

**ACADEMIA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE SÃO JOSÉ DO
RIO PRETO**

**ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM
MIELOMA MÚLTIPLO**

Artigo de conclusão de curso apresentado para
obtenção do título de Pós-graduação *latu senso* em
Biologia molecular aplicada ao diagnóstico
laboratorial.

Docente: Prof. Dr. Luiz Carlos de Matos

Discente: Edson Pavan

SÃO JOSE DO RIO PRETO

2012

RESUMO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica incurável, de etiologia desconhecida. Atinge as células plasmocitárias (plasmócitos) da medula óssea (MO), que apresentam uma produção anormal e monoclonal de uma das cinco classes ou de um subtipo de cadeia leve de imunoglobulina. Representa 1% das neoplasias malignas humanas e 10% das hematológicas, perdendo apenas para os linfomas não-Hodgkin's. As anormalidades cromossômicas descritas no MM são complexas e múltiplas, o que dificulta a correlação entre genótipo e as manifestações clínicas. As anormalidades no cromossomo 13, particularmente as deleções em 13q14, estão entre as mais prevalentes e também são observadas em outras doenças de células plasmocitárias. A del(13)(q14) é um fator prognóstico desfavorável independente, está associada a uma sobrevida menor e a uma resposta terapêutica pobre, que independe do tipo de tratamento. Este trabalho tem como objetivo avaliar a frequência da del(13)(q14) e de outras alterações cromossômicas e moleculares no MM.

1. INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais do Mieloma Múltiplo

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica de etiologia ainda não esclarecida, multissistêmica e incurável, que atinge as células plasmocitárias, também denominadas plasmócitos, da medula óssea (MO). Os plasmócitos representam o máximo da diferenciação dos Linfócitos B e são responsáveis pela produção das cinco classes de imunoglobulinas (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. No MM, os plasmócitos apresentam uma produção anormal e monoclonal de uma das cinco classes ou de um subtipo de cadeia leve de imunoglobulina (kappa ou lambda).^(1,2)

O MM é classificado quanto ao tipo de Ig ou cadeia leve produzida pelos plasmócitos, sendo o tipo mais comum o MM IgG, responsável por 50 a 60% dos casos, seguido pelo MM IgA, com 21% dos casos. Os tipos IgD, IgE e IgM são menos comuns

A primeira descrição desta doença foi em 1844, quando Solly relatou o caso de uma mulher chamada Sarah Newbury, que apresentava fadiga e dor óssea. Na época, o autor referiu a possibilidade de tratar-se de algum tipo de processo inflamatório que se iniciava de uma “ação mórbida” nos vasos sanguíneos.⁽³⁾

O MM representa 1% de todas as neoplasias malignas, é a segunda neoplasia hematológica mais comum, correspondendo a 10% dos casos, perdendo apenas para os linfomas não-Hodgkin's.⁽¹¹⁾ A incidência anual de MM nos Estados Unidos é de quatro casos por 100.000 habitantes.⁽⁴⁾ No ano de 2004, 15.270 novos casos de MM foram diagnosticados nos Estados Unidos, sendo que no mesmo ano 11.070 portadores da doença foram a óbito naquele país. O MM se caracteriza por acometer pacientes idosos, apresentando média de idade ao diagnóstico de 65 anos. Raramente acomete pessoas abaixo de 40 anos.⁽⁵⁾ Pouco se conhece sobre a incidência e aspectos clínicos do MM em grupos étnicos da América Latina onde, por vários séculos, ocorreu uma miscigenação relativamente livre entre ancestrais americanos nativos, mediterrâneos e africanos. No Brasil, a incidência de MM é desconhecida e a doença não aparece nas estimativas anuais fornecidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, BRASIL, 2008). Na cidade de São Paulo a incidência ajustada por idade, entre 1997 e 1999, era de 3,2/100.000 mulheres e 4,1/100.000 homens.

O MM ocorre em todas as etnias e localizações geográficas, mas tem prevalência maior em homens e em negros, mas a razão disso não está esclarecida.⁽⁶⁾ Já foi demonstrada também, uma maior incidência de MM em pacientes com baixo nível sócio econômico.⁽²⁾ O aumento da incidência de MM nos últimos anos relaciona-se a uma série de fatores, entre eles, um conhecimento maior da história natural da doença e sua patogênese, a melhora dos recursos laboratoriais, o aumento da expectativa de vida mundial e a exposição crônica a agentes poluentes.⁽⁷⁾ Não há um exame de triagem específico para esta neoplasia em indivíduos assintomáticos. Nestes casos, a elaboração da hipótese diagnóstica depende do conhecimento do profissional sobre a clínica da doença.⁽⁸⁾

Entre os principais achados laboratoriais no MM, o hemograma ao diagnóstico mostra anemia normocítica e normocrômica em 60% dos casos e trombocitopenia em 20%. Cerca de 95% dos casos apresentam intensa aglutinação das hemácias, por alteração na carga elétrica da membrana eritrocitária, formando verdadeiras pilhas de hemácias conhecidas como *rouleaux*, que são facilmente observadas em esfregaço de sangue periférico.⁽⁹⁾ Na eletroforese de proteínas séricas é observado um pico monoclonal (pico M) característico do MM, denominado proteína M. Este pico Monoclonal pode ser detectado por eletroforese em 82% dos casos e por imunofixação em 93%. Além da eletroforese, outros exames auxiliam a busca da proteína monoclonal: imunoeletroforese, nefelometria, imunoturbidimetria e pesquisa de Proteína de Bence Jones.^(1,7)

Na investigação do MM pelo exame de urina, aproximadamente 20% dos pacientes produzem apenas cadeias kappa ou lambda de Ig (proteína de Bence Jones) determinando o subtipo cadeia leve. Contudo, a presença de cadeia leve não é detectada no exame de rotina, sendo necessário o exame específico.⁽²⁾ A eletroforese de proteínas séricas e/ou urinárias é fundamental no diagnóstico, estadiamento e seguimento clínico. O aumento da proteína M é observado na eletroforese como um pico estreito na fração das gamaglobulinas ou, menos frequentemente, das betaglobulinas, através do traçado eletroforético (Gráfico 1). A confirmação da proteína monoclonal é essencial para diferenciar gamopatias monoclonais das gamopatias policlonais, uma vez que as primeiras são entidades neoplásicas ou potencialmente neoplásicas, enquanto as últimas

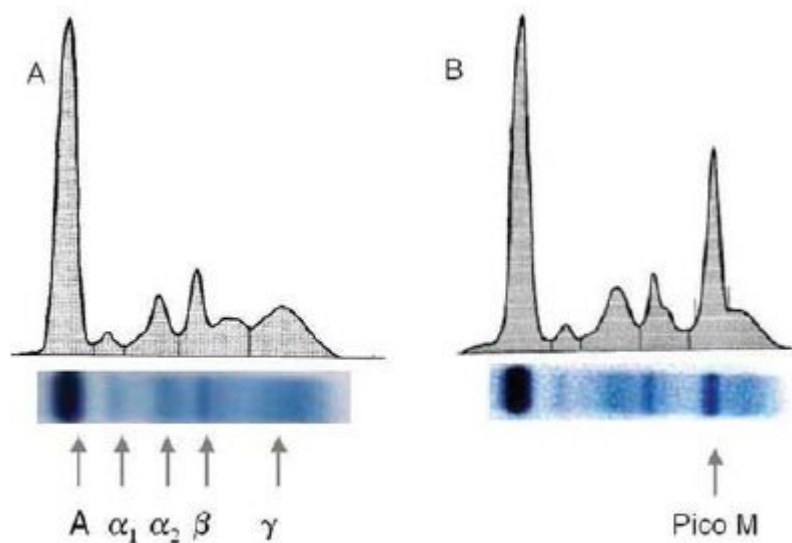


Gráfico 1. A: Perfil eletroforético normal. B: Perfil característico de Componente Monoclonal (Proteína M) em pacientes com mieloma Múltiplo.

resultam de processos reacionais, frequentemente inflamatórios ou infecciosos.⁽¹⁰⁾

Dor óssea é a principal manifestação clínica observada em pacientes com MM, encontrada em 60% dos casos. Anemia está presente em 73% ao diagnóstico, hipercalcemia em 13% e creatinina maior que 2mg/dL em 19%.⁽¹⁾ Lesões líticas estão presentes em 67% dos indivíduos e 20% apresentam osteoporose, fraturas ou compressão medular. O estudo radiográfico do corpo inteiro possibilita uma correlação entre a extensão da doença e a carga tumoral. Esse método permite o estudo de grandes áreas do esqueleto e detecta fraturas. Aproximadamente 80% dos pacientes possuem alterações ósseas ao diagnóstico: osteopenia, lesões líticas e fraturas espontâneas.⁽¹¹⁾

No aspirado da medula óssea são observados plasmócitos atípicos, porém, a frequência varia dependendo da origem e qualidade do local da aspiração. Em 6% dos casos, apenas a biópsia da medula óssea é capaz de demonstrar a infiltração medular.⁽⁷⁾

Em uma forma rara de apresentação clínica, denominada MM não secretor, não há produção de proteína M. Esta corresponde a apenas 1% dos pacientes.^(1,3) Também, de 3 a 5% das pessoas acima de 50 anos da população geral apresentam proteína M, o que as caracteriza como portadoras de Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado

(MGUS). Não apresentam sinais clínicos da doença e 25% evoluem para MM, motivo pelo qual devem ser clinicamente monitoradas, para detecção precoce da neoplasia, o que irá influenciar na sobrevida.⁽¹²⁾

Os critérios para diagnósticos do MM são mostrados no Quadro 1.

- Paraproteína monoclonal M presente, sérica e/ou urinária
- Plasmócitos Monoclonais presentes na M.O > ou igual a 10% e/ou Plasmocitoma
- Dano orgânico relacionado ao MM (presença de um ou mais):
 - (C) – Cálcio sérico > de 11 mg/dL: hipercalemia.
 - (R) – Insuficiência Renal: creatinina > 2 mg/dL.
 - (A) – Anemia: hemoglobina < 10 g/dL.
 - (B) – Lesões ósseas: osteólise ou osteoporose com fraturas compressivas.
- Outros: hiperviscosidade sintomática, amiloidose, infecções bacterianas recorrentes (>2 episódios por ano).

Quadro 1. Critérios diagnósticos para MM.

As manifestações clínicas presentes no MM são consequência direta da infiltração neoplásica medular e da presença da proteína monoclonal no sangue e/ou urina.⁽⁹⁾

Os plasmócitos afetados no MM podem ser diferenciados dos demais por imunofenotipagem. Os marcadores CD19- e CD56+ são observados em 80% dos pacientes, enquanto 20% mostram CD19- e CD56-.⁽¹³⁾

A sobrevida varia de poucos meses a mais de dez anos, com média de três a quatro anos e alguns fatores estão relacionados ao prognóstico. Recentemente, foi estabelecido um sistema de estadiamento para o MM, elaborado pela *International Staging System* (ISS), que tem como base a dosagem de β_2 microglobulina (B2M) e de albumina sérica, que permite a classificação em três estádios: I (B2M < 3,5 mg/L e albumina > 3,5 g/dL), com mediana de sobrevida de 62 meses; II (B2M < 3,5 mg/L e albumina < 3,5 g/dL ou B2M de 3,5 a 5,5 mg/L), com mediana de sobrevida 49 meses e III (B2M 5,5 mg/L) e mediana de sobrevida de 29 meses. O estudo do prognóstico é fundamental para avaliar a expectativa de vida e adequação da terapia, de acordo com o grupo de risco.⁽¹⁴⁾

1.2 ANORMALIDADES CROMOSSOMICAS E MOLECULARES NO MM

As anormalidades cromossômicas descritas no MM são complexas e múltiplas, o que dificulta a correlação entre mutações genéticas e manifestações clínicas. Alterações no microambiente medular promovem o crescimento tumoral pela interação entre o estroma, célula neoplásica e citocinas locais.⁽³⁾ Os plasmócitos apresentam uma variedade ampla de alterações cromossômicas e moleculares, algumas correlacionadas com o prognóstico, o que influencia a tomada de decisões terapêuticas.⁽⁸⁾

Varias translocações estão envolvidas na patogênese do MM. A translocação entre o cromossomo 11 e o 14 [t(11;14)(q13;q32)] resulta em uma expressão aumentada de ciclina D1. Esta alteração é detectada em 90% dos MM de IgM e está associada a um aumento de sobrevida dos pacientes tratados com altas doses de quimioterapia. A translocação t(4;14)(p16.3;q32) leva a um aumento na expressão dos oncogenes *FGFR3* e *MMSET*, está associada ao MM de IgA ou de cadeia leve e é considerada um fator prognóstico desfavorável, que independe de quimioterapia de altas doses. A translocação t(14;16)(q32;q23) é detectada em 2–5% dos pacientes com MM, é muito difícil de ser identificada por citogenética convencional e está associada a um prognóstico altamente desfavorável.⁽¹⁵⁾

Estudos de expressão gênica revelam que genes hiper-expressos no MM são aqueles associados com a inibição da diferenciação celular e apoptose, enquanto genes associados com resposta imune, controle do ciclo celular e indução da apoptose estão sub-expressos. Transformações moleculares aditivas ocorrem nos plasmócitos normais, transformando-os em malignos. Neste contexto, as translocações envolvendo o gene da imunoglobulina de cadeia pesada (IgH), localizado no cromossomo 14, parecem ser fundamentais. Tais translocações envolvem a ação de *enhancers* (acentuadores), localizados próximos ao gene e que em condições normais resultam na expressão aumentada de Ig, mas que em condições malignas promovem este efeito nos genes que se justapõem a eles. ⁽¹⁶⁾

O gene da ciclina D1 está localizado no cromossomo 11, há aproximadamente 120kb do ponto de quebra da t(11;14). Os efeitos da expressão aumentada da ciclina D1

no MM não estão esclarecidos. Há sugestões de que proporciona às células maior susceptibilidade ao estímulo proliferativo.^(16,17)

Na t(4;14), o receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3 (*FGFR3*), localizado na região 4p16.3, também tem a sua expressão desregulada. Tal translocação, até o presente, foi observada apenas em MM. O *FGFR3* em condições normais se expressa nos rins, pulmão e condrócitos. Mutações germinativas neste gene estão associadas a formas diferentes de nanismo. Aparentemente, nas células do MM, quando mutado e com expressão aumentada, o *FGFR3* promove uma sinalização transmembrânica constante à partir dos estímulos do estroma.⁽¹⁷⁾

Além das translocações, anormalidades no cromossomo 13 estão entre as alterações mais frequentes. A deleção da região 13q14, por exemplo, apresenta uma alta prevalência não só no MM, como em outras doenças de células plasmocitárias. É observada em 40-50% dos casos de MM com a utilização da técnica de FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization), enquanto as técnicas citogenéticas convencionais a detectam em apenas 10-20%.⁽¹⁸⁾

Shaughnessy e cols.⁽¹⁹⁾ utilizaram 11 sondas diferentes para o cromossomo 13 e detectaram a deleção em 86% dos pacientes; no entanto, esses resultados não foram confirmados por outros estudos.

Deleções no cromossomo 13 já foram observadas em 70% de pacientes japoneses. Destas, 20% ocorreram em 13q14.⁽²⁰⁾ Um outro estudo realizado em 131 pacientes japoneses com MM, por Kurahashi e colaboradores, entre abril de 1997 e janeiro de 2007, detectou anormalidades citogenéticas em 21,2% dos casos. Deleções em 13q, del(17p), del(11q), t(11;14) e t(4;14) foram detectadas por FISH respectivamente em 36% (31/86), 24,7% (19/77), 7,6% (5/64), 18,2% (12/66) e 10,4% (7/67) dos pacientes.⁽²¹⁾ Também são relatadas del(1p), dup(1q), del(5q), del(6q), del(8p), del(9p) e del(17p).^(21,22)

A deleção do 13, também pode ser observada com a utilização da técnica de FISH em condições que antecedem o MM, como a GMSI e o MM assintomático. É sempre um fator prognóstico desfavorável, com sobrevida curta e resposta terapêutica pobre, independente do tipo de tratamento.^(19, 23, 24)

Particularmente a etiologia do MM relacionada com a del(13)(q14) envolve alterações no gene *RBI*, um supressor de tumor mapeado em 13q14.2. A proteína pRB é

uma fosfoproteína que atua como fator regulador do ciclo celular. Impede a transição da fase G1 → S por inibir a transativação mediada por *E2F* (fator de transcrição) de vários genes envolvidos na síntese de DNA. A função de pRB é regulada pela fosforilação: hipofosforilada ou desfosforilada, é ativada, se liga a E2F e promove o fim do ciclo celular; fosforilada é inativada, não pode se ligar a E2F e a célula entra na fase S (Figura 2).⁽¹⁷⁾

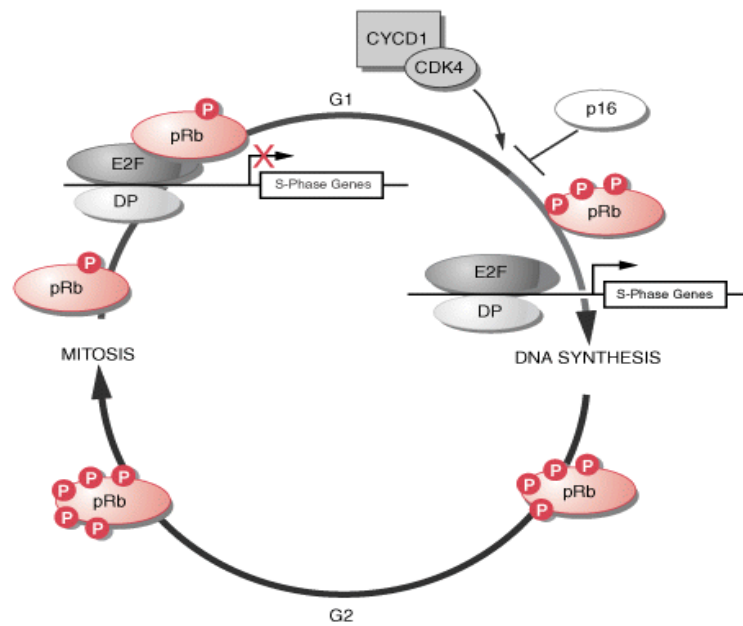


Figura 2. Participação da proteína pRB na supressão do ciclo celular e o efeito da fosforilação (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=cmed6.figgrp.1575>).

Mutações no *RBI* também são observadas em outros tipos de neoplasias, como no retinoblastoma (RB), câncer de bexiga e sarcoma osteogênico. Contudo, não apenas deleção bialélica do *RB* é observada nestas doenças. Como muitas células malignas apresentam deleção monoalélica ou monossomia do 13, provavelmente outros mecanismos biológicos envolvendo o *RB* e/ou outros genes atuam na etiopatogenia.^(16,24)

A hiperdiploidia também é referida como um achado comum em MM, seguida da hipodiploidia e do cariótipo pseudodiplóide, que têm prognóstico desfavorável. As anormalidades mais comuns envolvem ganhos dos cromossomos 15, 9, 3, 19, 11, 7, 21,

e 5, respectivamente. Perdas mais comuns envolvem os cromossomos X,Y, 8, 13, 14 e 22.^(25, 26)

A hipótese científica a ser testada neste projeto é que alterações citogenéticas são freqüentes em MM, particularmente envolvendo a região 13q14, com consequências diretas no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos pacientes.

2. OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo geral demonstrar e descrever as principais alterações cromossômicas e moleculares descritas no mieloma múltiplo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- International Myeloma Foundation. Revisão Resumida do mieloma e das opções de tratamento. 2005. p.1-28 Disponível em: <<http://www.mielomabrasil.org/publicacoes.php>>. Acesso em: 20 Out .2008.
- 2- Mangan P. Recognizing multiple myeloma. Nurse Pract. 2005; 3; 14-27.
- 3- Ludwig H. Advances in biology and treatment of multiple myeloma. Ann Oncol. 2005; 16: 106-12.
- 4- Mirra, AP, Latorre MRDO, Veneziano DB. Aspectos Epidemiológicos do Câncer no Município de São Paulo. Fatores de Risco, 2003. São Paulo: Registro de Câncer de São Paulo, 2003. Disponível em: <http://hygeia.fsp.usp.br/rcsp>. Acesso em: 20 out. 2008.
- 5- Kyle RA. Review of 1027 patients with newly diagnosed Multiple Myeloma. Mayo Clin Proc. 2003; 78: 21-33.
- 6- Morgan GJ, Davies FE. Evolving treatment strategies for myeloma. Br J Haematol. 2005; 92: 217-21.
- 7- Hideshima, T. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. Blood. 2004. 134: 507-18.
- 8- Hungria VT. Validation of Internacional Staging System for multiple myeloma: a retrospective analysis of 172 patients at two brazilian centers. Haematologica. 2005; 90 abstract.
- 9- Failace R. Hemograma: manual de Interpretação. 3 ed. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA. 2003; 194 p.
- 10- Dispenzieri A., Kyle RA. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. Best Pract Res Clin Haematol. 2005; 18: 553-68.
- 11- Hungria VT. Doença óssea em Mieloma Múltiplo. Rev Bras Hematol Hemoter. 2007; 29: 60-6.
- 12- Mitsiades CS. Focus on multiple myeloma. Cancer Cell. 2004; 6: 439-44.
- 13- Falcão RP, Dalmazzo LFF. O valor da imunofenotipagem para o diagnóstico do Mieloma Múltiplo e na avaliação da doença residual mínima. Rev. Bras. De Hemtol. Hemoter. 2007; 29: 3-9.
- 14- Martinez GA. Fatores prognósticos no Mieloma Múltiplo. Rev. Bras. De Hemtol. Hemoter. 2007; 29: 27-30.

- 15- Fonseca R, Blood R, Rue M. Clinical and biologic implications of recurrent genetics aberrations in myeloma. *BLOOD*. 2003; 101: 569-575.
- 16- Hallek M, Bergsagel PL, Anderson, KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation. *BLOOD*. 1998; 91: 3-21
- 17- Chang WJ, Glegov O, Bergsagel, PL, Kuehl, WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007; 20: 571–596.
- 18- Hussein MA, Juturi JV, Liebermen I. Multiple Myeloma. *Curr Opin Oncol*, 2002; 14: 31-35.
- 19- Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood*. 2000; 96: 505-11.
- 20- Braggio E, Ranault IZ. Alterações moleculares no Mieloma Multiplo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007; 29(1):10-16.
- 21- Kurahashi S, Sawamoto A, Sugimoto T, Narimatsu H. Iwasaki T, Adachi T. et al. Frequency and prognostic value of chromosome abnormalities in multiple myeloma. *Rinsho Ketsueki*. 2007; 48: 1455-61.
- 22- Takimoto M, Ogawa K. Close relation between 14q32/IGH translocations and chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma: a high incidence of 11q13/CCND1 and 16q23/MAF. *Int J Hematol*. 2008; 87:260-65.
- 23- Sun WL, Wu YJ, Li H, Wang X, Zhuang JL. Detection of deletion of the long arm of chromosome 13 and translocation of immunoglobulin heavy chain gene by interphase fluorescence in situ hybridization in patients with multiple myeloma. *Eur. J. Clin. Invest*. 2008; 38: 53-60.
- 24- Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 2000; 95: 1925-30.
- 25- Mohamed AN, Bentley G, Bonnett ML, Zonder, J. Al-Katib A. Chromosome aberrations in a series of 120 multiple myeloma cases with abnormal karyotypes. *Am J Hematol*. 2007; 82: 1080-87.
- 26- Kyle RA & Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *Blood*. 2005; 111: 2962-72.
- 27- Shaffer LG, Tommerup NS. *ISCN: International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger, 2005.