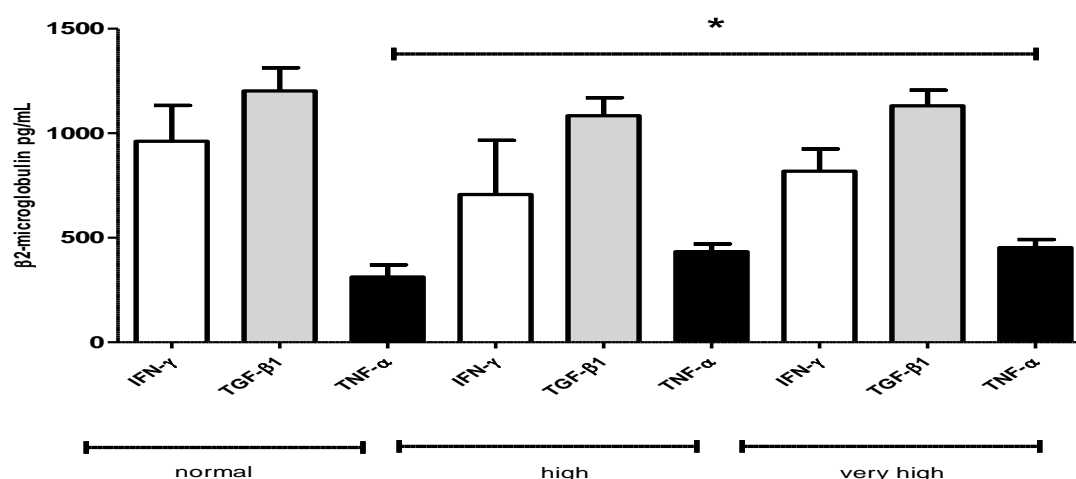


Figure 4. Comparative analyses of cytokine levels regarding β 2-microglobulin in multiple myeloma patients. Data are represented as mean with standard errors of the means. *Indicates significant statistical difference ($p < 0.05$) when comparing the levels of TNF- α between normal and very high β 2-microglobulin. TGF- β 1: transforming growth factor beta-1; TNF- α : tumor necrosis factor- alpha; IFN- γ : interferon-gamma.

Lastly, higher levels of IFN- γ were found in patients who achieved post-transplant very good partial response (VGPR) when compared to patients in complete response (CR) (990 ± 107.5 pg/mL versus 590.9 ± 88.49 pg/mL, $p = 0.01$) (Figure 5). Median IFN- γ levels also increased gradually, depending on loss of response depth, so patients with loss of response (CR to VGPR) and maintenance of response (CR and VGPR) presented IFN- γ with levels \geq than the baseline median (IFN- γ "high-expressors"),

respectively 1133 [809-1278] and 635 [469-1214] pg/mL. Those patients with improved post-transplant response (VGPR to CR), presented median IFN- γ levels 388 pg/mL [306-489] < than the baseline median of this cytokine being considered ("low-expressors" of IFN- γ), $p < 0.03$ (Figure 6).

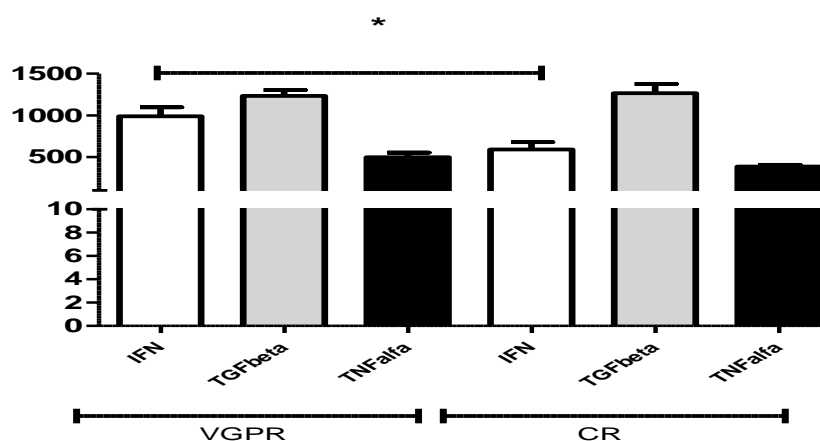


Figure 5. Comparative analyses of cytokine levels and response assessment in multiple myeloma patients.

Data are represented as mean with standard errors of the means. *Indicates significant statistical difference ($p < 0.05$) between levels of IFN- γ in patients who achieved post-transplant complete response (CR) with those with very good partial response (VGPR).

IFN- γ : interferon-gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1; TNF- α : tumor necrosis factor-alpha.

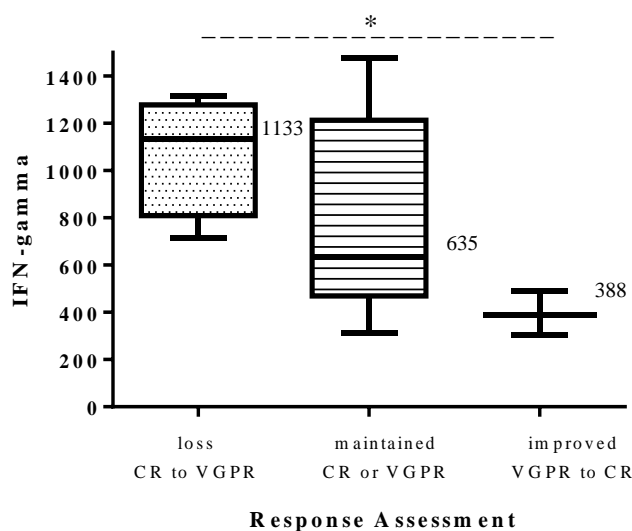


Figure 6. IFN- γ levels regarding pre and post-transplant response assessment.

Median IFN- γ levels increased gradually, depending on loss of response depth, so patients with loss of response (CR to VGPR) and maintenance of response (CR or VGPR) presented IFN- γ levels \geq than median baseline (≥ 635 pg/ml) were considered "high-expressors". Patients with improved response criteria (VGPR to CR) presented IFN- γ < 635 pg/ml, so "low-expressors" of IFN- γ . *Indicates significant statistical difference ($p < 0.05$).

IFN- γ : interferon-gamma; CR: complete response; VGPR: very good partial response.

Multivariate logistic regression, including age, β 2-microglobulin, IFN- γ , TGF- β 1 and CD34⁺cells/kg, were significant for relapse ($p=0.04$), β 2-microglobulin (coef. 0.71 and $p=0.04$) and CD34⁺/kg (coef. -1.31 and $p=0.04$) (Table 4). In another multivariate analysis of the impact of age, β 2-microglobulin, albumin, IFN- γ , TGF- β 1, TNF- α and CD34⁺cells/kg, the lower mobilized CD34⁺cells/kg was the only significant independent risk factor ($p = 0.01$) for death (overall survival-OS), with coefficient -2.68 and $p=0.04$ (Table 5).

Table 4. Impact of β 2-microglobulin and CD34⁺cells/kg on relapse.

Variable	Coefficient	Std. Error	<i>p</i> -value	Odds Ratio	95% CI
Age	0.06689	0.08638	0.4387	1.0692	0.9026 to 1.2664
β 2-microglobulin	0.7192	0.3652	0.0489	2.0528	1.0035 to 4.1992
IFN- γ	0.0004814	0.001405	0.7318	1.0005	0.9977 to 1.0032
TGF- β 1	-0.0005522	0.002540	0.8279	0.9994	0.9945 to 1.0044
CD34 ⁺ cells/kg	-1.3189	0.6498	0.0424	0.2674	0.0748 to 0.9558

Multivariate logistic regression analysis. CD34: cluster of differentiation 34; IFN- γ : interferon gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1, TNF- α : tumor necrosis factor alpha; Std: standard; CI: confidence intervals.

Table 5. Impact of CD34⁺cells/kg on death (overall survival).

Variable	Coefficient	Std. Error	<i>p</i> -value	Odds Ratio	95% CI
Age	-0.03064	0.1227	0.8028	0.9698	0.7625 to 1.2335
β 2-microglobulin	0.8652	0.4566	0.0581	2.3755	0.9707 to 5.8165
Albumin	-0.2587	1.5642	0.8687	0.7721	0.0360 to 16.5641
IFN- γ	0.0003150	0.002073	0.8792	1.0003	0.9963 to 1.0044
TGF- β 1	-0.0009105	0.003485	0.7939	0.9991	0.9923 to 1.0059
TNF- α	-0.001389	0.004850	0.7747	0.9986	0.9892 to 1.0082
CD34 ⁺ cells/kg	-2.6816	1.3364	0.0448	0.0685	0.0050 to 0.9395

Multivariate logistic regression analysis. CD34: cluster of differentiation 34; IFN- γ : interferon gamma; TGF- β 1: transforming growth factor beta-1, TNF- α : tumor necrosis factor alpha; Std: standard; CI: confidence intervals.

DISCUSSION

The pathogenesis of multiple myeloma involves the knowledge of complex conditions such as chromosomal alterations, genomic instability, epigenetic signals and biological events in the bone marrow microenvironment. In the marrow niche there is a bidirectional interaction between stromal cells and neoplastic cells through adhesion molecules, secretion of cytokines, chemokines and other soluble factors resulting in myeloma growth, progression and dissemination, as well as osteoclastogenesis and/or angiogenesis.^{13,14} Therefore, it is pertinent to search for inflammatory mediators as biomarkers that may help the diagnosis and prognosis of disease.^{11,15}

In our study, among the cytokines studied in leukapheresis product, the major and most attractive finding was related to IFN- γ level that showed a significant correlation with post-transplant response assessment. So, IFN- γ level may be predictive of loss of response, allowing early post-transplantation management such as consolidation and maintenance, although it was not related to overall or progression-free survival. In 1994, Palumbo et al reported a case showing the reduction of the M component after 6 months of use recombinant IFN- γ in a patient with MM and maintenance of the M component for 16 months of follow-up, besides bone resorption's inhibition. So, this study suggested a strong anti-myeloma and anti-osteolytic effect of IFN- γ *in vivo*.²⁵ Significant result between CR x VGPR and IFN- γ in our study is probably explained, because in the complete response achievement the M-component is not measurable, while in very good partial response (VGPR) M-paraprotein is detectable in immunoelectrophoresis/immunofixation (IF). Only 5/27 patients (18.5%) presented partial response (PR) before or after HSCT and 3 of these patients expressed IFN- γ above the median and only 2 were "low IFN- γ expressors". The result should not have been significant between VGPR x PR (partial response) and IFN- γ because free light chain (FLC) monoclonal component was not evaluated only the intact immunoglobulins (serum or urinary protein electrophoresis (SPE or UPE/ IF) and both low IFN- γ expressors in PR group (2/5) had subtype of multiple myeloma with associated kappa monoclonal component. In MM, Th1, Th17 and Th22 cells are involved in the pathophysiology of autoimmunity and tumorigenesis with IFN- γ production^{17,18} and despite the antitumor activity of IFN- γ , cancer cells have several mechanisms of escape from the anticancer signaling of this cytokine.²⁶ Tumors can escape from immunovigilance by expressing molecules that inhibit antitumor immune response,

such as overexpressed PD-L1 (programmed cell death ligand-1) driven by IFN- γ in MM.²⁷ T cells from MM patients have a higher proportion of PD-1 (programmed cell death protein-1) and produce IFN- γ , stimulating the PD-L1 of myeloma cells with dysregulation of T cell effector function and tumor escape. In advanced MM disease (refractory/relapse), the level of PD-1 expression is higher and is related to poor treatment response.¹³ Use of PD-L1 inhibitor (anti-PD-L1) in MM as a single agent is still limited, but therapeutic combinations with novel agents have been studied as possible effective strategies,²⁷ such as the study by Görgün *et al* (2015) that provided the framework for targeting PD-1 and PD-L1 in combination with lenalidomide to inhibit tumor growth and restore immune function in MM.²⁸ So, strategies aiming to modulate immunological targets in hematologic malignancies seem to be promising in MM treatment²⁹ and the results found in our study suggests the early use of new drugs that involve IFN- γ in its mechanism of action in post-transplant, before the loss of response depth to treatment.

Another interleukin studied was TNF- α , an inflammatory cytokine with a broad spectrum of biological activity, including function of differentiation and transformation of B lymphocyte into bone marrow microenvironment and also can induce apoptosis of cells of MM²⁰. In this study, the highest level of TNF- α in leukapheresis product was found in patients with MM > 50 years, as well as in the genotype study of Martino and colleagues (2012) who demonstrated age (> 60 years) interaction with TNF- α genotype r1800629 and significant association with progression-free survival. Thus, this finding corroborates the hypothesis that genetic variation in inflammatory cytokines may be a mediator of the interrelation between aging and cancer.³⁰ The highest level of TNF- α has also been observed in patients with very high β 2-microglobulin *versus* normal β 2-microglobulin. In agreement with other authors, as well as β 2-microglobulin, TNF- α is a cytokine of great significance as a tumor burden parameter and can be used for monitoring response to treatment.¹⁹ Studies of Lemancewicz *et al.* (2013) and Hengelveld *et al.* (2015) evaluating TNF- α domains such as BAFF (B-cell activating factor) and APRIL (proliferation-inducing ligand) showed an inverse correlation of serum levels with progression-free and global survival and some type of response to treatment, but Abdelgawad *et al.* (2016) demonstrated that patients had improved overall survival with high levels of BAFF.^{20,31,32} Although TNF- α acts directly on the medullary microenvironment and the analysis of this cytokine in the bone marrow has been related to prognosis and response to MM treatment,^{33,34} in our study, the TNF- α level did not

correlate with post-transplant response depth with post-transplant outcomes (relapse or death). These results may be justified by heterogeneous pre-transplant treatment received and by the fact that TNF- α domains have not been evaluated.^{20, 31-34}

TGF- β 1 was also evaluated, considering that impairs hematopoiesis by acting on the hematopoietic progenitors and mesenchymal cells of the stroma, increases the activity of osteolytic lesions and the survival of osteoclasts.³⁵ In this study, the impact of TGF- β 1 on hematopoietic progenitors was confirmed, with a very significant inverse correlation between CD34⁺cells/Kg. TGF- β 1 is present in bone marrow microenvironment and downregulates chemokine stromal cell-derived factor-1, chemokine responsible for adhesion and mobility (migration) of stem cells (CD34⁺ cells) then decreased TGF- β 1 results in a better mobilization of hematopoietic stem cells to peripheral blood.³⁶ In the same way, increased TGF- β 1 is a crucial component for the development of myelofibrosis.³⁷ Several studies have demonstrated a higher level of TGF- β 1 in patients with MM than in healthy volunteers and decreased levels with disease duration and treatment.^{38,39} In our study, there was no correlation of TGF- β 1 and treatment, even though most patients (18/27) received more than 4 cycles of induction probably explained by the heterogeneity of pre-HSCT therapy. As well as TNF- α , TGF- β 1 levels in leukapheresis' product had no correlation with the post-transplant clinical outcome (response assessment, overall or progression-free survival).

In multivariate logistic regression, including age, β 2-microglobulin, IFN- γ , TGF- β 1 and CD34⁺cells/kg, only β 2-microglobulin and CD34⁺cells/kg were significant for relapse, so the cytokines evaluated did not affect progression free survival (PFS). Another multivariate analysis, including the same variables above, showed that CD34⁺cells/kg were an independent risk factor for death (overall survival – OS). These results indicated that the worst mobilization (lower CD34⁺cells/kg) is associated with more aggressive disease biology and consequently worsen survival outcomes, confirming previous studies.^{40,41}

Some limitations should be considered in our study. This is a retrospective cross-sectional study in a developing country and patients were referred to bone marrow unit from different oncohaematological centers. Socio-economic unavailability in our country implies limiting the performance of sensitive diagnostic assays and cytogenetic response evaluation. Therefore, patients were not stratified according to the R-ISS that contemplates cytogenetic analysis and accurate response

assessment – stringent complete response that adopts free light chain and minimal residual disease by flow cytometry. Heterogeneity of current therapies during myeloma induction and unavailability of novel agents, such as bortezomib, may have caused an impact on the clinical outcome after transplantation and non-significant correlation with analyzed cytokines. The most important result of this study, correlating IFN- γ level with post-transplant response assessment was performed in all 27 patients, but a small number of patients were categorized into each response evaluation: loss, maintenance or improvement. Consequently, larger studies must be performed to confirm this result.

CONCLUSION

Correlation of IFN- γ in leukapheresis' product with the loss of post-transplant depth of response suggests that IFN- γ may be a relevant biomarker allowing early management after transplantation with target therapy.

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2011; 364:1046-1060.
2. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2016; 17: e328-46
3. Greipp PR, San Miguel, J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin. Oncol*. 2005; 23 (15): 3412-20.
4. Barlogie B, Bolejack V, SchellM and Crowley J. Prognostic factor analysis of myeloma survival with intergroup trial S9321 (INT0141): Examining whether different variables govern different time segments of survival. *Ann Hematol*. 2011; 90 (4): 423-8.7
5. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revise International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin. Oncol*. 2015; 33(26): 2863-9.
6. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutierrez NC, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2012; 97(8): 1272-7.
7. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, et al. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol*. 2010; 85: 114-9
8. Rajkumar SV. Multiple Myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2016; 91: 720-34.
9. Niels WCJ, Donk V, Sonneveld P. Diagnosis and Risk Stratification in Multiple Myeloma. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2014; 28:791-813.
10. Jimenez-Zepeda VH, Duggan P, Neri P, Rshid-Kolvear F, Tay J, et al. Revised International Staging System Applied to Real World Multiple Myeloma Patients. *Clinical Lymphoma, Myelolma & Leukemia*. 2016; 16: 511-18
11. Cao Y, Luetkens T, Kobold S, Hildebrand Y, Gordic M et al. The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients. *Experimental Hematol*. 2010; 38: 860-7.
12. Bianchi G, Munshi, NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015; 125: 3040-58.
13. Bianchi G, Anderson KC. Understanding Biology to Tackle the Disease: Multiple Myeloma from Bench to Bedside, and Back. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64: 423-44.
14. Mondello P, Cuzzocrea S, Navarra M and Mian M. Bone marrow microenvironment is a crucial player for myelomagenesis and disease progression. *Oncotarget*. 2017; 8: 20394-20409.
15. Sengar M, Jain H. Multiple Myeloma pathogenesis: Blame it on the microenviroment. *J Postgrad Med*. 2014; 60 (2): 159.
16. Mosevoll KA, Akkok CA, Hervig T, Melve GK, Bruserud O, Reikvam H. Stem cell mobilization and harvesting by leukapheresis alters systemic cytokine levels in patients with multiple myeloma. *Cytotherapy*. 2013; 15: 850-60.

17. Lullo GD, Marcatti M, Heltai S, Brunetto E, Tresoldi C, et al. Th22 cells increase in poor prognosis multiple myeloma and promote tumor cell growth and survival. *Oncimmunology*. 2015; 4: 5, e1005460.
18. Wang M, Chen P, Jia Y, He N, Li D, et al. Elevated Th22 as well as Th17 cells associated with therapeutic outcome and clinical stage are potential targets in patients with multiple myeloma. *Oncotarget*. 2015; 6 (20): 17958-67.
19. Jurisic, V and Colovic, M. Correlation of Sera TNF- α with Percentage of Bone Marrow Plasma Cells, LDH, β 2- Microglobulin, and Clinical Stage in Multiple Myeloma. *Medical Oncology*. 2002; 19:133-9
20. Lemancewicz, D, Bolkun L, Jablonska E, Kulczynska A, Bolkun-Skornicka, U, et al. Evaluation of TNF superfamily molecules in multiple myeloma patients: Correlation with biological and clinical features. *Leukemia Research*. 2013; 37: 1089-93.
21. Smith D, Yong K. Advances in understanding prognosis in myeloma. *BMJ*. 2016; 175: 367-380.
22. Giralt S et al. American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 December; 21: 2039–51.
23. Szmigielska-Kaplon A, Krawczynska A, Czemerska M, Pluta A, Cebula –Obrzut B et al. The kinetics of hematopoietic niche cytokines and their influence on mobilization efficacy and timing in patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Apheresis*. 2015; 30: 247-251.
24. Bozdag SM and Ilhan O. Peripheral blood stem cell mobilization and collection from elderly patients and elderly healthy donor. *Transfusion and Apheresis Science*. 2015; 53: 8-12
25. Palumbo A, Bruno B, Triolo S, Boccadoro M and Pileri A. Recombinant Interferon- γ in a Patient with Multiple Myeloma. *European Journal of Cancer*. 1994; 30A: 1731.
26. Lin AF, Lin CM, Lee KY, Wu SY, Feng PH, et al. Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis. *Journal of Biomedical Science*. 2017; 24:1-9.
27. Rosenblatt J and Avigan D. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality? *Blood*. 2017, 129; 275-279
28. Görgün G, Samur MK, Cowens KB, Paula S, Bianchi G, et al. Lenalidomide Enhances Immune Checkpoint Blockade Immune Response in Multiple Myeloma. *Clin. Cancer Res*. 2015; 21 (20):4607-4619.
29. Piankon MJ, Liu Y, Bagchi S and Lesokhin AM. Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies. *Stem Cell Investigation*. 2017, 4: 32-53.
30. Martino, A, Buda G, Maggini, V, Lapi F, Lupia A, et al. Could age modify the effect of genetic variants in IL6 and TNF- α genes in multiple myeloma? *Leukemia Research*. 2012;36: 594-597
31. Hengeveld PJ and Kersten MJ. B-cell activating factor in pathophysiology of multiple myeloma: a target for therapy? *Blood Cancer Journal*. 2015, 5: 1-7.

32. Abdelgawad IA, Radwan NH, Shafik RE and Shokralla HA. Significance of Some Proliferation Markers and Some Prognostic Factors in Patients with Multiple Myeloma and their Impact on the Patient's Survival. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2016; 17: 2389-94.
33. Kuku I, Bayraktar MR, Kaya, E, Ekrut MA, Bayraktar N, *et al.* Serum Proinflammatory Mediators at Different Periods of Therapy in Patients with Multiple Myeloma. *Mediators of Inflammation*. 2005; 3:171-4.
34. Alexandrakis MG, Roussou P, Pappa CA, Messaritakis I, Xekalou A, *et al.* Relationship between Circulating BAFF Serum Levels with Proliferating Markers in Patients with Multiple Myeloma. *Biomed Research International*. 2013:1-6.
35. Wang, XS, Shi Q, Williams, LA, Shah ND, Mendonza, TR, *et al.* Longitudinal Analysis of Patient-Reported Symptoms Post-AuSCT and their Relationship to Inflammation in Patients with Multiple Myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2015; 56: 1335-41.
36. Wright, N, Lera TL, Garcia-Moruja, C, Lillo R, Garcia-Sanchez F, *et al.* Transforming Growth Factor- β 1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion. *Blood*. 2003; 102:1978-84.
37. Blank, U and Karlsson, S. TGF- β signalling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2015; 125: 3542-50.
38. Aref, S, Azmy, E and El-Gilany AH. Upregulation of CD200 is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2017; 35: 51-7
39. Giannopoulos K, Kaminska W, Hus I and Dmoszynska A. The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterization of immune status in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2012; 106: 546-52.
40. Brioli A, Perrone G, Patriarca F, Pezzi A, Nobile F, *et al.* Successful mobilization of PBSCs predicts favorable outcomes in multiple myeloma patients treated with novel agents and autologous transplantation. *Bone Marrow Transplantation*. 2015; 50:673-678.
41. Moreb JS, Byrne M, Shugarman I, Zou F, Xiong S, *et al.* Poor peripheral blood stem cell mobilization affects long-term outcomes in multiple myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *J Clin Apher*. 2017, 1-9.

6 CONCLUSÃO

Dentre as interleucinas avaliadas em nosso estudo, TNF- α , TGF- β 1 e IFN- γ , o IFN- γ teve a maior variabilidade nos níveis no produto de leucoaférese. Houve uma correlação inversa muito significativa entre a mobilização de células-tronco e TGF- β . Níveis de TNF- α foram relacionados à idade e β 2-microglobulina, sendo significativamente maiores em pacientes ≥ 50 anos versus pacientes < 50 anos e em pacientes β 2-microglobulina com muito elevada ($>5,5$ ng/mL) versus pacientes com β 2-microglobulina normal. Não houve correlação significativa de nenhuma citocina avaliada com as sobrevidas livre de progressão (recaída) ou global (óbito). Um importante resultado do nosso estudo foi a correlação do aumento dos níveis de IFN- γ no produto de aférese com a perda de resposta pós-transplante, sugerindo-se que esta citocina possa ser um importante biomarcador com possibilidade de intensificação terapêutica alvo específica, precocemente. No entanto, recomenda-se que estudos maiores sejam realizados para confirmação desse resultado, já que a dificuldade sócio-econômica no nosso país, implica na limitação da realização de exames diagnósticos que permitam a avaliação de resposta terapêutica mais profunda, bem como o acesso aos novos agentes de tratamento para a maioria dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS

1. Palumbo A, Anderson K. **Multiple Myeloma**. *N Engl J Med*. 2011; **364**:1046-1060.
2. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Landgren O, Moreau P, et al. **International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual assessment in multiple myeloma**. *Lancet Oncol*. 2016; **17**: e328-46
3. Greipp PR, San Miguel, J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. **International staging system for multiple myeloma**. *J Clin. Oncol*. 2005; **23**: 3412-20.
4. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. **Revise International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group**. *J Clin. Oncol*. 2015; **33**: 2863-9.
5. Barlogie B, Bolejack V, SchellIM and Crowley J. **Prognostic factor analysis of myeloma survival with intergroup trial S9321 (INT0141): Examining whether different variables govern different time segments of survival**. *Ann Hematol*. 2011; **90**: 423-8.
6. Ross FM, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutierrez NC, Liebisch P, O`Connor S, et al. **Report from European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders**. *Haematologica*. 2012; **97**: 1272-7.
7. Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, et al. **High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international staging system even in the era of novel agents**. *Eur J Haematol*. 2010; **85**: 114-9.
8. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. **International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review**. *Leukemia* 2009; **23**: 2210-21.
9. Rajkumar SV. **Multiple Myeloma: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management**. *Am J Hematol*. 2016; **91**: 720-34.
10. Niels WCJ, Donk V, Sonneveld P. **Diagnosis and Risk Stratification in Multiple Myeloma**. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2014; **28**:791-813.

11. Jimenez-Zepeda VH, Duggan P, Neri P, Rshid-Kolvear F, Tay J, et al. **Revised International Staging System Applied to Real World Multiple Myeloma Patients.** *Clinical Lymphoma, Myelolma & Leukemia.* 2016; **16**: 511-18
12. Cao Y, Luetkens T, Kobold S, Hildebrand Y, Gordic M, et al. **The cytokine/chemokine pattern in the bone marrow environment of multiple myeloma patients.** *Experimental Hematol.* 2010; **38**: 860-7.
13. Bianchi G, Munshi, NC. **Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma.** *Blood.* 2015; **125**: 3040-58.
14. Bianchi G, Anderson KC. **Understanding Biology to Tackle the Disease: Multiple Myeloma from Bench to Bedside, and Back.** *CA Cancer J Clin.* 2014; **64**: 423-44.
15. Mondello P, Cuzzocrea S, Navarra M and Mian M. **Bone marrow microenvironment is a crucial player for myelomagenesis and disease progression.** *Oncotarget.* 2017; **8**: 20394-20409.
16. Sengar M, Jain H. **Multiple Myeloma pathogenesis: Blame it on the microenviroment.** *J Postgrad Med.* 2014; **60**: 159.
17. Mosevoll KA, Akkok CA, Hervig T, Melve GK, Bruserud O, Reikvam H. **Stem cell mobilization and harvesting by leukapheresis alters systemic cytokine levels in patients with multiple myeloma.** *Cytotherapy.* 2013; **15**: 850-60.
18. Jurisic, V and Colovic, M. **Correlation of Sera TNF- α with Percentage of Bone Marrow Plasma Cells, LDH, β 2- Microglobulin, and Clinical Stage in Multiple Myeloma.** *Medical Oncology.* 2002; **19**:133-9.
19. Landgren O, Weiss BM. **Patterns of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma in various ethnic/racial groups: Support for genetic factor in pathogenesis.** *Leukemia* 2009; **23**:1691-7.
20. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, et al. **Review of 1027 patiens with newly diagnosed multiple myeloma.** *Mayo Clin Proc.* 2003; **78**:21-33.
21. Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L, 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; **93**:791-2.

22. Morgan, GJ, Walker, BA, Davies FE. **The genetic architecture of multiple myeloma.** *Nature Reviews Cancer.* 2012; **12**: 335-48.
23. Genadieva-Stavric S, Cavallo F, Palumbo, A. **New approaches to Management of Multiple Myeloma.** *Current Treatment Options in Oncology.* 2014; **15**: 157-70.
24. Mahindra A, Hideshima T, Anderson KC. **Multiple myeloma: biology of the disease.** *Blood Reviews.* 2010; **24 Suppl.1**: S5-S11.
25. Furukawa Y, Kikuchi J. **Molecular pathogenesis of multiple myeloma.** *Int J Clin Oncol.* 2015; **20**:413-22.
26. Lawasut P, Groen RW, Dhimolea E, Richardson PG, Anderson KC, et al. **Decoding the pathophysiology and the genetics of multiple myeloma to identify new therapeutic targets.** *Semin Oncol.* 2013; **40**: 537-48.
27. Fairfield H, Falank C, Avery, L, Reagan MR. **Multiple Myeloma in the marrow: pathogenesis and treatments.** *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2016; **1364**: 32-51.
28. Raja KR, Kovarova L, HajeK R. **Review of phenotypic markers used in flow cytometric analysis of MGUS and MM, and applicability of flow cytometry in other plasma cell disorders.** *Br J Hematol.* 2010; **129**: 334-51.
29. Kuehl, WM, Bergsagel PL. **Molecular Pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor.** *J Clin Invest.* 2012; **122**: 3456-63.
30. Bommert K, Bargou RC, Stühmer T. **Signalling and survival pathways in multiple myeloma.** *European Journal of Cancer* 2006; **42**:1574-80.
31. Ramakrishnann V, D' Souza A. **Signalling pathways and Emerging Therapies in Multiple Myeloma.** *Curr. Hematol Malig. Rep.* 2016; **11**:156-64.
32. Palumbo A, Rajkmar SV. **Treatment of newly diagnosed myeloma.** *Leukemia.* 2009; **23**: 449-456.
33. Mehtap O, Atesoglu EB, Tarkun P, Hacihanefioglu A, Dolasik I and Musul MM. **IL-21 and other serum proinflammatory cytokine levels in patient with multiple myeloma at diagnosis.** *J Postgrad Med.* 2014; **60**: 141-44.
34. Kuku I, Bayraktar MR, Kaya, E, Ekrut MA, Bayraktar N, et al. **Serum Proinflammatory Mediators at Different Periods of Therapy in Patients with Multiple Myeloma.** *Mediators of Inflammation.* 2005; **3**:171-4.

35. Pisa, P, Stenke, L, Bernell, P, Hansson, M and Hast, R. **Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in serum of multiple myeloma patients.** *Anticancer Res.* 1990; **10**: 817-20.
36. Usnarka-Zubkiewicz, L. **Level of interleukin-6 (IL-6), soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R) and tumor necrosis factor alpha (TNF-Alpha) in untreated and progressing multiple myeloma.** *Pol. Arch. Med Wewn.* 1998; **1**: 30-37.
37. Basmaci C, Pehlivan M, Tomatir AG, Sever T, Okan V, 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**:1009-1014.
38. Kline M, Donovan K, Wellik L, Lust C, Jin W, et al. **Cytokine and chemokine profiles in multiple myeloma: significance of stromal interaction and correlation of IL-8 production with disease progression.** *Leukemia Research.* 2007; **31**: 591-598.
39. Costanza B, Umelo IA, Bellier J, Castonovo V and Turtoi A. **Stromal Modulators of TGF- β in Câncer.** *J Clin Med.* 2017; **6**:1-25.
40. Wright, N, Lera TL, Garcia-Moruja, C, Lillo R, Garcia-Sanchez F, et al. **Transforming Growth Factor- β 1 down-regulates expression of chemokine stromal cell-derived factor-1: functional consequences in cell migration and adhesion.** *Blood.* 2003; **102**:1978-84.
41. Blank, U and Karlsson, S. **TGF- β signalling in the control of hematopoietic stem cells.** *Blood.* 2015; **125**: 3542-50.
42. Lin AF, Lin CM, Lee KY, Wu SY, Feng PH, et al. **Escape from IFN- γ -dependent immunosurveillance in tumorigenesis.** *Journal of Biomedical Science.* 2017; **24**:1-9.
43. Giannopoulos K, Kaminska W, Hus I and Dmoszynska A. **The frequency of T regulatory cells modulates the survival of multiple myeloma patients: detailed characterization of immune status in multiple myeloma.** *Br J Cancer.* 2012; **106**: 546-52.
44. Palumbo A, Bruno B, Triolo S, Boccadoro M and Pileri A. **Recombinant Interferon- γ in a Patient with Multiple Myeloma.** *European Journal of Cancer.*1994; **30A**: 1731.

45. International Myeloma Working Group. **Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group.** *Br J Haematol.* 2003; **121**:749–757.
46. Garderet L, D´Souza A, Jacobs J, Biezen A, Schönland S, et al. **Response Assessment in Myeloma: Practical Manual on Consistent Reporting in an Era of Dramatic Therapeutic Advances.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017; **23**: 1193-1202.
47. Durie BG, Salmon SE. **A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival.** *Cancer* 1975; **36**:842–854.
48. Chesi, M, Bergsagel, PL. **Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates.** *International Journal of Hematology* 2013; **97**: 313-23.
49. Moreau, P, Attal M, Garban F, Hulin C, Facon T, et al. **Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials.** *Leukemia.* 2007; **21**: 2020-4.
50. Avet-Louiseau H, Leleu X, Roussel M, Moreau P , Guerin–Charbonnel, C, et al. **Bortezomib plus Dexamethasone induction improves outcome of patients with t(4;14) myeloma but not outcome of patients with del (17 p).** *Journal of Clinical Oncology.* 2010; **28**: 4630-4.
51. Cavo, M, Pantani I, Petrucci MT, Patriarca F, Zamagni E, et al. **Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnoses multiple myeloma.** *Blood.* 2012; **120**: 9-19.
52. Mikhael JR, Dingle D, Roy V, et al. **Management of newly diagnose symptomatic multiple myeloma: Update mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (msmart) consensus guidelines.** *Mayo Clin Proc.* 2013; **88**: 360-76.

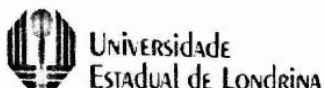
53. Greipp PR, Leong T, Bennett JM, Gaillard JP, Klein B, Stewart JA, et al. **Plasmablastic morphology--an independent prognostic factor with clinical and laboratory correlates: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) myeloma trial E9486 report by the ECOG Myeloma Laboratory Group.** *Blood.* 1998; **91**:2501-7.
54. Pich A, Chiusa L, Marmont F, Navone R. **Risk groups of myeloma patients by histologic pattern and proliferative activity.** *Am J Surg Pathol.* 1997; **21**: 339-347.
55. Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA. **Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma.** *Blood.* 1993; **81**:3382-7.
56. García-Sanz R, González-Fraile MI, Mateo G, Hernández JM, López-Berges MC, de las Heras N, et al. **Proliferative activity of plasma cells is the most relevant prognostic factor in elderly multiple myeloma patients.** *Int J Cancer.* 2004; **12**: 884-9.
57. Kim MK, Suh C, Lee DH, et al. **Immunoglobulin D multiple myeloma: response to therapy, survival, and prognostic factors in 75 patients.** *Ann Oncol* 2011; **22**: 411–6.
58. Usmani SZ, Heuck C, Mitchell A, et al. **Extramedullary disease portends poor prognosis in multiple myeloma and is over-represented in high-risk disease even in the era of novel agents.** *Haematologica* 2012; **97**: 1761–7.
59. Blade J, de Larrea CF, Rosinol L. **Extramedullary involvement in multiple myeloma.** *Haematologica* 2012; **97**: 1618–9
60. Scheid C, Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, et al. **Bortezomib before and after autologous stem cell transplantation overcomes the negative prognostic impact of renal impairment in newly diagnosed multiple myeloma: a Subgroup Analysis From the HOVON-65/GMMG-HD4 Trial.** *Haematologica* 2014; **99**: 148–54.
61. Niels WCJ, Donk V, Sonneveld P. **Diagnosis and Risk Stratification in Multiple Myeloma.** *Hematol Oncol Clin N Am.* 2014; **28**:791-813.
62. Durie BGM, Harousseau I-L, Miguel IS, Bladé I, Barlogie B, et al. **International uniform response for multiple myeloma.** *Leukemia* 2006; **20**: 1467-73.

63. Harousseau JL, Moreau P. **Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma.** *N Engl J Med.* 2009; **360**: 2645-54.
64. Stewart AK, Richardson PG, San-Miguel JF. **How I treat multiple myeloma in younger patients.** *Blood.* 2009; **114**: 436-43.
65. Kyle RA, Kajkumar SV. **An overview of the progress in the treatment of multiple myeloma.** *Expert Rev Hematol.* 2014; **7**: 5-7.
66. Moreau P, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Attal M. **Current trends in autologous stem-cell transplantation for myeloma in the era of novel therapies.** *J Clin Oncol.* 2001; **29**: 1898-906.
67. Van de Velde HJK, Liu x, Chen G, et al. **Complete response correlate with long-term survival and progression-free survival in high-dose therapy in multiple myeloma.** *Haematologica.* 2007; **92**: 1399-406.
68. Botta A, Di Martino MT, Ciliberto D, Cucè M, Correale P, et al. **A gene expression inflammatory signature specifically predicts multiple myeloma evolution and patients survival.** *Blood Cancer Journal,* 2016; **6**: e511.
69. Mohty M, Richardson PG, McCarthy PL, Attal M. **Consolidation and maintenance therapy for multiple myeloma after autologous transplantation; where do we stand?** *Bone Marrow Transplantation.* 2015; **50**
70. Szmigielska-Kaplon A, Krawczynska A, Czemerska M, Pluta A, Cebula–Obrzut B et al. **The kinetics of hematopoietic niche cytokines and their influence on mobilization efficacy and timing in patients with hematological malignancies.** *Journal of Clinical Apheresis.* 2015; **30**: 247-51.
71. Smith D, Yong K. **Advances in understanding prognosis in myeloma.** *BMJ.* 2016; **175**: 367-80.
72. Giralt S et al. **American Society of Blood and Marrow Transplantation, European Society of Blood and Marrow Transplantation, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, and International Myeloma Working Group Consensus Conference on Salvage Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Relapsed Multiple Myeloma.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 December; **21**: 2039–51.

8 ANEXOS

ANEXO A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Coleta de Células-Tronco Hematopoiéticas

**TERMO DE CONSENTIMENTO PARA COLETA DE CTHP**

Eu, _____, fui encaminhado (a) à Unidade de Transplante de Medula Óssea para orientações sobre este procedimento pelo Dr (a) _____.

As células-tronco hematopoiéticas (CD34+) são as células responsáveis pela produção de todo o sangue no organismo humano e estão presentes em maior números na medula óssea. Para que possamos coletar estas células a partir do sangue periférico (que corre nos vasos sanguíneos), é necessária a realização da mobilização dessas células através do uso de fatores de crescimento (GCSF – Filgrastima subcutânea) isoladamente ou associado a uma curta quimioterapia. Os fatores de crescimento podem causar dor óssea, hiperleucocitose (raramente com complicações) e raramente reação alérgica, prontamente revertidos com medicação. Através da monitorização por hemograma, define-se o momento ideal para a coleta.

A triagem clínica do doador/paciente é sigilosa; entretanto, informações médicas sobre a minha saúde precisarão ser compartilhadas com o serviço onde será realizado o transplante, uma vez que essas informações são importantes para a realização do mesmo. A realização de exames sorológicos faz parte da triagem laboratorial, conforme legislação vigente (hepatite B e C, Chagas, sífilis, HIV e HTLV I e II). Se houver alguma anormalidade nos exames sorológicos, será feita convocação para consulta médica para orientação e confirmação do resultado. Resultado positivo de um exame sorológico, não significa que você esteja doente, mas pode adiar ou contraindicar a coleta de células-tronco.

A coleta de células-tronco periféricas é realizada via ambulatorial, através de um equipamento de separação dos componentes do sangue, chamada máquina de aférese. Esse equipamento é capaz de selecionar apenas as células brancas (onde se encontram as células-tronco) do sangue, devolvendo todo restante do sangue ao paciente. A duração do procedimento é de aproximadamente 4 horas. O número de procedimentos (aféreses – no máximo três) será determinado até que número de células/CD34 seja atingido. Raramente ocorrem complicações relacionadas ao procedimento de aférese: hipocalcemia transitória pelo uso de ACD-A (anticoagulante) com tremores, formigamento de extremidades e



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



raramente cãibras; hematoma de punção, quando se utiliza acesso venoso periférico; náuseas e vômitos. Todos estes sintomas e complicações são revertidos prontamente.

O procedimento de aférese é realizado por punção de duas (2) veias periféricas calibrosas, quando disponíveis, e; caso não haja acesso venoso adequado, será necessária a implantação de um cateter antes do procedimento. A passagem do cateter é realizada por profissional habilitado e experiente; raramente está acompanhada de algumas complicações como acidentes de punção, trombose e infecção, revertidas prontamente em ambiente hospitalar.

As células-tronco periféricas são congeladas e armazenadas para uso autólogo exclusivo e sua viabilidade é assegurada por dois anos. Após este período, a viabilidade celular deverá ser avaliada para definir a utilização ou não das células. As células poderão ser descartadas, se forem consideradas impróprias para uso.

Estou ciente e concordo que todos os dados gerados referentes à triagem clínica, aos exames laboratoriais, ao procedimento de mobilização, ao procedimento de coleta, incluindo os dados de intercorrências clínicas e técnicas. Entendo que os dados do controle de qualidade dos hemocomponentes são registrados e conservados em banco de dados; após análise, esses dados podem ser objeto de divulgação com interesse científico.

Eu, _____, autorizo a coleta e o congelamento das minhas células-tronco hematopoiéticas para transplante autólogo.

PACIENTE

LOCAL / DATA

MÉDICO/CRM

TESTEMUNHA

ANEXO B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas

UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINAHOSPITAL UNIVERSITÁRIO REGIONAL
DO NORTE DO PARANÁ**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
TRANSPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS
PERIFÉRICAS**

O transplante autólogo, autogênico ou autotransplante (para si próprio) de células-tronco periféricas é um recurso terapêutico que consiste na administração de quimioterapia em altas doses. Muito utilizado em várias doenças, entre elas: linfoma de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin quimiossensíveis, tumores sólidos quimiossensíveis (tumor de células germinativas e neuroblastoma) e mieloma múltiplo. A chance de cura para os pacientes com linfoma e tumores sólidos submetidos ao transplante é variável, a depender do tipo da doença de base, da resposta ao tratamento quimioterápico anterior e das condições clínicas do doente. Nos pacientes com mieloma múltiplo, tanto a quimioterapia quanto o transplante não são curativos, porém o transplante oferece uma vantagem em relação à sobrevida e qualidade de vida. A principal causa de insucesso do transplante autólogo é a recaída da doença de base. A taxa de mortalidade relacionada ao transplante (TRM) é descrita na literatura como até 5%, podendo ser maior conforme comorbidades dos pacientes.

A quimioterapia em alta dose é específica para cada tipo de doença e tem como objetivo reduzir/eliminar as células malignas residuais e criar espaço na medula óssea. A quimioterapia e todas as medicações serão administradas através de um cateter de duplo lúmen, ou seja, com duas vias, o qual será passado por um cirurgião habilitado, proporcionando um adequado acesso vascular. A implantação do cateter envolve riscos, tais como: hematoma, hemotórax, pneumotórax e embolia; e outros riscos como flebite, infecção, obstrução e trombose. O risco de vida associado à passagem de cateter é mínimo, porém existente.

A manipulação do cateter é de uso exclusivo da enfermagem. O paciente deve informar à equipe de enfermagem suas queixas, assim como ingestão hídrica e da dieta, o volume de diurese, número de evacuações e consistência das mesmas para balanço hídrico.

Os remédios (quimioterápicos) utilizados no transplante de células-tronco periféricas, fazem parte do período anterior à infusão da medula óssea que chamamos de condicionamento. Os remédios do condicionamento podem causar diversos riscos ao paciente, e esses riscos variam de paciente para paciente e são maiores para os pacientes que receberam muita quimioterapia antes do transplante. Cada paciente reage ao tratamento de forma diferente. Os efeitos colaterais mais comuns são: - Perda do cabelo (100% dos pacientes) e pêlos do corpo. O cabelo demora para crescer novamente, pode nascer com cor e textura diferente do que tinha antes e podem crescer ralo e fino;



- Náusea e vômito;
- Feridas na boca e diarreia;
- Sangramentos geralmente em pele e mucosas, mas podem ocorrer em locais perigosos como coração, bexiga, pulmões, cérebro, sendo necessárias transfusões de sangue e plaquetas
- Diminuição da imunidade (defesa), com aparecimento de infecções (manifestado por febre) que são tratadas com antibióticos e anti-fúngicos
- Esterilidade: não poder ter filhos ou transmitir algum defeito genético
- Problemas em diversos órgãos como coração, rins, cérebro, fígado e pulmões;
- Pele: escurecimento é comum, assim como reações alérgicas;
- Recaída da doença pode acontecer, mesmo com o transplante;
- Efeitos a longo prazo: problemas da glândula da tireóide, catarata e raramente aparecimento de um novo tumor.

O dia seguinte, após receber toda quimioterapia, é o dia de descanso para que todos os remédios sejam eliminados pelo organismo e não prejudiquem a nova medula (células-tronco).

No dia da infusão das células-tronco periféricas, ou seja, no dia do transplante propriamente dito, as células-tronco periféricas colhidas por aférese e armazenadas são descongeladas na beira do leito e infundidas através do cateter do paciente, como uma transfusão sanguínea. A duração do procedimento é de aproximadamente 1 h, a depender do número de bolsas e efeitos colaterais apresentados durante a infusão. Os efeitos adversos da infusão são decorrentes do agente crioprotetor, chamado dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado para congelamento das células. Os efeitos mais comuns provocados pelo DMSO, durante a infusão são a liberação de odor característico, náusea/vômito, reação alérgica, dor abdominal, sangue na urina, e efeitos raros como tosse, falta de ar, dor no peito, alteração cardíaca, choque anafilático, e; raríssimo a morte.

Após o recebimento da medula óssea (células-tronco periféricas), o paciente passará por um período chamado período de aplasia, fase esta em que a sua medula ainda não vai estar produzindo os elementos do sangue: glóbulos vermelhos (necessidade de transfusão de sangue), plaquetas (necessidade de transfusão de plaquetas) e glóbulos brancos (grande risco de infecções/febre). Este período é quando o paciente se apresenta mais sintomático (fase mais difícil/grave).

A medula óssea é estimulada pós-transplante com o uso da Filgrastima subcutânea ou endovenosa/diário, porém a “pega” da medula óssea (funcionamento da medula) ocorre



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



próximo ao 14º dia. Após a “pega”, os medicamentos serão retirados gradativamente até a possibilidade de alta hospitalar, conforme critério médico.

O transplante autólogo é realizado no setor de Internamento da Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO), com tempo médio de internação de 30 dias. Esse período varia de pessoa para pessoa, conforme intercorrências de cada paciente. Durante a internação, são realizados exames periódicos (sangue, raio x e outros), conforme a necessidade.

Durante a internação, o paciente ficará sob os cuidados da equipe multiprofissional da Unidade de TMO, exceto se o mesmo apresentar intercorrências graves com necessidade de cuidados intensivos, quando o paciente será transferido para Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Universitário, ficando sob os cuidados da equipe da mesma. A equipe médica da Unidade de TMO permanece de plantão de sobreaviso, no período noturno (19:00-7:00) e nos finais de semana e feriados (24hs), períodos estes, em que o paciente é atendido na urgência/emergência pelo médico plantonista do Pronto Socorro do Hospital Universitário e discutido caso com plantonista à distância da Unidade de TMO.

Após a alta da internação, o paciente retornará para avaliação no ambulatório pós-TMO ou no hospital-dia, conforme indicação médica.

O acompanhamento no ambulatório de TMO (pós-transplante) será agendado pela equipe de TMO, diminuindo a frequência com o passar do tempo, com encaminhamento e seguimento pelo médico de origem a partir de 3 a 6 meses pós-TMO ou, antes, se recaída. Os pacientes com linfoma ou tumores sólidos com recaída pós-TMO autólogo, deverão receber alta definitiva da Unidade de TMO/HU para seguir conduta com médico de origem. Os pacientes com mieloma múltiplo com recaída pós-TMO, serão tratados por seu médico de origem, mas poderão ser submetidos à 2º. TMO autólogo se houver indicação. Os pacientes em remissão pós-TMO autólogo farão retorno anual à Unidade de TMO até 60 meses pós-transplante.

Assinando esse termo de consentimento, eu, _____, declaro que recebi as informações sobre o transplante autólogo de células-tronco periféricas, seus riscos e benefícios e esclareci todas as minhas dúvidas sobre o procedimento.

PACIENTE

MÉDICO/CRM

TESTEMUNHA

TESTEMUNHA

Londrina, _____.

ANEXO C

Aprovação do Projeto Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
(CEP) /Plataforma BrasilUNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/
UNIOESTE - CENTRO DE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo dos mediadores envolvidos no processo de mobilização e coleta de células-tronco com G-CSF e seu impacto na evolução pós-transplante autólogo em pacientes portadores de mieloma múltiplo

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50070515.0.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.389.996

Apresentação do Projeto:

A população deste estudo será composta por pacientes serão portadores de mieloma múltiplo submetidos ao procedimento padrão de transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogo na Unidade de Transplante de Medula, do Hospital Universitário de Londrina – Universidade Estadual de Londrina, Londrina -Paraná, atendidos a partir de novembro de 2015. Espera-se avaliar um total de 60 indivíduos. Os voluntários serão avaliados pré-TMO. As amostras de sangue periférico e criopreservadas do produto de leucoaférese de células-tronco periféricas e aos 3 meses pós-TMO amostras de medula óssea (mielograma). Os pacientes serão categorizados de acordo com o prognóstico clínico em 2 grupos: portadores de mieloma múltiplo com melhor prognóstico (n=30) e portadores de mieloma múltiplo com pior prognóstico (n=30). Serão inclusos no presente estudo pacientes portadores de mieloma múltiplo, ambos os sexos, qualquer idade, elegíveis para transplante autólogo de medula óssea, submetidos à leucoaférese de grande volume, através da mobilização das células-tronco hematopoiéticas com G-CSF exclusivamente; referenciados para Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Universitário de Londrina/Universidade Estadual de Londrina. As amostras coletadas serão congeladas até o momento das análises. Serão analisados dados de prontuário, exames bioquímicos e exames de imagem. Com o material

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3220-3272

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/
UNIOESTE - CENTRO DE



Continuação do Parecer: 1.389.996

coletado, serão realizadas dosagens de citocinas por kits de ELISA, análises de biologia molecular (PCR, genômica e proteômica), perfil de estresse oxidativo e análises citogenéticas para estratificação de risco.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo primário deste projeto é caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos durante o processo de mobilização e coleta de células-tronco com G-CSF em pacientes portadores de mieloma múltiplo, e sua relação com o prognóstico da doença.

Os objetivos secundários: 1. Caracterizar o perfil oxidativo dos pacientes com mieloma múltiplo submetidos à estimulação com G-CSF; 2. Definir o perfil molecular destes pacientes através de ferramentas de genômica e proteômica; 3. Correlacionar os parâmetros de estresse oxidativo e seu impacto como fator preditivo na mobilização e coleta de células-tronco hematopoiéticas e influência na evolução pós-TMO; 4. Avaliar o valor prognóstico de genes e proteínas envolvidos neste processo, visando identificar potenciais alvos moleculares preditores de sobrevida e resposta ao tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios assim como os riscos estão claramente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância para a área de Ciências da Saúde.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão anexados e devidamente preenchidos.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto considerado adequado do ponto de vista ético envolvendo seres humanos em conformidade com as exigências deste Comitê.

Considerações Finais a critério do CEP:

As solicitações feitas foram atendidas pela pesquisadora.

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Município: CASCAVEL

Telefone: (45)3220-3272

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br