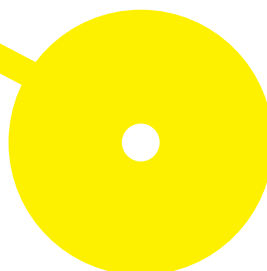




# Utilidade clínica do biomarcador cadeia pesada/leve da imunoglobulina na deteção precoce de recaída em doentes com mieloma múltiplo: comparação com métodos convencionais

Carla Daniela Costa Azevedo

07/2024





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Utilidade clínica do biomarcador cadeia pesada/leve da imunoglobulina na deteção precoce de recaída em doentes com mieloma múltiplo: comparação com métodos convencionais**

**Autor**

Carla Daniela Costa Azevedo

**Orientadores**

Dr. Bruno Fernandes

Assistente hospitalar no Instituto Português de Oncologia do Porto

Prof. Doutor Ricardo Ferraz

Docente na Escola Superior de Saúde – Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Bioquímica em Saúde – Ramo Bioquímica Aplicada** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

A conclusão desta dissertação de mestrado corresponde a um marco importante na minha vida acadêmica e profissional. Este trabalho só foi possível graças ao apoio, incentivo e colaboração de muitas pessoas, às quais gostaria de expressar meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço aos meus orientadores, Dr. Bruno Fernandes e Prof. Dr. Ricardo Ferraz, pela vossa orientação, valiosos conselhos e dedicação.

Aos meus professores e colegas do Mestrado de Bioquímica em Saúde, agradeço pela partilha de conhecimento, contribuíram significativamente para a minha formação académica e para o sucesso desta tese.

Um agradecimento especial à minha família, pela paciência e apoio incondicional. Sempre acreditaram em mim e incentivaram-me a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos meus colegas de trabalho, cujo apoio, incentivo e colaboração foram fundamentais para a realização desta dissertação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu profundo agradecimento.

Muito obrigada!

## **Resumo**

O objetivo do presente estudo é avaliar a utilidade do biomarcador cadeia pesada/leve da imunoglobulina na deteção precoce de recaída bioquímica em doentes com mieloma múltiplo.

A cadeia pesada/leve da imunoglobulina é um novo ensaio que mede separadamente em pares, os tipos de cadeia leve de cada classe de imunoglobulina intacta, permitindo calcular proporções de concentrações de imunoglobulina monoclonal (envolvida)/ imunoglobulina policlonal (não envolvida).

Para este estudo foram seleccionadas 80 amostras de 40 doentes com mieloma múltiplo com evidências de recaída bioquímica nos últimos 5 anos, correspondendo a duas amostras por doente. O grupo de amostras 1 corresponde às amostras que antecedem as recaídas bioquímicas e o grupo de amostras 2 às recaídas bioquímicas. Os pares de cadeia pesada/leve foram determinados e comparados com resultados de imunofixação de soro, eletroforese de proteínas no soro e cadeias leves livres. No grupo 1 que corresponde a amostras com eletroforese e imunofixação de soro negativas, 18% das amostras tinham rácio cadeia pesada/leve alterado, 33% rácio cadeias leves livres alterado e 40% tinham pelo menos 1 destes rácios alterados. No grupo 2, amostras com imunofixação positiva, 43% com eletroforese de proteínas no soro positiva, 43% rácio cadeias pesada/leve alterado, 58% rácio cadeias leves livres alterado e 68% com pelo menos um dos rácios alterados.

A avaliação das cadeias leves livres e das cadeias pesada/leve apresentam vantagem em relação aos testes convencionais, uma vez que poderão ter um impacto benéfico na deteção precoce de recaída bioquímica em doentes com mieloma múltiplo.

**Palavras-chave:** Ensaio de cadeia pesada/leve, Hevylite, mieloma múltiplo, eletroforese de proteínas no soro, imunofixação de soro.

## **Abstract**

The objective of the present study is to evaluate the utility of the immunoglobulin heavy/light chain biomarker in the early detection of biochemical relapse in patients with multiple myeloma. The immunoglobulin heavy/light chain is a new assay that separately measures, in pairs, the light chain types of each intact immunoglobulin class, allowing for the calculation of the ratios of monoclonal (involved) to polyclonal (uninvolved) immunoglobulin concentrations.

For this study, 80 samples from 40 patients with multiple myeloma, who showed evidence of biochemical relapse in the past 5 years, were selected, corresponding to two samples per patient. Sample Group 1 corresponds to samples preceding biochemical relapses, and Sample Group 2 to biochemical relapses. Heavy/light chain pairs were determined and compared with the results of serum immunofixation, serum protein electrophoresis, and free light chains. In Group 1, which corresponds to samples with negative serum electrophoresis and immunofixation, 18% of the samples had an altered heavy/light chain ratio, 33% had an altered free light chain ratio, and 40% had at least one of these ratios altered. In Group 2, samples with positive immunofixation, 43% had positive serum protein electrophoresis, 43% had an altered heavy/light chain ratio, 58% had an altered free light chain ratio, and 68% had at least one of the ratios altered.

The evaluation of free light chains and heavy/light chains presents an advantage over conventional tests, as they may have a beneficial impact on the early detection of biochemical relapse in patients with multiple myeloma.

**Keywords:** Heavy/light chain assay, Hevylite, multiple myeloma, serum protein electrophoresis, serum immunofixation.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Imunoglobulinas.....	2
1.2. Tipos de mieloma múltiplo .....	3
1.3. Mieloma múltiplo e o sistema imunológico.....	5
1.4. Influência da genética no mieloma múltiplo .....	7
1.5. Diagnóstico e monitorização.....	8
1.6. Ensaio cadeia pesada/leve das imunoglobulinas.....	10
2. Métodos.....	12
3. Resultados.....	13
4. Discussão.....	15
5. Conclusão.....	18
Referências Bibliográficas.....	19

## Índice de abreviaturas

CLL	cadeias leves livres
Del	deleção
DEM	doença extramedular
EDM	eventos definidores de mieloma múltiplo
EPS	electroforese de proteínas no soro
GMSI	gamopatia monoclonal de significado indeterminado
HLC	cadeia leve/pesada da imunoglobulina
IFS	imunofixação de soro
IFU	imunofixação de urina
Igs	imunoglobulinas
iHLC	HLC envolvida
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
MM	mieloma múltiplo
MMCI	mieloma múltiplo de cadeia intacta
MMCL	mieloma múltiplo de cadeias leves
MML	mieloma múltiplo latente
MO	medula óssea
NK	<i>natural killer</i>
PM	proteína monoclonal
rCLL	rácio de cadeias leves livres
rHLC	rácio de HLC
SP	sangue periférico
Th1	células T auxiliares tipo 1
Tregs	células T reguladoras
uHLC	HLC não envolvida

## 1. Introdução

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença maligna caracterizada pela proliferação descontrolada na medula óssea de células tumorais designadas por plasmócitos clonais, e consequente produção anormal de imunoglobulinas. Ao contrário das células plasmáticas saudáveis, os plasmócitos clonais não produzem anticorpos funcionais e, em vez disso, produzem uma imunoglobulina anormal conhecida como "proteína monoclonal" (PM). Este aumento de imunoglobulinas (Igs) monoclonais causa danos específicos em órgãos-alvo nomeadamente no osso e no rim, bem como uma capacidade reduzida de combate às infecções. (1–3) As consequências da doença não diagnosticada são graves. Destaca-se a importância do diagnóstico precoce, do tratamento e da abordagem interprofissional. (1,2)

Os fatores de risco para o mieloma múltiplo incluem obesidade, inflamação crônica e exposição a pesticidas, solventes orgânicos ou radiação. Variantes genéticas herdadas também contribuem para o desenvolvimento do MM. (4)

A maioria dos doentes com MM apresenta inúmeras recidivas da doença. Cada remissão subsequente é de duração cada vez mais curta e, em última análise, os doentes morrerão da própria doença ou de complicações relacionadas ao tratamento. (5)

O MM é uma neoplasia que representa 2% de todos os cânceros e 10% das neoplasias hematológicas. (3,6)

A incidência anual estimada da doença é de 3 a 15 casos por 100.000 habitantes. O MM é ligeiramente mais comum em homens do que em mulheres, e é duas vezes mais comum em afro-americanos em comparação com caucasianos. A idade média dos doentes no momento do diagnóstico é de cerca de 65 anos. (3,6,7)

As manifestações clínicas mais comuns no momento do diagnóstico incluem anemia, hipercalcemia, lesões líticas e insuficiência renal. No entanto, os doentes com MM podem ser diagnosticados numa fase assintomática através de exames de rotina, nomeadamente a electroforese de proteínas no soro (EPS). (3,6,8)

A doença óssea é a principal causa de morbilidade e pode ser detectada em radiografias de rotina, ressonância magnética ou tomografia. (9) Aproximadamente 1 a 2% dos doentes apresentam doença extramedular (DEM) no momento do diagnóstico inicial, enquanto 8% desenvolvem DEM mais tarde no curso da doença. (6,10)

A contribuição do laboratório para o estudo do MM é essencial quer no diagnóstico, quer na estratificação de risco e monitorização da doença. As PM são específicas para o clone de

células em proliferação e são caracterizadas por terem grande diversidade, tanto estruturalmente quanto em concentração, entre os doentes.

O estudo desta PM requer diferentes métodos laboratoriais para sua detecção, caracterização e medição de concentração. O laboratório deve possuir métodos e estratégias analíticas que possibilitem a análise da PM com sensibilidade e especificidade adequadas. Cada um deles deve ser aplicado de acordo com o tipo de MM e o estadió de desenvolvimento da doença, permitindo uma monitorização adequada para cada doente, categorização precisa do grau de resposta ao tratamento e detecção precoce de recaídas.(11)

A EPS e a imunofixação de soro (IFS) são métodos utilizados na rotina para identificar, caracterizar e quantificar proteínas monoclonais. No entanto, as medições de EPS podem ser imprecisas dependendo da migração do componente monoclonal. A IFS é o método mais sensível, no entanto não é quantitativo e a sua interpretação pode, em alguns casos, ser subjetiva. (12)

A cadeia pesada/leve da imunoglobulina (HLC) é um novo ensaio que mede separadamente em pares, os tipos de cadeia leve de cada classe de imunoglobulina intacta, permitindo determinar quantitativamente as imunoglobulinas IgG  $\kappa$  , IgG  $\lambda$  , IgA  $\kappa$  , IgA  $\lambda$  , IgM  $\kappa$  e IgM  $\lambda$  .

Este estudo terá como objetivo principal avaliar a utilidade do biomarcador HLC na detecção precoce de recaída em doentes com MM e como objetivos específicos comparar o biomarcador HLC com os métodos convencionais (eletroforese e imunofixação de soro) bem como determinar qual o melhor biomarcador ou combinação de biomarcadores para detetar precocemente a recaída bioquímica em doentes com MM.

### **1.1. Imunoglobulinas**

As células plasmáticas normais secretam imunoglobulinas (anticorpos) para combater infecções. As imunoglobulinas são proteínas que se ligam a substâncias que entram no organismo e que este reconhece como estranhas. As imunoglobulinas normais são "proteínas policlonais". As células do mieloma, plasmócitos malignos/clonais, secretam proteína monoclonal. A proteína monoclonal é uma imunoglobulina anormal que não consegue desempenhar adequadamente a sua função. (13)

A estrutura básica de uma imunoglobulina é composta por quatro cadeias polipeptídicas: duas cadeias leves (Kappa ( $\kappa$ ) ou Lambda ( $\lambda$ )) e duas cadeias pesadas (IgG, IgA, IgM, IgD ou IgE), que são conectadas por pontes dissulfeto. As cadeias leves e pesadas contêm regiões constantes e regiões variáveis. As regiões variáveis são responsáveis pelo reconhecimento e ligação a antígenos específicos (figura 1). (5)

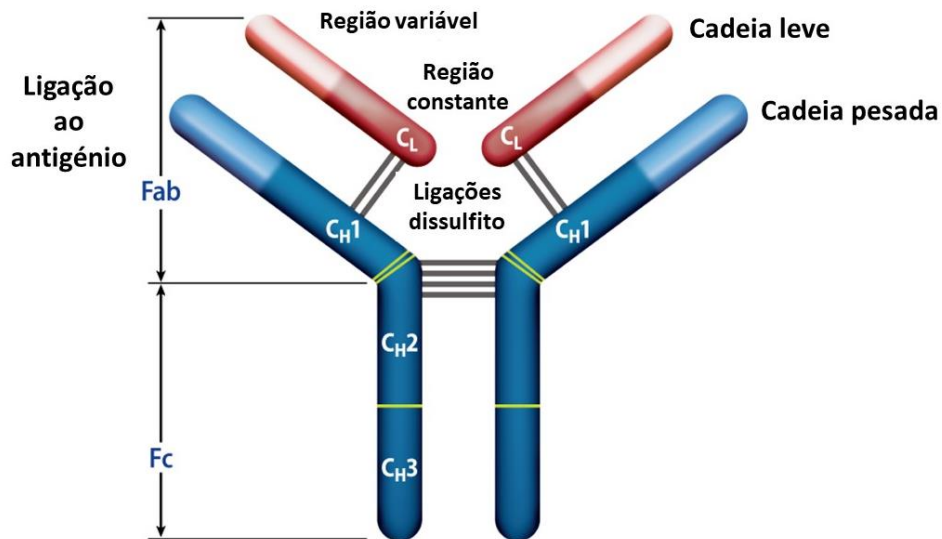


Figura 1: Estrutura de uma imunoglobulina. Imagem adaptada da fundação internacional de mieloma.: [mieloma.org](http://mieloma.org).

Tal como os plasmócitos normais, os plasmócitos clonais têm a capacidade de produzir os 5 isótipos de cadeia pesada, sendo a mais comum o isotipo IgG. No entanto, nos casos patológicos, esta produção de imunoglobulina é descontrolada gerando níveis de Ig específica muito acima dos valores normais de referência. Em alguns casos, estes plasmócitos produzem apenas cadeias leves originando o MM de cadeias leves. Quando não produzem nenhum tipo de cadeia leve ou pesada temos uma entidade chamada de MM não secretor. (8)

## 1.2. Tipos de mieloma múltiplo

Quase todos os doentes com mieloma múltiplo evoluem de um estadió pré-maligno assintomático denominado gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI).(14,15) A GMSI está presente em mais de 3% da população acima dos 50 anos e evolui para mieloma múltiplo ou malignidade relacionada a uma taxa de 1% ao ano.(16) Como a GMSI é assintomática, mais de 50% dos indivíduos que são diagnosticados com

GMSI tiveram a condição por mais de 10 anos antes do diagnóstico clínico. (6,17) O seu diagnóstico é muitas vezes feito pela realização de análises de rotina através de uma EPS. Em alguns doentes, um estadio pré-maligno intermediário, assintomático, mas mais avançado, referido como mieloma múltiplo latente (MML) pode ser reconhecido clinicamente. O MML progride para mieloma múltiplo a uma taxa de aproximadamente 10% ao ano nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, 3% ao ano nos próximos 5 anos e 1,5% ao ano a partir dos 10 anos. (18)

Doentes com MML são distinguidos pelo risco de progressão, os de baixo risco (5% por ano de risco de progressão) e de alto risco de progressão (25% por ano de risco de progressão nos primeiros 2 anos). (19) Os primeiros estudos em MML não conseguiram mostrar uma vantagem da intervenção precoce (20,21), no entanto em um ensaio recente realizado em Espanha descobriu que doentes com MML de alto risco tiveram benefício quando tratados precocemente, sendo que a taxa de sobrevivência em 3 anos passou para 94% sendo que nos não tratados foi de 80%. (22)

O MM não secretor representa de 1 a 5% do total de MM diagnosticados. Neste caso os plasmócitos clonais produzem muito pouca ou nenhuma proteína monoclonal de qualquer tipo. Dado que tanto a EPS como a eletroforese de proteínas na urina (EPU) são negativas (sem componente monoclonal no soro ou na urina), a doença é monitorizada através das cadeias leves livres (CLL). (19)

O mieloma múltiplo de cadeias leves (MMCL) é uma variante do MM, caracterizada pela produção excessiva de cadeias leves de Igs, cadeias leves kappa ou lambda, sem produção de cadeias pesadas correspondentes. Este tipo de mieloma representa cerca de 15–20% dos casos de MM e apresenta características clínicas e laboratoriais distintas que influenciam no diagnóstico, monitorização e prognóstico da doença. (6,23)

No MMCL, os plasmócitos malignos na medula óssea secretam predominantemente CLL de Igs, que podem ser detectadas no soro e/ou na urina dos doentes. A produção excessiva de CLL resulta na formação de complexos de cadeias leves que podem precipitar nos túbulos renais, levando à nefropatia associada a mieloma, uma complicação renal significativa e comum no MMCL. (23,24)

O mieloma múltiplo de cadeia intacta (MMCI) é a forma mais comum de MM, uma neoplasia plasmocitária caracterizada pela produção excessiva de imunoglobulinas intactas, que

incluem duas cadeias pesadas ligadas a duas cadeias leves. Esta condição representa cerca de 80% dos casos de MM. (5,6)

No MMCI, os plasmócitos malignos na medula óssea produzem imunoglobulinas completas, que podem ser do tipo IgG, IgA, IgM, IgD, ou, raramente, IgE, e que se encontram ligadas a uma cadeia leve kappa ou lambda. (25)

### **1.3. Mieloma múltiplo e o sistema imunológico**

Os fatores genéticos e relacionados ao sistema imunológico desempenham um papel na patogênese tanto das gamopatias monoclonais benignas quanto do MM. (26) Modelos de progressão e estratificação de risco foram desenvolvidos tanto para MGUS como para MM latente. (27,28) A imunoparésia, hipogamaglobulinémia da imunoglobulina não envolvida, e a porção alterada das CLLs são parâmetros utilizados nestes modelos. Sugere-se, assim, que a disfunção imunológica é um indicador e pode ter um papel na progressão da doença precursora do MM. Além da diminuição da imunidade humoral, há também literatura que tem caracterizado alterações em outros componentes do sistema imunológico tanto na doença precursora quanto no MM. (27–29)

Vários estudos discutiram a importância do microambiente tumoral no desenvolvimento do MM. (30) O termo microambiente é amplo e inclui vários tipos de células, incluindo células do sistema imunológico, com funções biológicas variadas.

As células “natural killer” (células NK) e células T, incluindo células T convencionais, células T “natural killer” (células NKT), células  $\gamma \delta$ -T e células T reguladoras (Tregs), influenciam na patogênese da doença. As suas atividades normalmente citotóxicas contra células tumorais são essenciais para o desenvolvimento de imunoterapias. (31)

As células NK formam um subconjunto distinto do sistema imunológico celular que surge de progenitores linfóides e está envolvido na defesa contra células infectadas por vírus e transformadas por tumor. Foram identificadas pela primeira vez devido à sua capacidade de atingir células tumorais sem necessidade de preparação, o que contrasta com as células T. Em humanos, as células NK são amplamente definidas como linfócitos CD3(-)CD56(+), mas expressam níveis variados de outros receptores de superfície que determinam suas funções citotóxicas e imunorreguladoras. (32)

Doentes com MM não tratados em estádios iniciais da doença geralmente apresentavam um aumento ou nenhuma alteração no número de células NK (33) enquanto doentes com MM não tratados em estádios mais avançados da doença mostraram uma diminuição no

número de células NK. (34) Doentes com GMSI também não apresentaram alterações no número de células NK, sugerindo que alterações no número de células NK são observadas mais tarde no curso da doença. (33,34)

Além disso, doentes com MM com menor citotoxicidade de células NK apresentam pior sobrevida livre de doença do que aqueles com maior citotoxicidade de células NK. (35) Estes achados de células NK alteradas e seu potencial significado prognóstico apoiam a exploração de subconjuntos de células NK como biomarcadores imunológicos para MM ou suas condições precursoras. (31)

Estudos sobre a funcionalidade das células NK na doença também são significativos, considerando que os novos anticorpos monoclonais (mAbs) desenvolvidos para terapia do MM, como elotuzumab e daratumumab, dependem de citotoxicidade celular dependente de anticorpos mediado por células NK. (36–39) A dexametasona e drogas imunomoduladoras, como lenalidomida e pomalidomida, também exercem alguns de seus efeitos anti-MM por meio do aumento da atividade citotóxica das células NK contra células tumorais. (39)

As células T estão alteradas quantitativa e funcionalmente no MM e, conseqüentemente, têm um papel na imunodeficiência associada à doença. (40) Tanto no MM quanto nas suas condições precursoras, há uma diminuição na proporção de células T CD4(+)/CD8(+) no sangue periférico (SP), que se deve à diminuição no número de células T CD4(+) e ao aumento no número relativo de células T CD8(+). (33,41,42) Além disso, foi demonstrado que a proporção de células T CD4(+)/CD8(+) SP diminui com a progressão da doença, com a diminuição de células T CD4(+), aumento da carga tumoral e como um sinal independente de mau prognóstico. (41,43)

Um aumento nas células T auxiliares tipo 1 (Th1) na medula óssea (MO) também foi observado em doentes com GMSI e MM e é consistente com os achados de uma relação Th1/Th2 aumentada observada no SP de doentes com MM. (42,44)

As células T  $\gamma \delta$  compreendem um pequeno subconjunto de células T que se distinguem pelos seus recetores de células T e pelos seus mecanismos efetores distintos, que incluem características inatas e adaptativas. As células T  $\gamma \delta$  são, geralmente encontradas em tecidos e não no SP. (45) No entanto, não foram encontradas diferenças quantitativas nas células T  $\gamma \delta$  no SP ou na MO de doentes GMSI e MM em comparação com controles saudáveis. (33,46) As células T  $\gamma \delta$  possuem potencial imunoterapêutico devido à sua capacidade de atuar simultaneamente como células apresentadoras de antígenos,

localizar-se em tecidos alvo e expandir-se rapidamente e efetuar respostas imunes específicas de antígeno contra células alvo. (45)

As células T reguladoras (Tregs) como principais supressores das respostas imunes, desempenham papéis essenciais na homeostase funcional do sistema imunológico. Devido à sua heterogeneidade fenotípica e funcional, os estudos têm frequentemente utilizado diferentes definições para Tregs, que incluem positividade para CD25, CD127, FoxP3 ou combinações destes. (47) Os doentes com cancro geralmente apresentam um conjunto aumentado e funcional de Tregs no SP, o que sugere que as Tregs podem ter um papel no estado imunossupressor associado à carcinogênese no MM. (48)

#### **1.4. Influência da genética no mieloma múltiplo**

O evento inicial que desencadeia o desenvolvimento maligno é a obtenção de hiperdiploidia ou uma translocação envolvendo o locus gênico da cadeia pesada da imunoglobulina. (49) Tais eventos clonais podem ocorrer em quase todas as células e estão presentes nas condições precursoras da GMSI e do MML. As translocações etiológicas indicam que os oncogenes são regulados pelo intensificador do gene da cadeia pesada da imunoglobulina; a translocação t(4;14) desregula MMSET (também conhecido como NSD2) e FGFR3, t(6;14) CCND3, t(11;14) CCND1, t(14;16) MAF e t(14;20) MAFB. (50) Eventos genéticos adicionais são encontrados em populações subclonais e com maior frequência à medida que a doença progride de uma condição precursora para MM. Os eventos genéticos adquiridos incluem alteração no número de cópias, translocações secundárias e mutações somáticas. Muitos destes eventos genéticos convergem para desregular o ciclo celular. (51)

Alteração no número de cópias resultam em regiões cromossômicas de perda ou ganho. A perda de genes supressores de tumor resulta de uma deleção (del) do braço curto ou longo do cromossoma. O ganho no braço longo do cromossoma 1 é encontrado em cerca de 40% dos doentes, frequentemente em associação com t(4;14). (52) As translocações secundárias comuns envolvem MYC, seja via t(8;14) ou sem envolver o gene da cadeia pesada da imunoglobulina. (52) As taxas de mutação somática são altamente variáveis entre os doentes, (52) e ocorrem mais frequentemente em genes da via RAS/MAPK; cerca de 50% dos doentes apresentam essa mutação (KRAS 22%, NRAS 17%, BRAF 8%). Outros genes comumente mutados incluem TERT (anteriormente conhecido como FAM46C) e DIS3, em cerca de 10% dos doentes. (53)

Os eventos adquiridos colaboram com o fator subjacente da patogênese, em frequências diferentes em cada subgrupo etiológico. Tanto os eventos genéticos iniciais quanto os adquiridos têm importantes implicações prognósticas e terapêuticas, com resultados adversos associados (54,55)

As principais alterações genéticas ocorrem no início da evolução da doença, com menos alterações identificadas entre o mieloma múltiplo latente e o mieloma múltiplo do que entre GMSI e o MML. (56) Assim, a transição para uma doença que requer terapia pode ser parcialmente motivada por alterações no microambiente da MO. Neste contexto, a MO é a pressão seletiva darwiniana que exerce influência sobre a população clonal. (57)

### **1.5. Diagnóstico e monitorização**

De acordo com os critérios do *International Myeloma Working Group (IMWG)* para o diagnóstico de MM é necessária a presença de um ou mais eventos definidores de mieloma múltiplo (EDM), além de evidências de 10% ou mais de plasmócitos clonais no exame da MO ou de um plasmocitoma comprovado por biópsia.

Os EDM consistem em características definidas por CRABs (hipercalcemia (C), insuficiência renal (R), anemia (A), lesões líticas (B)), bem como 3 biomarcadores específicos: plasmócitos clonais na MO  $\geq 60\%$ , razão sérica de CLL  $\geq 100$  (desde que o nível de CCL envolvida seja de  $\geq 100$  mg/L) e mais de uma lesão óssea focal (lesão lítica) na ressonância magnética. A presença de pelo menos um desses biomarcadores específicos é considerada suficiente para o diagnóstico de MM, independentemente da presença ou ausência de sintomas ou características de CRAB. Cada um dos novos biomarcadores está associado a um risco de aproximadamente 80% de progressão para lesão sintomática de órgão alvo.

O diagnóstico de GMSI inclui PM  $< 30$  g/L, plasmócitos  $< 10\%$  e ausência de sinais de CRABs. Para o MML devem ser considerados dois critérios: PM sérica (IgG ou IgA)  $> 30$  g/L ou PM urinária  $> 500$  mg/24h e/ou 10–60% de plasmócitos na medula óssea; e ausência de EDM. (11,23,57,58)

Tabela 1: Critérios de diagnóstico do IMWG para MM e doenças relacionadas

### CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO DO IMWG PARA MM E DOENÇAS RELACIONADAS

<b>GMSI</b>	PM < 30 g/L Plasmócitos na medula < 10% Ausência de critérios de CRABs
<b>MML</b>	Conter 2 destes critérios: - PM sérica ≥ 30 g/L ou - PM urinária ≥ 500 mg/24h ou - Plasmócitos na medula 10-60% Ausência de EDM
<b>MM</b>	Presença ≥ 10% de plasmócitos na medula Evidência de sintomas de CRABs: - Hipercalemia: cálcio sérico > 1 mg/dL ao limite superior normal ou > 11 mg/dL - Insuficiência renal: clearance da creatinina < 40 mL/min ou creatinina sérica > 2 mg/dL - Anemia: hemoglobina < 100 g/L ou ≥ 20 g/L abaixo do limite inferior normal - Lesões ósseas: uma ou mais lesões osteolíticas confirmadas por exames de imagem Presença de um ou mais dos seguintes biomarcadores de malignidade: - Plasmócitos na medula ≥ 60% - Rácio de CLL entre a cadeia envolvida e não envolvida ≥ 100 mg/L - Presença de mais do que uma lesão óssea comprovada por ressonância magnética (são consideradas as lesões com tamanho ≥ 5 mm)

O diagnóstico de MM deve incluir testes de triagem e exames complementares para confirmação de diagnóstico. Os testes de triagem incluem um hemograma completo, testes bioquímicos (ureia, creatinina, cálcio e albumina), EPS, CLL e radiografia de áreas sintomáticas. (3,8) Usados em conjunto, a maioria dos MMs são detectados com alta sensibilidade (94,3%). No caso de MM com alta carga tumoral a sensibilidade é superior a 99,5%. (11) Os exames para confirmação de diagnóstico incluem o aspirado medular com biópsia para realização de mielograma e outros estudos (estudo imunofenotípico, genético e anatomopatológico), exames de imagem, IFS e imunofixação de urina (IFU). (3,11) Se a PM for detectada através de EPS, EPU ou por razão alterada de CLL e a contagem de plasmócitos na medula for maior ou igual a 10%, é feito o diagnóstico de MM. O mesmo se aplica a doentes com menos de 10% de plasmócitos, mas com PM maior ou igual a 30 g/L. Em doentes com mieloma múltiplo não secretor, o diagnóstico é baseado na presença de mais de 30% de plasmócitos na MO ou detecção de plasmocitoma na biópsia. (8)

Estudos de MO no momento do diagnóstico inicial devem incluir sondas fluorescentes de hibridização in situ (FISH) projetadas para detectar t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14), t(14;20), trissomias e del(17p). (59)

A monitorização do MM envolve uma variedade de testes para avaliar a progressão da doença, resposta ao tratamento e possíveis recaídas. Estes testes incluem EPS para quantificação da PM por densitometria, doseamento de CLL e IFS quando a PM deixa de ser visível na EPS. No entanto, a EPS apresenta algumas limitações, tais como a deteção de proteínas com baixas concentrações, a co-migração com outras proteínas e quantificação subjetiva dependente do operador. (60–63) A principal desvantagem da EPS é sua incapacidade de distinguir entre Igs monoclonais e policlonais, o que é particularmente importante durante as avaliações de seguimento, pois o agravamento da doença está associado a um aumento da PM e uma diminuição de Igs policlonais.

No entanto, em relação à prática diagnóstica, a EPS continua a fazer parte dos critérios de avaliação de resposta. (60) No que diz respeito à IFS, esta metodologia tem uma execução manual o que requer habilidade técnica e experiência do operador, pode ter uma interpretação subjetiva, não permite uma quantificação precisa da PM e pode ter interferência com outras substâncias, como por exemplo anticorpos monoclonais terapêuticos. Para colmatar estas limitações há a necessidade de complementar os estudos com outros testes. (1,6,11,64)

### **1.6. Ensaio cadeia pesada/leve das imunoglobulinas**

O imunoensaio Hevylite® (Binding Site, Birmingham, Reino Unido) (HLC) é uma metodologia alternativa para avaliação de proteínas monoclonais, a quantificação é feita uma vez que os anticorpos do imunoensaio identificam os epítomos específicos entre as cadeias pesadas/leves quando ambas as cadeias estão juntas. Este teste funciona como um biomarcador das cadeias leves  $\kappa$  ou  $\lambda$  ligadas à cadeia pesada dos três diferentes tipos de imunoglobulinas e está disponível para os pares IgG  $\kappa$  , IgG  $\lambda$  , IgA  $\kappa$  , IgA  $\lambda$  , IgM  $\kappa$  e IgM  $\lambda$  . Este teste permite a quantificação precisa de Igs monoclonais (envolvidas) e policlonais do mesmo isótipo (não envolvidas). A clonalidade é avaliada calculando o rácio entre Ig  $\kappa$  e a Ig  $\lambda$  , se estiver dentro dos intervalos de normalidade significa que não há evidências de monoclonalidade. Se estiver alterado existem evidências que há um processo monoclonal a ocorrer. (64)

Semelhante ao teste de CLL sérico, o ensaio de HLC pode fornecer uma medida sensível da clonalidade através do rácio HLC (rHLC) e a HLC envolvida (iHLC) fornece a concentração da PM em doentes que secretam Igs monoclonais intactas. A sensibilidade diagnóstica global do rHLC é próxima de 99% em MM de Ig intacta. (62,65–70)

O ensaio HLC tem demonstrado que pode ser usado para avaliação de prognóstico e resposta terapêutica em doentes com MM, bem como em outras gamopatias monoclonais. Este ensaio mede também os níveis da cadeia Ig não envolvida que serve como parâmetro de avaliação de supressão, que é um biomarcador independente do estado clínico. O ensaio HLC é um teste sérico laboratorial rápido, simples e sensível que pode ser realizado por métodos nefelométricos ou turbidimétricos. Além disso, os resultados quantitativos evitam a interpretação subjetiva da EPS e da IFS.(64)

As Diretrizes do IMWG, juntamente com relatórios científicos, afirmam que o teste de HLC tem um papel importante a desempenhar em todo o seguimento de um doente com MM, desde o diagnóstico até à avaliação da resposta à terapia. (60,61,71,72)

As diretrizes do IMWG afirmam que para doentes com PM mensurável no soro, tanto estudos eletroforéticos quanto quantificação Igs são recomendados para avaliar a resposta, embora testes eletroforéticos sejam preferidos para seguir a PM. (23) No entanto, em muitos casos, as PMs IgA não são quantificáveis por EPS. (62,63,73) Para muitas dessas amostras, a co-migração da proteína monoclonal IgA com outras proteínas séricas na região  $\beta$  (73) impede a quantificação precisa da PM pela EPS. Por essa razão, o IMWG reconhece as limitações da eletroforese, e afirma que "Para vários doentes, especialmente com mieloma IgA ou IgD, a quantificação nefelométrica de imunoglobulina sérica é necessária". (57) No entanto, a quantificação da cadeia clonal de IgA por nefelometria ou turbidimetria, que naturalmente compreende Igs monoclonais e policlonais, não reflete com precisão a carga tumoral. Por essa razão, há necessidade de encontrar novos indicadores que reflitam com mais precisão a carga tumoral da doença e a resposta ao tratamento. (73)

## 2. Métodos

Neste trabalho estudou-se um grupo de doentes com MM, previamente tratados, que apresentaram um reaparecimento da banda monoclonal na IFS. Foram seleccionados 40 doentes nas condições pretendidas, denominada de recaída bioquímica.

Este estudo inclui 80 amostras de 40 doentes seguidos na instituição por MM, com recaída bioquímica entre 2018 e 2022, correspondendo a duas amostras por doente. O grupo de amostras 1 corresponde às amostras que antecedem as recaídas (IFS negativa) e o grupo de amostras 2 às recaídas bioquímicas (IFS positiva).

Os pares de imunoglobulina HLC ( $IgG \kappa / IgG \lambda$  e  $IgA \kappa / IgA \lambda$ ) foram determinados, em amostras congeladas, usando anticorpos policlonais direccionados a epítomos juncionais únicos entre regiões constantes de cadeia pesada e de cadeia leve de Ig intacta (Hevylite®, Binding Site, Birmingham, Reino Unido) no equipamento Optilite® (Binding Site, Birmingham, Reino Unido). As determinações desses parâmetros foram utilizadas para calcular os rácios  $IgG \kappa / IgG \lambda$  e  $IgA \kappa / IgA \lambda$ , que foram comparadas com os intervalos de referência. Razões de HLC fora do intervalo de referência foram consideradas indicativas de monoclonalidade.

Nas amostras em que não se tinham os resultados de ELP, IFS e CLL, estes foram determinados. Nas amostras com PM na ELP não foi realizada a IFS visto que a PM já tinha sido caracterizada ao diagnóstico.

A eletroforese capilar foi realizada no equipamento Minicap® (Sebia, Lisses, França), a IFS no equipamento Hydrasys® (Sebia, Lisses, França) e as CLL no equipamento Optilite® (Binding Site, Birmingham, Reino Unido).

### 3. Resultados

Dos 40 doentes 26 são do sexo masculino e 14 do sexo feminino, com uma média de idade de 65 anos (40-83 anos), 26 doentes com MM do tipo IgG e 14 do tipo IgA. A média de tempo que decorreu entre a amostra 1 e 2 foi de 4,7 meses (1-12 meses).

Nas amostras que antecedem a recaída (grupo 1 (G1)) todas com EPS e IFS negativas, com rácios de HLC e CLL alterados com 18% e 33% respetivamente. Em 40 % das amostras foi verificado a alteração de pelo menos um dos rácios.

Nas amostras das recaídas bioquímicas (grupo 2 (G2)) das 40 amostras 17 (43%) apresentavam PM doseável na EPS (média da PM = 4.4 g/L) e as restantes 23 (57%) tinham IFS positiva com EPS negativa, com rácios de HLC e CLL alterados em 43% e 58% dos doentes, respetivamente. Em 68 % das amostras foi verificado a alteração de pelo menos um dos rácios.

O componente monoclonal presente nas amostras do grupo 2 corresponde em todos os doentes a uma imunoglobulina intacta (IgG ou IgA), excluindo do estudo todas as recaídas bioquímicas de macroglobulinémias (IgM) e com produção exclusiva de cadeia leve livre.

Dezasete amostras com PM mensurável na EPS com uma média de 4.4 g/L (1-19.9 g/L), a iHLC para as mesmas amostras apresenta uma média de concentração de 8.9 g/L (2.2-22.7 g/L). Relativamente à identificação de monoclonalidade 10 amostras (60%) mostraram alterações rHLC, 12 (70%) do rácio de cadeias leves livres (rCLL), e 13 (77%) apresentavam pelo menos um dos rácios alterados.

Dez amostras apresentavam migração da PM na região  $\beta$ , destas apenas 3 tinham PM mensurável na EPS, 5 amostras apresentaram alteração da iHLC e 6 alteração do rHLC.

Na tabela 2 estão representados os resultados das EPS, IFS, rCLL e rHLC por grupo de amostras e por tipo de Ig.

Na figura 2 estão representados os resultados de EPS, IFS, rCLL e rHLC de três doentes pertencentes ao estudo, referentes às amostras de pré recaída e amostra de recaída.

Tabela 2: Resultados das EPS, IFS, rCLL e rHLC por grupo de amostras e por tipo de Ig

TESTE	RESULTADO	GRUPO 1 (40)	GRUPO 1 IGG (26)	GRUPO 1 IGA (14)	GRUPO 2 (40)	GRUPO 2 IGG (26)	GRUPO 2 IGA (14)
ELS	NEGATIVA	40 (100%)	26 (100%)	14 (100%)	23 (57%)	15 (58%)	8 (57%)
	POSITIVA	0	0	0	17 (43%)	11 (42%)	6 (43%)
IFS	NEGATIVA	40 (100%)	26 (100%)	14 (100%)	0	0	0
	POSITIVA	0	0	0	40 (100%)	26 (100%)	14 (100%)
rHLC	NORMAL	33 (82%)	22 (85%)	11 (79%)	23 (57%)	19 (73%)	4 (29%)
	ALTERADA	7 (18%)	4 (15%)	3 (21%)	17 (43%)	7 (27%)	10 (71%)
rCLL	NORMAL	27 (67%)	19 (73%)	8 (57%)	17 (42%)	14 (54%)	3 (21%)
	ALTERADA	13 (33%)	7 (27%)	6 (43%)	23 (58%)	12 (46%)	11 (79%)
rHLC + rCLL ALTERADO PELO MENOS 1 RÁCIO ALTERADO		4 (10%)	2 (8%)	2 (14%)	13 (33%)	5 (19%)	8 (57%)
		16 (40%)	9 (35%)	7 (50%)	27 (68%)	14 (54%)	13 (93%)

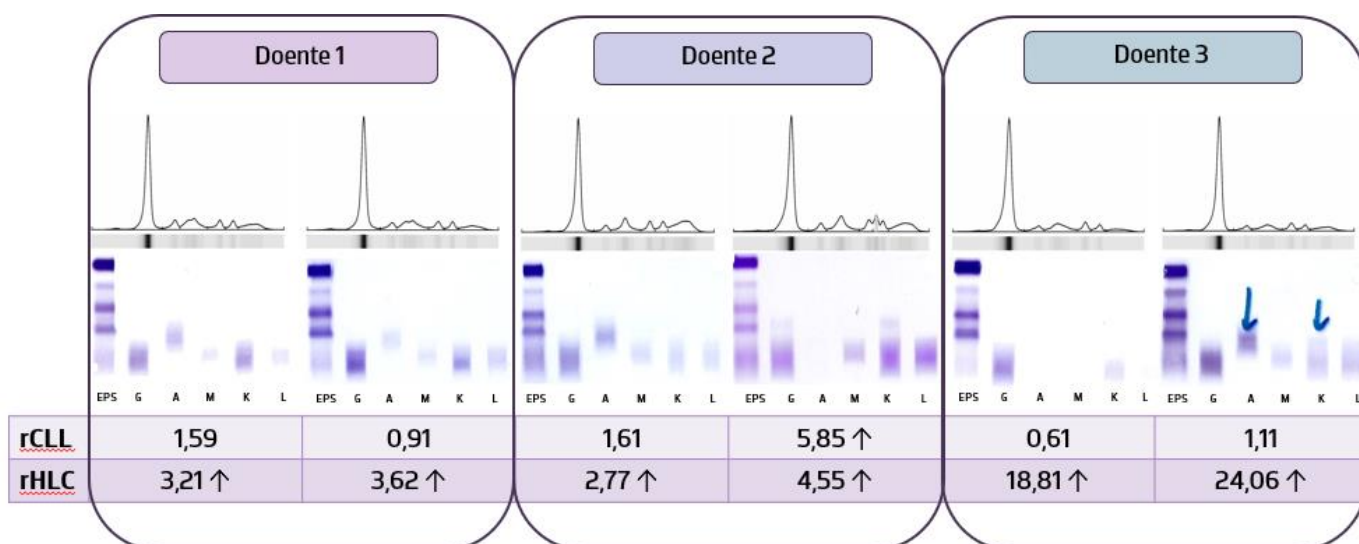


Figura 2: Resultados de EPS, IFS, rCLL e rHLC de 3 doentes, das amostras pré-recaída e recaída. Valores de referência: rCLL normal (0,26-1,65); rGK/GL normal (0,98-2,75); rAK/AL normal (0,91-2,42)

#### 4. Discussão

O MM é uma neoplasia de células plasmáticas com patogénese molecular complexa e incompletamente resolvida, estrutura subclonal complexa e diversidade intraclonal, com significativa diversidade clínico-laboratorial, genética e biológica. (74)

A quantificação precisa da PM é fundamental para a formação de um diagnóstico diferencial, avaliar a resposta à terapia (75), deteção precoce de recaídas, bem como para definir a reconstituição do sistema imune em doentes submetidos a transplante de medula óssea (76). Os testes de rotina convencionais incluem EPS e IFS, que em determinadas situações, carecem de sensibilidade e especificidade. Por outro lado, os avanços atuais em biologia molecular e citogenética levaram a um grande avanço no desenvolvimento de novas tecnologias e altamente resolutivas, embora não sejam facilmente acessíveis a todos os doentes, confirmando a necessidade de marcadores séricos rápidos, confiáveis e padronizados (77).

Nas amostras do grupo 1, com EPS e IFS ambas negativas, constatou-se que apresentavam rHLC e rCLL alterados com 18% e 33%, respetivamente. Ao empregar ambos os rácios, verificou-se que 40% das amostras do grupo 1 manifestaram pelo menos um dos rácios alterados, demonstrando que em 40% dos doentes os rácios de HLC e CLL detetaram as recaídas bioquímicas precocemente, antes da recaída se tornar perceptível pelos métodos convencionais (EPS e IFS).

Os rácios CLL frequentemente estão de acordo com os rácios HLC, mas em alguns doentes os resultados foram discordantes. Este achado reforça a variabilidade na evolução clonal durante o curso do MM e destaca a emergência de vários clones. O clone original pode persistir como clone único, mas provavelmente surgem subclones com capacidade truncada para produção de imunoglobulinas intactas que podem produzir cadeias leves ou apenas imunoglobulinas intactas (cadeias pesadas e leves). (78)

Nas amostras do grupo 2, em que foi detetada PM na ELS ou IFS, 43% tinham PM doseável na EPS e a mesma percentagem de doentes (43%) apresentaram rHLC alterado, evidenciando que a sensibilidade da EPS e rHLC foi a mesma neste grupo de doentes, para a deteção de recaída bioquímica. Ao considerarmos os rácios HLC e CLL, constatou-se que 68% dos doentes do grupo 2 apresentaram alterações em pelo menos um dos rácios, refletindo uma boa sensibilidade, especialmente considerando que as PM nestas amostras eram muito reduzidas (média PM= 4.4 g/L).

Ainda nas amostras do grupo 2, dos MM do tipo IgA 71% apresentaram rHLC alterado e 93% mostraram alteração de pelo menos um dos raios (HLC e CLL), mostrando uma sensibilidade muito superior ao da EPS apenas com 43% de amostras com PM visível. Esta observação sugere que poderia ser útil monitorizar os doentes com HLC e CLL para acompanhar a evolução de clones que secretam diferentes tipos de PMs, como sugerido por Gagliardi et al. (79).

Este estudo mostra que o ensaio de HLC pode superar uma importante limitação do doseamento da PM com técnicas convencionais. As PMs de doentes com mielomas IgA frequentemente migram na região  $\beta$  da EPS, onde são disfarçadas por proteínas como a transferrina, lipoproteína  $\beta$  e C3, o que impossibilita a quantificação através da EPS. Este problema ocorreu em 36% dos doentes com IgA com migração da PM na região  $\beta$  em que não foi possível o doseamento da PM através da EPS. Uma observação semelhante foi relatada anteriormente por Wang et al. e por Avet-Loiseau et al., que não foram capazes de quantificar os níveis de PM do tipo IgA através da EPS em 57% e 33% dos seus doentes, respectivamente.

Outra vantagem importante do ensaio de HLC é sua capacidade de detectar clonalidade em baixas concentrações de PM, foi o que aconteceu neste estudo, com uma média de PM de 4.4g/L. Isso não pode ser alcançado com doseamentos de Igs totais, pois esses ensaios são incapazes de distinguir entre a Ig envolvida e não envolvida do respectivo isotipo. A EPS, particularmente o EPS capilar, pode fornecer doseamentos mais confiáveis, mas tem limitações importantes na atribuição da fração da PM a uma banda específica, por exemplo, quando a PM é polimerizada e, portanto, espalhada por uma distância maior na curva da eletroforese. (63)

No grupo 2 foi observado rHLC normal em 57% dos doentes com IFS positiva. A justificação para este facto pode ser que em doentes que respondem à terapia terão uma produção aumentada de Igs policlonais que, na presença de baixos níveis de imunoglobulina monoclonal, podem produzir um rHLC normal.

Na figura 2, estão representados resultados de EPS, IFS, rCLL e rHLC de 3 doentes pertencentes ao estudo, com resultados das amostras pré-recaída e recaída. Nos 3 doentes os rHLC demonstraram monoclonalidade nas amostras pré-recaída ou seja antes da EPS e IFS.

Ainda na figura 2, nas amostras das recaídas, a EPS foi positiva apenas no doente 2, com a PM a migrar na região  $\beta$ , sendo de difícil identificação. Os resultados de IFS são positivas nos 3 doentes no entanto com uma positividade fraca que pode levar a interpretações distintas.

A confirmação destes achados em coortes maiores de doentes é de extrema importância, uma vez que uma detecção precoce de recaídas, seguida de uma intervenção terapêutica precoce, poderia evitar complicações clínicas.

Uma das limitações do estudo prende-se no facto de se ter selecionado as recaídas bioquímicas pelos resultados das IFS, do estudo ser retrospectivo e de estarmos restritos às amostras existentes. Um estudo prospetivo e bem estruturado seria necessário para retirarmos conclusões mais abrangentes.

## 5. Conclusão

Este trabalho demonstrou que até ao momento, nenhum teste laboratorial único pode ser usado com segurança para obter todas as informações necessárias para o diagnóstico, prognóstico, monitorização e avaliação da resposta no MM.

O ensaio HLC é um método validado, automatizado e fácil de usar para quantificação de PM que supera diversas limitações técnicas bem conhecidas associadas aos métodos eletroforéticos convencionais. Por esta razão, foi proposto que o ensaio HLC pudesse substituir todos os ensaios atuais (EPS, IFS e IgA total) em doentes com MM IgA com PM com migração  $\beta$ . Benefícios semelhantes também foram descritos para doentes com PM IgG e IgM com a mesma migração  $\beta$ . (80)

As evidências científicas em apoio às HLC mostram que tem maior sensibilidade, fornecendo resultados quantitativos mesmo na ausência de PM detetável pela EPS; além disso, pode esclarecer padrões duvidosos da IFS. (63,80)

Potencialmente, as HLC poderão tornar-se parte de um painel de parâmetros necessários para apoiar a intenção de tratar antes da observação de uma expansão clonal grave acompanhada pelo agravamento dos sintomas. Todos esses parâmetros caminham na mesma direção dos critérios do IMWG recentemente atualizados para o diagnóstico de MM, introduzindo o conceito de "eventos definidores do mieloma múltiplo", que se devem tornar tão importantes quanto os sintomas de CRABs (cálcio elevado, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas). (19,60)

Certamente, mais evidências serão necessárias antes da implementação de tal mudança paradigmática. No entanto, os benefícios da combinação das CLL e HLC em doentes com MM já são visíveis. A esse respeito, vários estudos têm demonstrado claramente as vantagens da avaliação das CLL e das HLC em relação aos testes convencionais, poderão fornecer suporte válido para ilustrar o impacto benéfico destes ensaios na utilização clínica e laboratorial para a deteção de recaída bioquímica em doentes com MM.

## Referências Bibliográficas

1. Albagoush SA, Shumway C, Azevedo AM. Multiple Myeloma. Em: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citado 4 de novembro de 2023]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534764/>
2. Ríos-Tamayo R, Puig N, Algarín M, García de Veas Silva JL, Barbosa N, Encinas C, et al. The Current Role of the Heavy/Light Chain Assay in the Diagnosis, Prognosis and Monitoring of Multiple Myeloma: An Evidence-Based Approach. *Diagnostics*. 30 de outubro de 2021;11(11):2020.
3. Multiple Myeloma: Risk Factors, Diagnosis, and Treatments [Internet]. [citado 9 de dezembro de 2023]. Disponível em: <https://web.s.ebscohost.com/ehost/ebookviewer/ebook/ZTAwMHh3d19fODYzMDM1X19BTg2?sid=71df0115-45d9-4836-9abe-f7ce3b557753@redis&vid=2&format=EB&rid=1>
4. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C, et al. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nat Commun*. 16 de agosto de 2017;8:268.
5. Donk NWCJ van de, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *The Lancet*. 30 de janeiro de 2021;397(10272):410–27.
6. Rajkumar SV. Multiple Myeloma: 2016 update on Diagnosis, Risk-stratification and Management. *Am J Hematol*. julho de 2016;91(7):719–34.
7. International Myeloma Foundation [Internet]. 2021 [citado 5 de julho de 2024]. What Is Multiple Myeloma? Disponível em: <https://www.myeloma.org/what-is-multiple-myeloma>
8. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M. Multiple myeloma. *The Lancet*. maio de 2015;385(9983):2197–208.
9. Regelink JC, Minnema MC, Terpos E, Kamphuis MH, Raijmakers PG, Pieters – van den Bos IC, et al. Comparison of modern and conventional imaging techniques in establishing multiple myeloma-related bone disease: a systematic review. *Br J Haematol*. 2013;162(1):50–61.
10. Short KD, Rajkumar S, Larson D, Buadi F, Hayman S, Dispenzieri A, et al. Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*. junho de 2011;25(6):906–8.
11. Cárdenas MC, García-Sanz R, Puig N, Pérez-Surribas D, Flores-Montero J, Ortiz-Espejo M, et al. Recommendations for the study of monoclonal gammopathies in the clinical laboratory. A consensus of the Spanish Society of Laboratory Medicine and the Spanish Society of Hematology and Hemotherapy. Part II: Methodological and clinical recommendations for the diagnosis and follow-up of monoclonal gammopathies. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 27 de novembro de 2023;61(12):2131–42.

12. Kraj M, Kruk B, Szczepiński A, Warzocha K. Comparison of immunoglobulin free light chain (FLC), heavy chain/light chain (HLC) assays and immunofixation (IFE) in assessment of remission in multiple myeloma. *Acta Haematol Pol.* maio de 2012;43(2):122–31.
13. International Myeloma Foundation [Internet]. [citado 4 de julho de 2024]. Types of Myeloma. Disponível em: <https://www.myeloma.org/types-of-myeloma>
14. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 28 de maio de 2009;113(22):5412–7.
15. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood.* 28 de maio de 2009;113(22):5418–22.
16. Dispenzieri A, Katzmann JA, Kyle RA, Larson DR, Melton LJ, Colby CL, et al. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet.* 15 de maio de 2010;375(9727):1721–8.
17. Therneau TM, Kyle RA, Melton LJ, Larson DR, Benson JT, Colby CL, et al. Incidence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Estimation of Duration Before First Clinical Recognition. *Mayo Clin Proc.* novembro de 2012;87(11):1071–9.
18. Rajkumar S, Gupta V, Fonseca R, Dispenzieri A, Gonsalves W, Larson D, et al. Impact of primary molecular cytogenetic abnormalities and risk of progression in smoldering multiple myeloma. *Leukemia.* agosto de 2013;27(8):1738–44.
19. Rajkumar SV, Landgren O, Mateos MV. Smoldering multiple myeloma. *Blood.* 14 de maio de 2015;125(20):3069–75.
20. Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E, Magnusson B, Rödger S, Westin J. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I – A randomized study. *Eur J Haematol.* 1993;50(2):95–102.
21. Grignani G, Gobbi PG, Formisano R, Pieresca C, Ucci G, Brugnatelli S, et al. A prognostic index for multiple myeloma. *Br J Cancer.* maio de 1996;73(9):1101–7.
22. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, Corral LL, et al. Lenalidomide plus Dexamethasone for High-Risk Smoldering Multiple Myeloma. *N Engl J Med.* 1 de agosto de 2013;369(5):438–47.
23. Dimopoulos MA, Merlini G, Bridoux F, Leung N, Mikhael J, Harrison SJ, et al. Management of multiple myeloma-related renal impairment: recommendations from the International Myeloma Working Group. *Lancet Oncol.* julho de 2023;24(7):e293–311.
24. Fotiou D, Dimopoulos MA, Kastiris E. Managing renal complications in multiple myeloma. *Expert Rev Hematol.* 1 de setembro de 2016;9(9):839–50.

25. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 28 de outubro de 2004;351(18):1860–73.
26. Kristinsson SY, Goldin LR, Björkholm M, Koshiol J, Turesson I, Landgren O. Genetic and immune-related factors in the pathogenesis of lymphoproliferative and plasma cell malignancies. *Haematologica*. novembro de 2009;94(11):1581–9.
27. Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, García-Sanz R, Mateos MV, De Coca AG, et al. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*. 1 de outubro de 2007;110(7):2586–92.
28. Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Therneau TM, Larson D, Benson J, et al. Immunoglobulin free light chain ratio is an independent risk factor for progression of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *Blood*. 15 de janeiro de 2008;111(2):785–9.
29. Feyler S, Selby PJ, Cook G. Regulating the regulators in cancer-immunosuppression in multiple myeloma (MM). *Blood Rev*. maio de 2013;27(3):155–64.
30. Balakumaran A, Robey PG, Fedarko N, Landgren O. Bone marrow microenvironment in myelomagenesis: its potential role in early diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn*. maio de 2010;10(4):465–80.
31. Dosani T, Carlsten M, Maric I, Landgren O. The cellular immune system in myelomagenesis: NK cells and T cells in the development of MM and their uses in immunotherapies. *Blood Cancer J*. abril de 2015;5(4):e306.
32. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. maio de 2008;9(5):503–10.
33. Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, García-Sanz R, Mateos MV, et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. janeiro de 2013;98(1):79–86.
34. Tienhaara A, Pelliniemi TT. Peripheral blood lymphocyte subsets in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin Lab Haematol*. 28 de junho de 2008;16(3):213–23.
35. Jurisic V, Srdic T, Konjevic G, Markovic O, Colovic M. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol*. 1 de setembro de 2007;24(3):312–7.
36. Tai YT, Horton HM, Kong SY, Pong E, Chen H, Cemerski S, et al. Potent in vitro and in vivo activity of an Fc-engineered humanized anti-HM1.24 antibody against multiple myeloma via augmented effector function. *Blood*. 1 de março de 2012;119(9):2074–82.
37. Collins SM, Bakan CE, Swartzel GD, Hofmeister CC, Efebera YA, Kwon H, et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation:

- evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol Immunother* CII. dezembro de 2013;62(12):1841–9.
38. Zonder JA, Mohrbacher AF, Singhal S, van Rhee F, Bensinger WI, Ding H, et al. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*. 19 de julho de 2012;120(3):552–9.
  39. Mentlik James A, Cohen AD, Campbell KS. Combination Immune Therapies to Enhance Anti-Tumor Responses by NK Cells. *Front Immunol*. 23 de dezembro de 2013;4:481.
  40. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. setembro de 2007;138(5):563–79.
  41. Koike M, Sekigawa I, Okada M, Matsumoto M, Iida N, Hashimoto H, et al. Relationship between CD4(+)/CD8(+) T cell ratio and T cell activation in multiple myeloma: reference to IL-16. *Leuk Res*. agosto de 2002;26(8):705–11.
  42. Ogawara H, Handa H, Yamazaki T, Toda T, Yoshida K, Nishimoto N, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res*. fevereiro de 2005;29(2):135–40.
  43. Kay NE, Leong TL, Bone N, Vesole DH, Greipp PR, Van Ness B, et al. Blood levels of immune cells predict survival in myeloma patients: results of an Eastern Cooperative Oncology Group phase 3 trial for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood*. 1 de julho de 2001;98(1):23–8.
  44. Pérez-Andrés M, Almeida J, Martín-Ayuso M, Moro MJ, Martín-Núñez G, Galende J, et al. Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer*. 15 de março de 2006;106(6):1296–305.
  45. Bonneville M, O'Brien RL, Born WK. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat Rev Immunol*. julho de 2010;10(7):467–78.
  46. Burjanadzé M, Condomines M, Reme T, Quittet P, Latry P, Lugagne C, et al. In vitro expansion of gamma delta T cells with anti-myeloma cell activity by Phosphostim and IL-2 in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. outubro de 2007;139(2):206–16.
  47. Costantino CM, Baecher-Allan CM, Hafler DA. Human Regulatory T cells and Autoimmunity. *Eur J Immunol*. abril de 2008;38(4):921–4.
  48. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. fevereiro de 2003;9(2):606–12.
  49. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 1 de novembro de 2007;110(9):3112–21.

50. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 12 de abril de 2012;12(5):335–48.
51. Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, Sawyer J, Barlogie B, Shaughnessy J. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 1 de julho de 2005;106(1):296–303.
52. Walker BA, Mavrommatis K, Wardell CP, et al. Identification of novel mutational drivers reveals oncogene dependencies in multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(6):587–597. *Blood*. 27 de setembro de 2018;132(13):1461.
53. Walker BA, Boyle EM, Wardell CP, Murison A, Begum DB, Dahir NM, et al. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de novembro de 2015;33(33):3911–20.
54. Pawlyn C, Morgan GJ. Evolutionary biology of high-risk multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*. 24 de agosto de 2017;17(9):543–56.
55. Boyd KD, Ross FM, Chiecchio L, Dagrada GP, Konn ZJ, Tapper WJ, et al. A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial. *Leukemia*. fevereiro de 2012;26(2):349–55.
56. Bolli N, Maura F, Minvielle S, Gloznik D, Szalat R, Fullam A, et al. Genomic patterns of progression in smoldering multiple myeloma. *Nat Commun*. 22 de agosto de 2018;9(1):3363.
57. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 5 de maio de 2011;117(18):4701–5.
58. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance | *NEJM* [Internet]. [citado 21 de fevereiro de 2024]. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa01133202>
59. Kumar SK, Mikhael JR, Buadi FK, Dingli D, Dispenzieri A, Fonseca R, et al. Management of Newly Diagnosed Symptomatic Multiple Myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) Consensus Guidelines. *Mayo Clin Proc*. dezembro de 2009;84(12):1095–110.
60. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. agosto de 2016;17(8):e328–46.
61. Espiño M, Medina S, Blanchard MJ, Villar LM. Involved/uninvolved immunoglobulin ratio identifies monoclonal gammopathy of undetermined significance patients at high risk of progression to multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2014;164(5):752–5.

62. Ludwig H, Milosavljevic D, Zojer N, Faint JM, Bradwell AR, Hübl W, et al. Immunoglobulin heavy/light chain ratios improve paraprotein detection and monitoring, identify residual disease and correlate with survival in multiple myeloma patients. *Leukemia*. janeiro de 2013;27(1):213–9.
63. Paolini L, Di Noto G, Maffina F, Martellosio G, Radeghieri A, Luigi C, et al. Comparison of Hevylite™ IgA and IgG assay with conventional techniques for the diagnosis and follow-up of plasma cell dyscrasia. *Ann Clin Biochem*. 1 de maio de 2015;52(3):337–45.
64. Jacobs JFM, Haagen IA, Lodder A, Van Der Kroft C, De Kat Angelino CM, Croockewit S, et al. Analytical validation of the Hevylite assays for M-protein quantification. *Clin Chem Lab Med CCLM*. 27 de junho de 2018;56(7):1169–75.
65. Bradwell AR, Harding SJ, Fourrier NJ, Wallis GLF, Drayson MT, Carr-Smith HD, et al. Assessment of Monoclonal Gammopathies by Nephelometric Measurement of Individual Immunoglobulin  $\kappa/\lambda$  Ratios. *Clin Chem*. 1 de setembro de 2009;55(9):1646–55.
66. Koulieris E, Panayiotidis P, Harding SJ, Kafasi N, Maltezas D, Bartzis V, et al. Ratio of involved/uninvolved immunoglobulin quantification by Hevylite™ assay: clinical and prognostic impact in multiple myeloma. *Exp Hematol Oncol*. 23 de abril de 2012;1:9.
67. Katzmann JA, Clark R, Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Melton LJ, et al. Suppression of uninvolved immunoglobulins defined by heavy/light chain pair suppression is a risk factor for progression of MGUS. *Leukemia*. janeiro de 2013;27(1):208–12.
68. Garcia de Veas Silva JL, Gonzalez Cejudo MT, Garcia Perojil Jimenez A, Garcia Lopez Velez M del S, Garcia Rios Tamayo R, Garcia Bermudo Guitarte C, et al. HLC Pair Suppression as a Risk Factor for Bacterial Bloodstream Infections and Early Mortality in Newly Diagnosed Intact Immunoglobulin Multiple Myeloma Patients. *Front Oncol*. 9 de março de 2021;11:599532.
69. Michallet M, Chapuis-Cellier C, Dejoie T, Lombard C, Caillon H, Sobh M, et al. Heavy+light chain monitoring correlates with clinical outcome in multiple myeloma patients. *Leukemia*. fevereiro de 2018;32(2):376–82.
70. Lopez-Anglada L, Cueto-Felgueroso C, Rosiñol L, Oriol A, Teruel AI, Guia AL de la, et al. Prognostic utility of serum free light chain ratios and heavy-light chain ratios in multiple myeloma in three PETHEMA/GEM phase III clinical trials. *PLOS ONE*. 7 de setembro de 2018;13(9):e0203392.
71. Bradwell A, Harding S, Fourrier N, Mathiot C, Attal M, Moreau P, et al. Prognostic utility of intact immunoglobulin Ig'  $\kappa$ /Ig'  $\lambda$  ratios in multiple myeloma patients. *Leukemia*. janeiro de 2013;27(1):202–7.
72. Ludwig H, Milosavljevic D, Berlanga O, Zojer N, Hübl W, Fritz V, et al. Suppression of the noninvolved pair of the myeloma isotype correlates with poor survival in newly diagnosed and relapsed/refractory patients with myeloma. *Am J Hematol*. março de 2016;91(3):295–301.

73. Boyle EM, Young P, Demarquette H, Gay J, Debarri H, Bonnet S, et al. IgA Hevylite® Test As a Surrogate to Serum Protein Electrophoresis (SPEP) or Nephelometry in the Management of IgA Myeloma. *Blood*. 16 de novembro de 2012;120(21):3970.
74. Greenberg AJ, Rajkumar SV, Therneau TM, Singh PP, Dispenzieri A, Kumar SK. Relationship between initial clinical presentation and the molecular cytogenetic classification of myeloma. *Leukemia*. fevereiro de 2014;28(2):398–403.
75. Smith A, Wisloff F, Samson D, the UK Myeloma Forum, Nordic Myeloma Study Group and British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol*. 2006;132(4):410–51.
76. Donato LJ, Zeldenrust SR, Murray DL, Katzmann JA. A 71-Year-Old Woman with Multiple Myeloma Status after Stem Cell Transplantation. *Clin Chem*. 1 de dezembro de 2011;57(12):1645–8.
77. Fulton RB, Fernando SL. Serum free light chain assay reduces the need for serum and urine immunofixation electrophoresis in the evaluation of monoclonal gammopathy. *Ann Clin Biochem*. 1 de setembro de 2009;46(5):407–12.
78. Fernández de Larrea C, Tovar N, Cibeira MT, Aróstegui JI, Rosiñol L, Elena M, et al. Emergence of oligoclonal bands in patients with multiple myeloma in complete remission after induction chemotherapy: association with the use of novel agents. *Haematologica*. janeiro de 2011;96(1):171–3.
79. Gagliardi A, Carbone C, Russo A, Cuccurullo R, Lucania A, Cioppa PD, et al. Combined use of free light chain and heavy/light chain ratios allow diagnosis and monitoring of patients with monoclonal gammopathies: Experience of a single institute, with three exemplar case reports. *Oncol Lett*. outubro de 2016;12(4):2363–70.
80. Katzmann JA, Willrich MAV, Kohlhagen MC, Kyle RA, Murray DL, Snyder MR, et al. Monitoring IgA Multiple Myeloma: Immunoglobulin Heavy/Light Chain Assays. *Clin Chem*. 1 de fevereiro de 2015;61(2):360–7.