



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

VALÉCIA DE CASSIA MENDONÇA DA COSTA

**PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEp-2 (FAN) EM PACIENTES
COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Recife

2019

VALÉCIA DE CASSIA MENDONÇA DA COSTA

**PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS HEp-2 (FAN) EM PACIENTES
COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica.

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
Coorientadores: Profa. Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte
Prof. Dr. Henrique de Ataíde Mariz

Recife
2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Costa, Valécia de Cassia Mendonça da
Pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (FAN) em pacientes com mieloma múltiplo / Valécia de Cassia Mendonça da Costa. – 2019.

57 f. : il.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rego.
Coorientadores: Ângela Luzia Branco Pinto Duarte, Henrique de Ataíde Mariz
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Sangue - Doenças. 2. Oncologia. 3. Câncer – Diagnóstico. I. Rego, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orientadora). II. Duarte, Ângela Luzia Branco Pinto (coorientadora). III. Mari, Henrique de Ataíde (coorientadora). IV. Título.

616.4

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2019-390

VALÉCIA DE CASSIA MENDONÇA DA COSTA

**PESQUISA DE AUTOANTICORPOS EM CÉLULAS Hep-2 (FAN) EM PACIENTES
COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 07/03/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Andrea Tavares Dantas
Hospital das Clínicas – Reumatologia

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Matheus Filgueira Bezerra
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus** por estar presente em todos os momentos de minha vida. A minha família pela força em todas as barreiras enfrentadas e a minha avó **Mima**, a matriarca da família, que ensina a amar muito o outro e respeitar acima de qualquer coisa. Ao meu pai **Edivaldo**, por ser o melhor pai do universo e o mais guerreiro que eu conheço que me ensinou os gestos mais simples da vida. A minha mãe **Maria Aparecida** que apesar de tudo esteve presente para que eu me tornasse uma pessoa mais firme e honesta. A minha irmã **Valquiria** por independente das indiferenças me apoiar em cada momento.

Sou extremamente grata a minhas tias **Rosicleide, Aldenize e Aldjane** por serem a minha base educacional, sem o Aprendiz do Saber jamais chegaria a trilhar tantos caminhos brilhantes, além de serem as melhores tias que poderia ter. Ao meu tio **Gilson** por todas as palavras de conforto e carinho (I food). Aos meus primos **Gisely e Glaucio** por total apoio e companheirismo. A minha prima/sobrinha **Ana Alice** por querer ser bióloga como a tia e por todo o amor que tenho por ela. Ao meu primo **Gabriel** por ser o mais inteligente de todas as crianças. E por fim, mas não menos importante, a minha prima mais velha **Glauce Lobo**, a quem dedico um agradecimento mais que especial pois esteve/está em todos os momentos da minha vida apoiando cada caminho e aconselhando da melhor forma possível. Muito amor envolvido.

Agradeço ao meu esposo **Rafael**, por aceitar compartilhar uma vida comigo, que apesar de difícil aceita compartilhar todas as experiências possíveis. Para nós todo amor do mundo.

Há minha segunda família o **LINAT**, em especial ao meu orientador **Moacyr**, que logo no segundo período da graduação percebeu algo diferente nessa mulher que vos escreve esteve em todas as batalhas, apoiando, incentivando e, o mais importante, educando. Independente das demoras nas correções de manuscritos o senhor é e sempre será o melhor orientador. Agradeço a minha amiga **Lília** por estar a todo o momento mandando mensagens positivas. Na vida todos devem ter uma Lília por perto, essa pessoa é iluminada e sem ela minhas lágrimas não seriam contidas. Agradeço imensamente a **Lidiane** pela dedicação em me auxiliar nos momentos mais complicados.

Agradeço a todos os amigos que fiz ao longo dessa jornada **Flaviana, Maria Clara, Eduardo, Lucas Souza, Amanda Albuquerque, Eudes, Anderson, Ruth (Raquel)** e todos os outros que me ajudaram de alguma forma no decorrer de tanto trabalho, obrigada por existirem em minha vida. Agradeço a **Tacylla e Maria Cecília** que independente da distância

estiveram presentes em todos os momentos de tristeza e alegria, tanto no período da graduação quanto do mestrado, obrigada por serem as melhores PS's.

Por fim, agradeço a todos que fizeram com que esse trabalho pudesse ser realizado, coorientadores Dra. **Ângela Duarte** e Dr. **Henrique Mariz**, ao melhor secretário de pós-graduação **Paulo Germano** e a todos os que fazem o PPGIT.

RESUMO

O Mieloma Múltiplo (MM) é a segunda neoplasia hematológica mais incidente no mundo. Entre as principais manifestações clínicas estão o comprometimento ósseo, alteração renal, hipercalcemia e anemia. O diagnóstico é realizado através da biópsia de medula óssea, mielograma, hemograma completo, radiografias e avaliação de paraproteína, uma proteína anormal presente nos pacientes com MM. Para o seguimento do paciente utilizam-se dois sistemas de estadiamento, o Sistema de Estadiamento Durie/Salmon e o Sistema Internacional de Estadiamento. Apesar de amplamente utilizados, tanto os marcadores de diagnóstico quanto o de prognóstico têm limitações relativas aos seus parâmetros de acurácia. Dessa forma novos marcadores devem ser avaliados como complemento aos poucos existentes no MM. Autoanticorpos estão sendo estudados como possíveis marcadores no diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer por meio da pesquisa de anticorpos antinucleares (ANA) utilizando a técnica de FAN HEp-2 através da imunofluorescência indireta (IFI). Considerando o déficit na acurácia dos marcadores existentes no MM bem como a relevância diagnóstica e prognóstica dos ANAs, o objetivo desse estudo foi avaliar a possível prevalência de ANA em amostras de pacientes com MM. Para tanto, foram avaliados 44 pacientes com MM e 17 controles saudáveis, quanto a titulação baixa ($\leq 1:40$) e alta ($\geq 1:80$) e ao padrão morfológico de fluorescência. Os resultados revelaram uma significância quando comparado os pacientes com MM com os controles. Com relação às titulações a maior porcentagem de pacientes com MM apresentaram titulações mais altas (54,26%) o mesmo que os controles (71,42%). O padrão nuclear pontilhado fino (NPF) foi o mais prevalente tanto nas amostras de MM quanto nos controles. Não foi observada significância estatística entre os títulos e padrões com as manifestações clínicas, exceto a alteração renal com os títulos, com $p=0,0461^*$. Na avaliação pré e pós-quimioterapia, cinco amostras de MM apresentaram diminuição de titulação. Assim, os pacientes com MM e os controles apresentaram relevante frequência de positividade para o FAN, principalmente nos títulos $\geq 1:80$ com padrão morfológico NPF mais prevalente, contudo, novos estudos devem ser realizados.

Palavras-chave: Fator antinúcleo. Gamopatia Monoclonal. Oncohematologia.

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is the second most common haematological malignancy in the world. Among the main clinical manifestations are bone involvement, renal alteration, hypercalcemia and anemia. The diagnosis is made through bone marrow biopsy, myelogram, complete blood count, radiographs and evaluation of paraprotein, an abnormal protein present in patients with MM. For patient follow-up, two staging systems are used, the Durie / Salmon Staging System and the International Staging System. Although widely used, both diagnostic and prognostic markers have limitations regarding their accuracy parameters. Thus new markers should be evaluated as a complement to the few existing ones in MM. Autoantibodies are being studied as possible markers in the diagnosis and prognosis of cancer patients by antinuclear antibody (ANA) screening using the HEp-2 FAN technique through indirect immunofluorescence (IFI). Considering the deficit in the accuracy of markers existing in MM as well as the diagnostic and prognostic relevance of ANAs, the aim of this study was to evaluate the possible prevalence of ANA in samples of patients with MM. Forty-four patients with MM and 17 healthy controls were evaluated for low ($\leq 1:40$) and high ($\geq 1:80$) titration and fluorescence morphological pattern. Results revealed significance when comparing MM patients with controls. Regarding titrations, the highest percentage of patients with MM had higher titers (54.26%) the same as controls (71.42%). The thin dotted nuclear pattern (NPF) was the most prevalent in both MM and controls samples. No statistical significance was observed between titles and patterns with clinical manifestations, except renal change with titles, with $p = 0.0461$ *. In the pre- and post-chemotherapy evaluation, five MM samples showed decreased titration. Thus, patients with MM and controls presented relevant frequency of positivity for ANA, especially in titers $\geq 1:80$ with more prevalent NPF morphological pattern, however, further studies should be performed.

Key words: Antinuclear factor. Monoclonal gamopathy. Oncohematology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características morfológicas dos plasmócitos	16
Figura 2 -	Progressão clonal de um clone saudável até a leucemia de células plasmáticas	17
Figura 3 -	Números de óbitos por MM no Brasil em 2015	18
Figura 4 -	Ações das células de MM sobre a formação óssea	19
Figura 5 -	Vias de sinalizações no MM	20
Figura 6 -	Plasmocitoma extramedular (a) e plasmocitoma solitário (b)	22
Figura 7 -	Mutações somáticas em diferentes tipos de câncer	26
Figura 8 -	Produção de autoanticorpos pelas células B	27
Figura 9 -	Ilustração do ensaio FAN HEp-2	29
Figura 10 -	Árvore de classificação	30
Figura 11 -	Padrões morfológicos FAN HEp-2	30
Figura 12 -	Padrões de FAN mais associados ao câncer	31
Figura 13 -	Amostras positivas e negativas dos pacientes com MM e os controles	38
Figura 14 -	Padrões morfológicos do FAN, visualizados através de imunofluorescência, nos ensaios com soros dos pacientes com MM	39
Figura 15 -	Fluorescência intensa ao redor da placa metafásica	40
Figura 16 -	Comparação dos gêneros com os títulos altos e baixos	41
Figura 17 -	Comparação das características clínicas dos pacientes com MM e os títulos altos e baixos	41
Figura 18 -	Dados do estadiamento comparados com os títulos altos e baixos	42
Figura 19 -	Comparação dos gêneros com os padrões morfológicos	42
Figura 20 -	Comparação das características clínicas dos pacientes com MM e os padrões morfológicos	43
Figura 21 -	Dados do estadiamento comparados com os padrões morfológicos	43
Figura 22 -	Avaliação das amostras dos pacientes com MM pré e pós-quimioterapia	45
Figura 23 -	Padrão morfológico de FAN HEp-2, através da imunofluorescência indireta, paciente MM 27 pré e pós quimioterapia	45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sistema de Estadiamento Durie/Salmon (SDS)	23
Quadro 2 - Sistema Internacional de Estadiamento (ISS)	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas dos pacientes com MM	35
Tabela 2 -	Análise dos títulos de FAN de pacientes com MM recém diagnosticados	36
Tabela 3 -	Análise dos títulos de FAN em controles saudáveis.....	37
Tabela 4 -	Número absoluto e percentual de amostras positivas em relação à titulação obtida no ensaio de FAN HEp-2	38
Tabela 5 -	Número e porcentagem dos padrões morfológicos	40
Tabela 6 -	Pacientes com MM pós-quimioterapia	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo geral	14
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	GAMOPATIAS MONOCLONAIS	16
2.2	MIELOMA MÚLTIPLO – MM	17
2.2.1	Epidemiologia	17
2.2.2	Etiopatogenia	18
2.2.3	Manifestações clínicas	20
2.2.4	Diagnóstico e estadiamento no MM	22
2.2.5	Tratamento	24
2.3	ANTIGENICIDADE TUMORAL E AUTOANTICORPOS	26
2.4	PESQUISA DE AUTOANTICORPOS ANTINUCLEARES	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	TIPO E LOCAL DO ESTUDO	32
3.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	32
3.3	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE	32
3.3.1	Critérios de inclusão	32
3.3.2	Critérios de exclusão	33
3.4	PESQUISA DE ANA – FAN HEP-2	33
3.4.1	Coleta e obtenção do soro	33
3.4.2	FAN HEp-2	33
3.5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4	RESULTADOS	35
4.1	DADOS CLÍNICOS	35
4.2	ANÁLISE DOS TÍTULOS NO FAN HEP-2 DE PACIENTES COM MM E CONTROLES	36
4.3	ANÁLISE DOS PADRÕES MORFOLÓGICOS	39
4.4	COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM MM E OS TÍTULOS	40
4.5	COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM MM E OS PADRÕES MORFOLÓGICOS	42

4.6 AVALIAÇÃO DO FAN HEP-2 EM PACIENTES COM MM PÓS QUIMIOTERAPIA	43
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	55

1 INTRODUÇÃO

As Gamopatias Monoclonais (GMs) constituem um conjunto de distúrbios hematológicos, caracterizado pela proliferação de plasmócitos monoclonais produtores ou não da proteína monoclonal (proteína M). Dentre as principais GMs, encontram-se a Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (GMSI), Mieloma Múltiplo Assintomático (MMA) e o Mieloma Múltiplo (MM). O MM é uma neoplasia hematológica que ocupa a segunda posição dentre as hematologias mais comuns no mundo, configura cerca de 1% dentre os tipos de câncer, com uma prevalência mundial em cinco anos de 230.000 indivíduos (KYLE et al., 2014; PARREIRA et al., 2014; KAZANDJIAN, 2016).

No MM, o diagnóstico é realizado através da observação das manifestações clínicas e dos exames complementares. Dentre as ocorrências clínicas mais comuns, destacam-se a hipercalcemia, anemia, lesões líticas e insuficiência renal. Para o estabelecimento final do diagnóstico, além da identificação dos plasmócitos malignos (acima de 10% em biópsia de medula óssea), é feita a avaliação do dano relacionado por meio das análises do hemograma, radiografias, dosagem de ureia, creatinina, beta-2-microglobulina, eletroforese de proteínas séricas e imunofixação sérica (RAJKUMAR et al., 2014; GHAFOURI-FRAD et al., 2015; SHIMANOVSKY et al., 2016; MICHELS; PETERSEN, 2017).

De acordo com as características clínicas e exames realizados, os pacientes são enquadrados em estadiamentos, para definir critérios de prognóstico e tratamento. Os sistemas mais utilizados são o Sistema de Estadiamento Durie/Salmon (SDS) e o Sistema Internacional de Estadiamento (ISS). O SDS considera fatores como os níveis de proteínas M, cálcio sérico, quantidade de hemoglobina e número de lesões líticas, contudo, é considerado pouco eficiente. O ISS baseia-se na utilização dos níveis de beta-2-microglobulina e albuminas séricas e atualmente é o mais indicado na avaliação da resposta de sobrevida dos pacientes com MM (IMF, 2018).

As neoplasias apresentam especificidades e interações complexas com o microambiente tumoral, caracterizadas pelo desvio da imunovigilância, indução da resistência à imunidade e baixa imunogenicidade. Durante a carcinogênese as células neoplásicas sofrem várias mutações que promovem alterações no perfil antigênico celular, podendo gerar neoantígenos capazes de induzir respostas imunológicas. A manifestação de antígenos pelas células neoplásicas pode induzir a formação de autoanticorpos, e esses podem ser utilizados como biomarcadores clínicos de resposta a terapia em diferentes tipos de neoplasias

(DANIELS et al., 2005; PEDERSEN; WANDALL, 2011; HEO; BAHK; CHO, 2012; COROA, 2014).

Os anticorpos antinucleares (ANA) são autoanticorpos presentes em pacientes com doenças autoimunes sistêmicas. Esses autoanticorpos reagem com componentes celulares no núcleo ou citoplasma, observados por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) e sua pesquisa é realizada através do ensaio de fator antinúcleo (FAN). (DELLAVANCE et al., 2009; BRITO et al., 2013; FERNÁNDEZ MADRID, F. et al, 2015). Vários estudos apontam a presença de ANAs no câncer possivelmente decorrente do aumento de inflamação geral, de um estado de pré-autoimunidade, da estimulação antigênica ocasionada pelas neoplasias malignas ou até mesmo como resposta do sistema imunológico que tenta impossibilitar a disseminação tumoral (AKMATOV et al., 2017; DINSE et al., 2017; NISIHARA et al., 2018; VLAGEA et al., 2018).

Dentre as neoplasias malignas relacionadas com a presença de ANAs, estão principalmente o câncer de mama, ovário, linfoma, pulmão e próstata. No geral, a detecção de ANAs pode estar relacionada com o prognóstico e diagnóstico, sendo de mau prognóstico no câncer de ovário, auxiliar diagnóstico e prognóstico em pacientes com linfoma, e auxiliar em um diagnóstico precoce em amostras de soro dos pacientes com câncer de mama (BLAES et al., 2000, GUYOMARD et al., 2003; DANIELS et al., 2005; HEEGAARD et al., 2012; FERNÁNDEZ MADRID, F. et al, 2015; ZOU et al., 2015; NISIHARA, 2018).

Autoanticorpos também foram identificados em malignidades hematológicas, como o linfoma, onde os ANAs são indicados como potenciais auxiliares diagnóstico e prognóstico. Contudo, poucos estudos existentes relacionam a presença de ANAs em pacientes com neoplasias hematopoiéticas, destacando-se a ausência de estudos com o mieloma múltiplo (MM). Dessa forma, a investigação de ANAs constitui importante passo na busca por novas estratégias de diagnóstico e prognóstico em pacientes com MM. Neste contexto, o presente projeto se propôs a avaliar a possível prevalência de ANA's e a sua relação com as manifestações clínicas em amostras de soro de pacientes com MM.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a prevalência de anticorpos antinucleares em pacientes com MM como possível marcador de diagnóstico e prognóstico.

1.1.2 Objetivos específicos

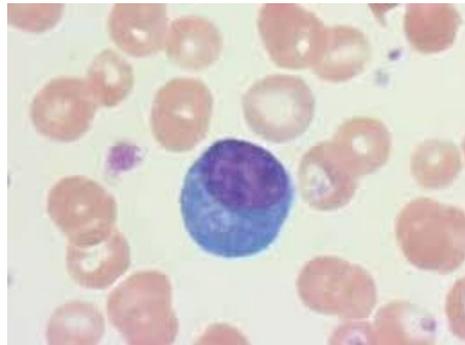
- Avaliar o perfil de titulação de autoanticorpos nucleares em pacientes com MM e controles;
- Determinar os padrões morfológicos de autoanticorpos nucleares em pacientes com MM e controles;
- Investigar a possível associação entre o perfil de ANA e as manifestações clínicas em pacientes com MM e controles.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 GAMOPATIAS MONOCLONAIS

As Gamopatias Monoclonais (GMs) são um grupo de distúrbios hematológicos, caracterizado pela proliferação de plasmócitos monoclonais, produtores ou não da proteína monoclonal conhecida como paraproteína M. Os plasmócitos (figura 1), células ovóides ou esféricas com citoplasma abundante e núcleo excêntrico e esférico, são responsáveis pela produção de anticorpos (Imunoglobulinas – Ig) importantes para a resposta imune, cuja principal função é combater corpos estranhos no organismo. A Ig é formada por duas cadeias polipeptídicas leves do mesmo tipo (*lambda* ou *kappa*) e duas cadeias polipeptídicas pesadas que podem ser do tipo IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. (CALADO, 2001; BOTTINI, 2007; PARREIRA et al., 2014).

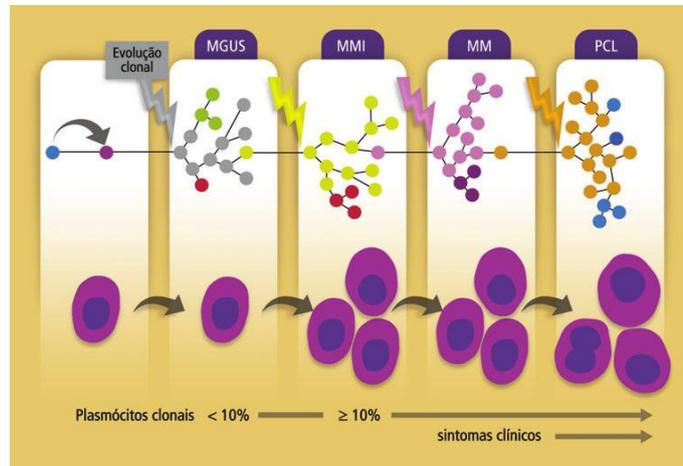
Figura 1. Características morfológicas dos plasmócitos



Fonte: Calado, 2001.

Dentre as principais gamopatias monoclonais encontram-se a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), o mieloma múltiplo assintomático (MMA) e o mieloma múltiplo sintomático (MM). Alterações genéticas e do microambiente medular podem levar a progressão do GMSI para o MM e até mesmo para a leucemia de plasmócitos (PCL), como mostrado na figura 2. Esta progressão faz analogia à teoria da seleção Darwiniana com a progressão clonal de um clone saudável, considerando-se que as alterações genéticas ocorrem de maneira aleatória através de vias de ramificações, os subclones dos plasmócitos adquirem vantagens mutacionais de atribuições genéticas e/ou epigenéticas para favorecimento de sua sobrevivência e dessa forma progredindo para neoplasias (FARIA; SILVA, 2007; LÓPEZ-CORRAL et al., 2014).

Figura 2. Progressão clonal de um clone saudável até a leucemia de células plasmáticas. MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; MMI – Mieloma Múltiplo Indolente; MM – Mieloma Múltiplo; PCL – Leucemia de Células Plasmáticas



Fonte. Santos, 2016

A GMSI é a forma mais comum entre as gamopatias, identificada clinicamente através de pico monoclonal na eletroforese de proteínas séricas (menor que 3g/dl) e infiltração medular de plasmócitos inferior a 10%. Esta é responsável por atingir cerca de 3% dos indivíduos maiores que 50 anos e apresentar uma evolução de 1% ao ano para o mieloma múltiplo com capacidade de progredir para outras doenças linfo proliferativas. A GMSI Esse distúrbio não apresenta sintomas clínicos, e é considerada uma patologia benigna ou pré-maligna (SANTOS, 2009; ALEXANDRE et al., 2012; PARREIRA et al., 2014).

O MM, assim como a GMSI, não apresenta sintomas, nem danos orgânicos ao corpo, demonstra uma taxa de progressividade para o MM de 10-20% ao ano. Nesses casos a identificação clínica presente é de um pico monoclonal maior ou igual a 3g/dl com infiltração medular de plasmócitos maior ou igual a 10% (LANDGREN, 2010; LOPES, 2017).

2.2 MIELOMA MÚLTIPLO – MM

2.2.1 Epidemiologia

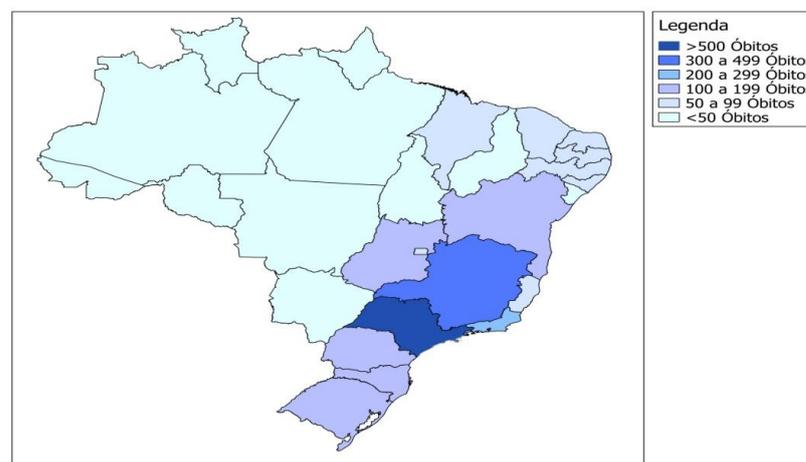
O MM é uma doença que acomete principalmente os idosos acima de 50 anos de idade, com média de 70 anos, representa cerca de 1% dentre os casos de câncer é a segunda neoplasia hematológica mais comum no mundo. Segundo Kazandjian (2016), a prevalência mundial em cerca de cinco anos é de 230.000 indivíduos. Os dados epidemiológicos mais sólidos são provenientes dos Estados Unidos, onde foi estimado para o biênio de 2015-2016

cerca de 59.180 novos casos, com um total de 23.650 mortes. No ano de 2017 estimou-se 30.280 novos casos com 12.590 mortes (DIAS et al., 2015; DURIE, 2017; MICHELS; PETERSEN, 2017; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Já no ano de 2018, segundo o National Cancer Institute (NCI) através do programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (SEER) estimou-se 30.770 novos casos e cerca de 12.770 mortes.

Para a América do Sul estima-se uma incidência de 1.7/100.000 de novos casos e cerca de 1.3/100.000 de óbitos (CURADO et al., 2018). No Brasil, um estudo realizado por Callera et al. (2011), especificamente no estado de São Paulo, revelou uma incidência de 0.7/100.000 habitantes e uma prevalência de 5.7/100.000 habitantes. Em 2015 foram registradas 2.889 mortes no Brasil, o estado de São Paulo apresentou cerca de 832 mortes e o estado de Pernambuco registrou 99 óbitos em decorrência do MM (figura 3) (MELO, 2018).

Anterior aos anos 2000 a mediana de sobrevida dos pacientes com MM era de 12 meses, passando para 24 meses após os anos 2000. Contudo, a introdução de novas estratégias terapêuticas como as drogas imunomoduladores e inibidores de proteassoma promoveram um aumento na taxa de sobrevida em cerca de 5 a 10 anos (KAZANDJIAN, 2016; MICHELS; PETERSEN, 2017).

Figura 3. Números de óbitos por MM no Brasil em 2015.



Fonte: adaptado de Melo, 2018.

2.2.2 Etiopatogenia

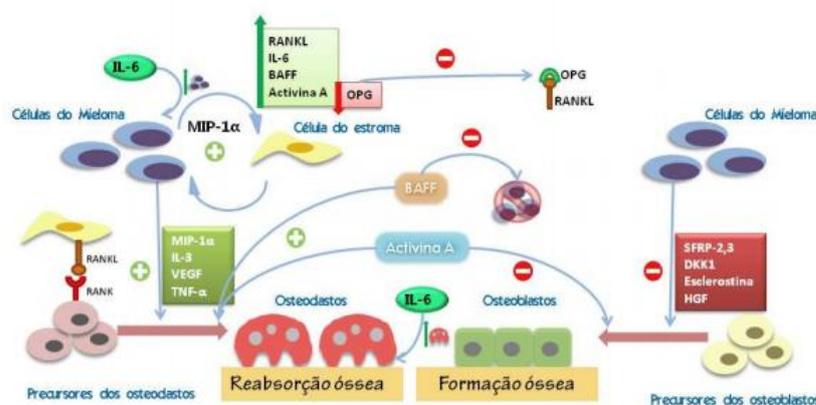
O MM é uma neoplasia hematológica, caracterizada pela proliferação clonal de plasmócitos no microambiente medular, produção de imunoglobulinas monoclonais (proteínas M) e diferentemente das outras gamopatias descritas, apresenta sintomas clínicos e

comprometimentos orgânicos (SILVA et al., 2009; ANDERSON; CARRASCO, 2011; SHIMANOVSKY et al., 2016).

O microambiente da medula óssea possui além dos osteoclastos, numerosos osteoblastos, células hematopoiéticas, células supressoras do estroma, células imunes, células endoteliais e matriz extracelular e todos esses componentes estão envolvidos na gênese e manutenção do MM. Uma das principais causas envolvidas na patogênese do MM é a interação entre as células neoplásicas e o microambiente hematopoiético, essas células são capazes de estimular a osteoclastogênese. Os plasmócitos neoplásicos estão comumente fixados na medula óssea, onde secretam moléculas capazes de estimular os osteoclastos à reabsorção óssea e bloquear os osteoblastos, para impedir o reparo ósseo (SILVA, 2012).

A proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α) secretada pelo plasmócito atua no estroma resultando no aumento de receptor ativador do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL), interleucina-6 (IL-6), fator ativador de células B (BAFF) (este responsável por impedir a apoptose) e Activina A para formação de osteoclastos, além de diminuir a produção de osteoprotegerina (OPG), fato que causa a reabsorção óssea. Interceucina-3 (IL-3), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de necrose tumoral- α (TNF α), também são responsáveis pela ativação de osteoclastos. As moléculas sFRP-2 e 3, DKK1, esclerostina e HGF estão intimamente ligadas ao bloqueio de osteoblastos e consequentemente a formação óssea (figura 4) (SOARES, 2013).

Figura 4. Ações das células de MM sobre a formação óssea.

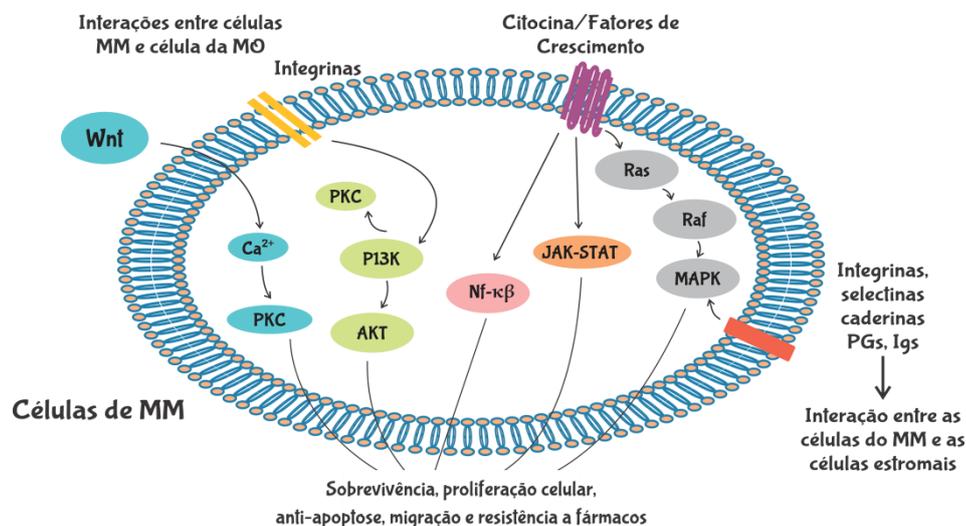


Fonte. Soares, 2013.

As interações autócrinas e parácrinas das células do mieloma são capazes de ativar vias de sinalizações que estão relacionadas nos processos de proliferação, resistência a fármacos, sobrevivência e migração. Dentre essas vias encontra-se a via MAPK responsável

pela proliferação, sobrevivência e diferenciação celular, cuja ativação é desencadeada por citocinas como IL-6 resultando na ativação da cascata Ras-Raf-Mek e alteração da expressão gênica. Outra via ativada em 50% dos pacientes com MM é a via JAK-STAT3 cuja estimulação por IL-6 e hiperativação de STAT3 resulta na elevação de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-XL, ligada a resistência a quimioterápicos em pacientes com MM. Sinalizações moleculares através de IL-6 e IGF-1 podem ativar, além das vias supracitadas, a via PI3K que fosforila AKT e ativa mTOR resultando na resistência a apoptose e proliferação celular. Além destas, a via NFκB pode estar ativada está ativada em 50% dos casos de MM e alterando eventos de adesão celular, apoptose e inflamação. A via de sinalização Wnt regula o cálcio no equilíbrio entre os osteoblastos e osteoclastos e alterações nesta causam um aumento na reabsorção óssea resultando em lesões líticas (figura 5) (SILVA, 2012; SANTOS, 2016; SPAAN, 2018).

Figura 5 – Vias de sinalizações no MM.



Fonte: adaptado de Silva, 2012.

2.2.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas auxiliares no diagnóstico do MM podem, caracterizam-se principalmente por hipercalcemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas, agrupadas sob o acrônimo CRAB (do inglês - Calcium elevation, Renal dysfunction, Anemia, Bone disease) (RAJKUMAR et al., 2014).

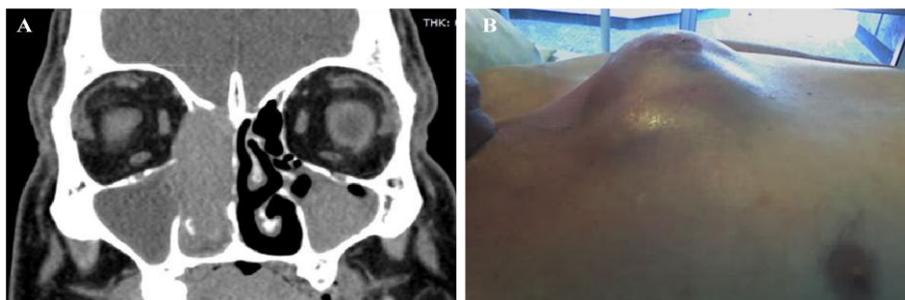
A dor óssea é um dos sintomas mais prevalentes no MM, acometendo costelas, esterno, crânio e ossos longos. Essas dores são causadas pelo desequilíbrio na reabsorção óssea que promove lesões ósseas líticas e fraturas patológicas em cerca de 80% dos casos. A elevação do cálcio sanguíneo ou hipercalcemia ocorre em 15-30% dos casos, as células plasmáticas anormais “invadem” os ossos e ocasionam alterações na osteoclastogênese, onde estimulam uma maior quantidade de osteoclastos responsáveis pela degradação nos ossos, ao mesmo tempo em que bloqueiam os osteoblastos para impedir a reparação óssea. (HUNGRIA, 2007; SANTOS, 2009; DIAS et al., 2015; IMF, 2018).

A anemia é causada pela diminuição da produção de hemácias pela medula e está presente em cerca de 70% dos pacientes com MM. O tipo de anemia no MM é conhecido por Anemia de Doença Crônica (ADC), presente em doenças inflamatórias, neoplásicas e infecções crônicas. O tratamento consiste na realização de transfusão de hemácias, com objetivo de aumentar os níveis de hemoglobina, bem com diminuir os sintomas relacionados à ADC como taquicardia, fadiga, náusea, insuficiência cardíaca, entre outros (CANÇADO, 2007).

A insuficiência renal é relativamente comum em pacientes com MM estando presente em 20-35% dos casos e atingindo níveis séricos de creatinina > 4 mg/dl. As diferenças estruturais das cadeias leves de Ig podem ocasionar danos renais na membrana basal glomerular e nos túbulos renais. Em casos clínicos de hipercalcemia relacionada a deposição do cálcio no rim acarreta outros comprometimentos como a nefrite intersticial. Para tratamento inicial utilizam-se diuréticos com hidratação acompanhada e em ocorrências mais graves, cerca de 2-13% dos pacientes, devem fazer hemodiálise, o que eleva em cerca de 30% o risco de morte (MAIOLINO; MAGALHÃES, 2007).

Além dessas manifestações descritas acima, podem ocorrer casos de plasmocitoma extramedular (figura 6A) e/ou plasmocitoma solitário (figura 6B), ambos causados pela infiltração de células plasmáticas anormais em órgãos e tecidos. O plasmocitoma extramedular ocorre fora da medula óssea e pode acometer qualquer órgão, sendo mais localizado na cabeça e pescoço, especificamente na região orofaríngea e seios perinasais, atinge cerca de 3% dentre as neoplasias plasmocitárias. O plasmocitoma solitário caracteriza-se por única massa de plasmócitos, afeta principalmente o esqueleto axial em especial as vértebras, onde contém medula vermelha. Para tanto, é prescrito que os pacientes realizem biópsias nas lesões e por serem tumores localizados esses casos são frequentemente encaminhados para radioterapia (SOUTAR, 2004; RODRIGUES et al., 2012).

Figura 6. Plasmocitoma extramedular (A) e plasmocitoma solitário (B)



Fonte: Macaluso, 2008; Sepúlveda, 2013.

2.2.4 Diagnóstico e estadiamento no MM

Os sintomas clínicos provocados pelo MM podem auxiliar na acurácia do diagnóstico entre os quais a infiltração medular acima de 10%, a presença de proteína monoclonal sérica ou urinária acima de 3g/dl e os danos orgânicos em especial os critérios CRAB, são foram os critérios primordiais estabelecidos pelo International Myeloma Working Group em 2010 (SANTOS, 2009; SANDY et al., 2015).

Dentre os exames complementares solicitados no diagnóstico encontram-se a biópsia de medula óssea (verificação da porcentagem de células plasmáticas), hemograma, análise bioquímica, eletroforese de proteínas séricas (investigação de proteína monoclonal), exames de urina (identificação de proteína de Bence-Jones), imunofixação (definição de proteínas anormais presentes) e radiografias ou tomografias (visualização de lesões líticas em diversos locais como o crânio, esterno e ossos longos) (SANTOS, 2009; IMF, 2018). Após as investigações e definição nos diagnósticos, De acordo com as características clínicas e exames realizados, os pacientes são enquadrados em estadiamentos (DOMINGUES, 2015).

O estadiamento permite definir critérios de prognósticos, o mais utilizado é o Sistema de Estadiamento Durie/Salmon (SDS) (quadro 1). Nesse estadiamento leva-se em consideração três estadios e duas subclassificações (A ou B a depender da função renal) com fatores como os níveis de proteínas M e cálcio sérico, quantidade de hemoglobina e número de lesões líticas. Contudo, esse estadiamento mostrou-se pouco eficiente ao relacionar a sobrevida global e o tempo livre da doença. Para tanto, surgiu um novo parâmetro conhecido como Sistema Internacional de Estadiamento (ISS) (quadro 2) baseado na utilização de dados como os níveis de beta-2-microglobulina e albumina séricas. Atualmente o ISS é o mais indicado na avaliação de resposta de sobrevida dos pacientes, com dados mais confiáveis e simples, comparando informações clínicas entre diferentes instituições. No Brasil utilizam-se

ambos os critérios, mas o ISS apresenta uma melhor acurácia quando comparado ao SDS (SILVA et al., 2009; BRASIL, 2014; DOMINGUES, 2015; DIAS et al., 2015; SANCHO, 2016).

Quadro 1. Sistema de Estadiamento Durie/Salmon (SDS).

Estadio	Crítérios	Medida da Massa de Células no mieloma Células de mieloma em bilhões/m ² *
Estadio I (massa celular baixa)	<p>Todos os itens a seguir:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Valor de hemoglobina >10 g/dl - Valor de cálcio sérico normal ou < 10,5 mg/dl - Radiografia óssea, estrutura óssea normal (escala 0) ou plasmocitoma ósseo solitário apenas. - Baixas taxas de produção do componente M com valor de IgG < 5 g/dl; valor de IgA < 3 g/dl - Componente M da cadeia leve na urina por eletroforese < 4 g /24 h 	600 bilhões*
Estadio II (massa celular intermediária)	- Não atende aos critérios de Estádio I nem de Estádio III	600 para 1.200 bilhões* *células de mieloma no corpo inteiro
Estadio III (massa celular elevada)	<p>Um ou mais dos seguintes itens:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Valor de hemoglobina < 8,5 g/dl - Valor de cálcio sérico > 12 mg/ dl - Lesões ósseas líticas avançadas (escala 3) - Altas taxas de produção do componente M com valor de IgG > 7 g/dl; valor de 	> 1,200 bilhões*

	IgA > 5g/dl - Componente M de cadeia leve na urina > 12 g /24h	
Subclassificação (A ou B)	- A: função renal relativamente normal (valor de creatinina sérica) < 2.0 mg/dl - B: função renal anormal (valor de creatinina sérica) > 2.0 mg/dl Exemplos: Estádio I A (massa celular baixa com função renal normal); Estádio III B (massa celular elevada com função renal anormal)	

Fonte: IMF, 2018.

Quadro 2. Sistema Internacional de Estadiamento (ISS).

Estadio	Valores
Estadio 1	$\beta 2M < 3.5$ $ALB \geq 3.5$
Estadio 2	$\beta 2M < 3,5$ $ALB < 3,5$ ou $\beta 2M 3,5 - 5,5$
Estadio 3	$\beta 2M > 5.5$
Nota: $\beta 2M$ = Microglobulina sérica $\beta 2$ em mg/L ALB = Albumina sérica em g/dL	

Fonte: IMF, 2018.

2.2.5 Tratamento

A principal escolha no tratamento para o MM é a realização do transplante de células-tronco hematopoiéticas autólogas (TCTH). O TCTH pode melhorar a resposta terapêutica a quimioterapia inicial e a sobrevida do paciente. Como o MM acomete principalmente a população idosa, que apresentam comumente outras comorbidades, devem-se buscar melhores adequações ao regime terapêutico evitando possíveis discontinuidades ao tratamento e riscos futuros aos indivíduos. Contudo, nem todos os casos de MM são passíveis ao TCTH, dessa

forma o tratamento pode ser dividido em dois principais grupos, os pacientes elegíveis e não elegíveis ao TCTH (SANTOS, 2009; BRASIL, 2014; DIAS et al., 2015).

O tratamento para os pacientes elegíveis são destinados a indivíduos com idades até 65 anos que não apresentam muitas comorbidades associadas, além disso, outros critérios como função renal, função cardíaca preservada e função hepática são observados na escolha dos pacientes desse grupo. Este tratamento envolve três principais etapas, inicialmente a de indução utilizando quimioterápicos de 3-4 ciclos, baseando-se em esquemas com três a quatro antineoplásicos, a exemplo tem-se talidomida, ciclofosfamida e dexametasona (CTD), bortezomibe, ciclofosfamida e dexametasona (VCD), bortezomibe, talidomida e dexametasona (VTD). Em seguida como consolidação ocorre o TCTH e por fim a etapa de manutenção, onde o paciente é submetido a quimioterapias em altas doses (BRASIL, 2014; SANDY et al., 2015).

Em casos de não elegibilidade ao TCTH, o tratamento é designado para pacientes acima de 65 anos com condições clínicas comprometidas. Nesses casos utilizam-se quimioterápicos em doses mais ponderadas, pois altas doses podem levar ao comprometimento do *status performace* do paciente. O tratamento consiste em única etapa a indução considerada mais longa com duração de cerca de 1 ano composta por 9-10 ciclos. As combinações para o esquema terapêutico consistem em melfalano + prednisona + talidomida (MPT), melfalano + prednisona + bortezomibe (VMP) ou melfalano e prednisona (MP) (IMF, 2018).

Além dos tratamentos citados acima, existem o transplante alogênico, a radioterapia e a utilização do sistema imunológico. No transplante alogênico o paciente necessita de um doador compatível para realização do procedimento, contudo, esse tipo de transplante pode ocasionar grandes riscos aos pacientes com algumas complicações clínicas resultando em mortalidade em 15-20% nos casos(DURIE, 2017).

A radioterapia é frequentemente utilizada nos tratamentos por ser mais eficiente em situações de plasmocitomas extramedular e/ou solitário, contudo, a utilização desse método leva a destruição de células tronco normais da medula óssea, de maneira permanente (DIAS et al., 2015; DURIE, 2017).

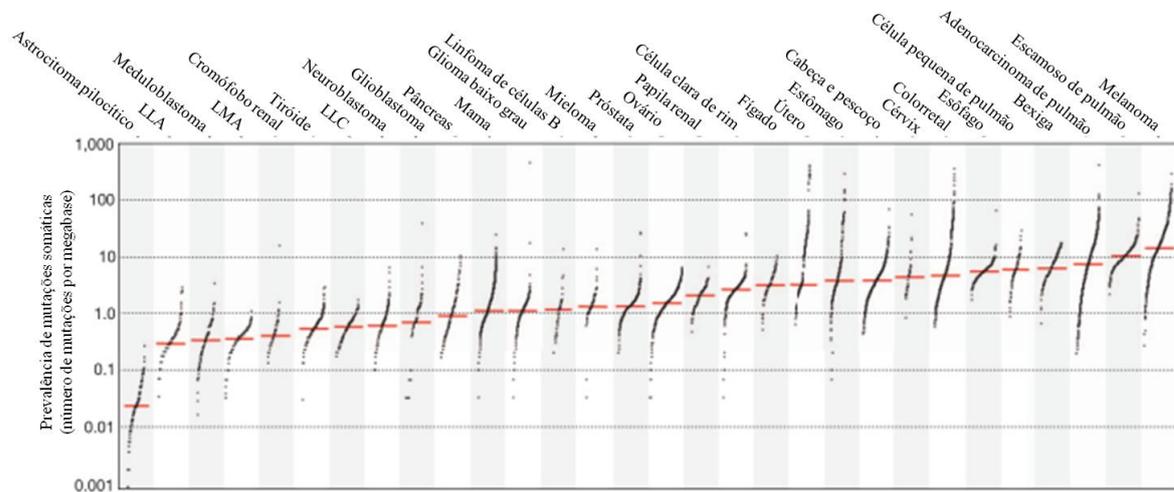
A imunoterapia pode auxiliar nas respostas terapêuticas para o MM potencializando a atividade do sistema imunológico. Alvos relacionados a antígenos específicos a tumores são reconhecidos e combatidos, com ação contra plasmócitos neoplásicos. Como exemplo desse mecanismo tem-se o daratumumabe um anticorpo anti-CD38 de superfície e o elotuzumabe que tem como alvo o antígeno SLAMF7. Para o MM existem atualmente antígenos

específicos, explorados como alvos terapêuticos, o antígeno de maturação de células B, CD138 / Syndecan-1, CD352 e CD200 são exemplos (CHOUDHRY; GALLIGAN; WIITA, 2018).

2.3 ANTIGENICIDADE TUMORAL E AUTOANTICORPOS

As neoplasias apresentam especificidades e interações complexas com o microambiente tumoral, caracterizam-se pelo desvio da imunovigilância, indução da resistência a imunidade e baixa imunogenicidade. No processo de carcinogênese as células normais sofrem mutações que geram moléculas alteradas, capazes de serem reconhecidas pelo sistema imune. Os diversos tipos de câncer são originados pelo acúmulo de mutações somáticas que em conjunto formam a assinatura mutacional (figura 7) (PEDERSEN; WANDALL, 2011; HEO; BAHK; CHO, 2012; ALEXANDROV, 2013).

Figura 7. Mutações somáticas em diferentes tipos de câncer. Assinaturas mutacionais com os números de mutações presentes em trinta tipos de câncer. As linhas horizontais vermelhas demonstram as medianas, no eixo vertical estão os números de mutações por megabase (Mb) e os traços pretos representam os números de mutações somáticas, variando de 0,001 Mb a mais de 400 Mb.



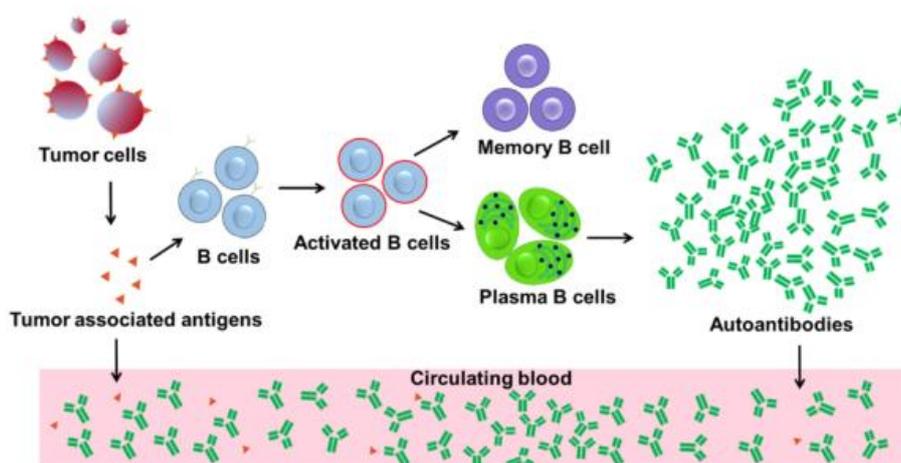
Fonte: Alexandrov, et al. 2013.

Conforme ocorre o aumento nas mutações em um determinado tipo de câncer, o mesmo torna-se mais imunogênico, ou seja, as mutações apresentam uma maior capacidade de induzir resposta imune antitumoral. No caso do melanoma, por conter várias alterações e

consequentemente ser reconhecido mais rapidamente pelo sistema imunológico, as terapias biológicas com imunoterápicos são consideradas de sucesso. (CHEN; IRVING; HODI, 2012).

Além disso, as células neoplásicas podem expressar antígenos que reagem com autoanticorpos produzidos pelo próprio organismo. Esses autoanticorpos, que no geral são produzidos pelas células B podem auxiliar na detecção de um determinado tipo de câncer. Um exemplo é o câncer de mama, no qual estes anticorpos estão em grande concentração na circulação sanguínea possibilitando o diagnóstico em estágios precoces da carcinogênese e favorecendo prognósticos mais acurados (figura 8) (QIU, 2018).

Figura 8. Produção de autoanticorpos pelas células B.



Fonte: Qiu, 2018.

Os autoanticorpos associados a tumores participam de um grupo de biomarcadores séricos que atualmente estão sendo estudados como ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce e prognóstico de alguns tipos de câncer. Esses marcadores são vantajosos por apresentarem um tempo de meia-vida mais duradoura, diferentemente dos marcadores proteicos atuais (DANIELS et al., 2005; HEO; BAHK; CHO, 2012; KRISTENSEN, 2017; NISHIHARA et al., 2018).

Os autoanticorpos encarregados da imunovigilância do tumor, e com efeitos biológicos diferentes são conhecidos como autoanticorpos naturais. Por outro lado, os autoanticorpos não naturais podem estar presentes em pacientes com neoplasias devido a superexpressão desordenada de autoantígenos oriundos de tumores. Esses autoanticorpos têm sido encontrados em indivíduos que apresentam neoplasias sólidas como o câncer de mama e próstata, bem como em hematológicas. Em alguns casos os autoanticorpos podem ser identificados antes do surgimento da sintomatologia da malignidade envolvida e por isso

estão sendo avaliados como marcadores de rastreio e diagnóstico precoce (CONRAD, 2000; VLAGEA et al., 2018).

2.4 PESQUISA DE AUTOANTICORPOS ANTINUCLEARES

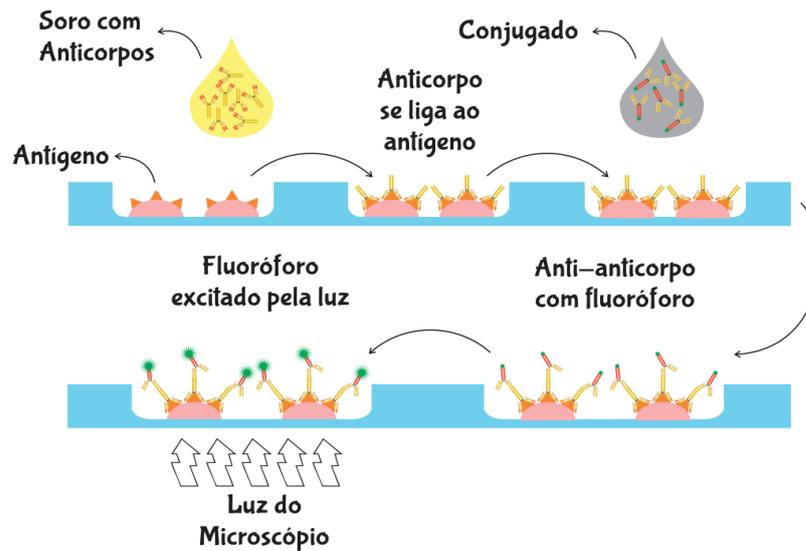
Os anticorpos antinucleares (ANA) são uma espécie de autoanticorpos presentes em pacientes com doenças autoimunes e atualmente sua pesquisa é realizada através do ensaio de fator antinúcleo, conhecido como FAN. Esses autoanticorpos reagem com componentes celulares no núcleo ou citoplasma, esta reação é visualizada por meio da técnica de imunofluorescência indireta (IFI) (DELLAVANCE et al., 2009; BRITO et al., 2013).

Os primeiros achados de ANA foram descritos em doenças reumatológicas autoimunes. Inicialmente essa pesquisa realizava-se através do teste das células LE como marcador sorológico para diagnosticar o lúpus eritematoso sistêmico. Por ser uma técnica de relativa complexidade e falta de reprodutibilidade, aos poucos se tornou menos utilizada (DELLAVANCE et al., 2002; DELLAVANCE et al., 2007).

Segundo Dellavance et al. (2007, p. 158), em meados da década de 50, a técnica de IFI passou a ser utilizada na triagem de ANA em soros de pacientes com suspeitas de doenças autoimunes. Empregava-se como substrato antigênico das reações cortes de tecidos de roedores ou *imprints* de fígados de camundongos, porém outras fontes antigênicas foram inicialmente utilizadas para esse fim, como esfregaço de leucócitos humanos. Contudo, a dificuldade do manuseio de biotérios e a falta de antígenos específicos humanos não encontrados em cortes ou *imprints* de fígado de camundongo favoreceu a substituição desses por outro substrato como as células HEP-2, provenientes do carcinoma de laringe humano (DELLAVANCE et al., 2007).

O ensaio FAN em substrato de células HEP-2 por IFI possibilita a identificação de autoanticorpos nas amostras de soro de pacientes, através de microscópios de fluorescência (figura 9). Como resultados deste ensaio têm-se os valores de título promovido pela diluição dos soros e o padrão morfológico devido a fluorescência emitida. As células HEP-2 foram introduzidas no ensaio por apresentar intensa divisão e variedades nas fases do ciclo celular observadas por suas características morfológicas bem aparentes, o que facilitando a identificação dos diferentes padrões (DELLAVANCE et al., 2002; BRITO et al., 2014; FRANCESCANTONIO et al., 2014).

Figura 9. Ilustração do ensaio FAN HEP-2.



Fonte: o autor (2018).

Para interpretação final dos resultados de FAN HEp-2, o Consenso Internacional sobre Padrões de Anticorpos Antinucleares (ICAP) foi implementado durante o 12º Workshop Internacional sobre Autoanticorpos e Autoimunidade (IWAA) em 2014 com o objetivo de organizar e definir nomenclaturas para os padrões morfológicos e possíveis novos achados. Atualmente existem cerca de 29 padrões morfológicos diferentes. Ademais, foram criados consensos nacionais brasileiros com o intuito de liberação de laudos para as análises do ensaio, sendo o primeiro realizado em 1993 (DELLAVANCE et al., 2002; CHAN et al., 2015).

De acordo com o ICAP as análises do FAN HEp-2 são definidos a partir de padrões principais, representados pelos padrões nucleares englobando o nucleolar, citoplasmáticos e mitótico (figura 10), que no geral auxiliam na identificação de uma determinada doença autoimune,. A árvore de classificação permite a análise de padrões diferenciados e as suas respectivas características a depender da fluorescência adquirida (ICAP, 2019).

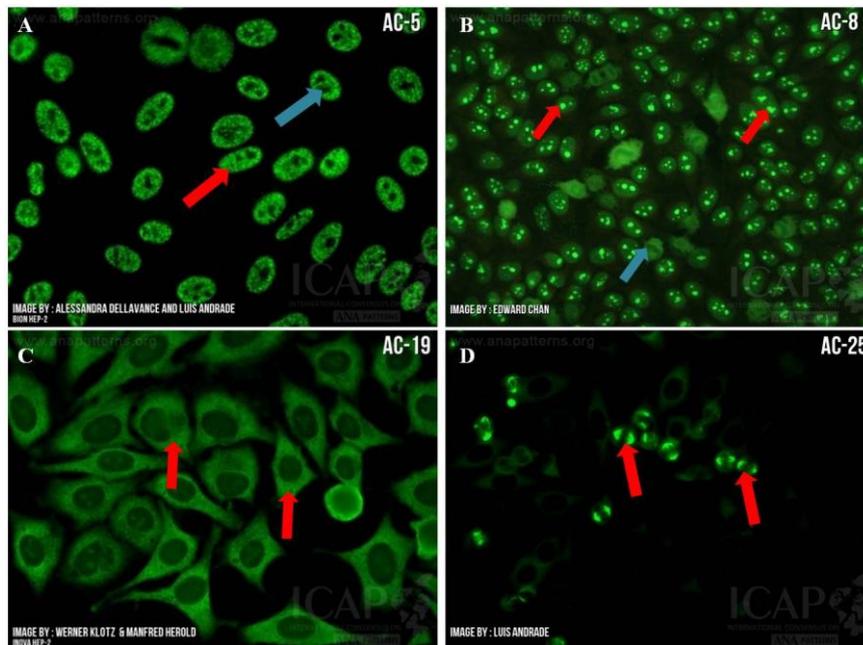
O padrão nuclear está exemplificado pelo nuclear pontilhado grosso (figura 11A) e caracteriza-se por pontos grossos em todo nucleoplasma (seta vermelha) e um nucléolo não marcado (seta azul), em alguns casos pode haver marcação. O padrão nucleolar homogêneo (figura 11B) apresenta fluorescência espalhada por todo nucléolo (setas vermelhas) com placa metafásica não corada (seta azul). O padrão citoplasmático caracteriza-se por marcação fluorescente em todo seu citoplasma de forma homogênea (setas vermelhas) através do padrão citoplasmático pontilhado fino denso (figura 11C). Em células mitóticas aparecem as fibras do fuso (figura 11D) caracterizadas pela fluorescência nos polos (setas vermelhas) (ICAP, 2019).

Figura 10. Árvore de classificação.



Fonte: ICAP, 2019.

Figura 11. Padrões morfológicos FAN HEp-2.

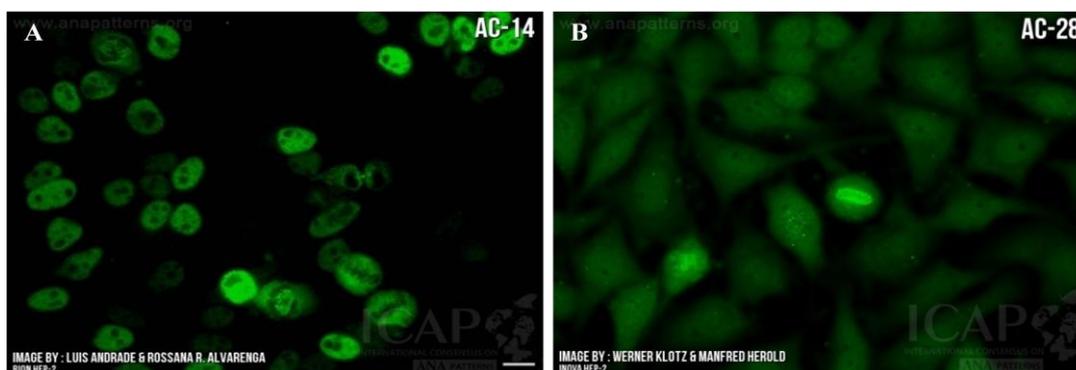


Fonte: ICAP, 2019.

Além dos padrões descritos a identificação de doenças autoimunes, associadas a alguma neoplasia pode ser avaliada por outros padrões entre os quais está o padrão CENP-F-LIKE (figura 12A), que de acordo com ICAP, associa-se com o câncer e outras condições e o

padrão envelope cromossômico mitótico (figura 12B) relacionado a casos de leucemia linfocítica crônica (ICAP, 2019).

Figura 12. Padrões de FAN mais associados ao câncer.



Fonte: ICAP, 2019.

No câncer a presença de ANAs pode ser decorrente do aumento de inflamações que prejudicam os órgãos, um possível estado de pré-autoimunidade, estimulação antigênica promovida pelas neoplasias malignas ou através de respostas do sistema imunológico que buscam impedir a disseminação tumoral (AKMATOV et al., 2017; DINSE et al., 2017; NISIHARA, et al., 2018; VLAGEA et al., 2018).

Os ANAs já foram identificados em pacientes com diferentes tipos de câncer. De acordo com o estudo de Nisihara et al., (2018), o aparecimento de ANAs no câncer de mama foi alto em amostras de soro dos pacientes e favoreceu o diagnóstico precoce. Na neoplasia de ovário, segundo Heegaard et al., (2012), está associado ao mau prognóstico. Em pacientes com linfoma a presença de ANAs irá auxiliar em um possível diagnóstico e prognóstico (ZOU et al., 2015). Contudo, poucos estudos relacionam o surgimento de ANAs em pacientes com neoplasias hematopoiéticas, incluindo o mieloma múltiplo (MM), onde até então não se tem conhecimento acerca da possível presença de ANAs e se de fato poderá ser utilizada em associação aos marcadores existentes.

Dessa forma, a investigação de ANAs em pacientes com MM constitui importante passo na busca por novas estratégias de diagnóstico e prognóstico para este tipo de câncer. Destarte, este trabalho destina-se a pesquisar a possível prevalência de ANAs e sua relação com as características clínicas em amostras de soro de pacientes com MM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 TIPO E LOCAL DO ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, com componente longitudinal. O mesmo foi realizado no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em parceria com o Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) e o Hospital das Clínicas (HC) na UFPE.

3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram recrutados quarenta e quatro pacientes que apresentaram diagnóstico confirmado de mieloma múltiplo e não estavam em uso de nenhuma medicação quimioterápica no momento inicial do estudo. Para critérios de diagnósticos foram utilizados pico monoclonal em eletroforese de proteínas e/ou imunofixação sérica ou urinária e manifestações clínicas como anemia, hipercalcemia, elevações de ureia, creatinina séricas, lesões líticas ou fraturas patológicas. Realizou-se biópsia prévia sugerindo plasmocitoma extramedular ou mielograma prévio com plasmócitos acima de 10%. Dentre os quarenta e quatro pacientes, nove retornaram ao serviço para reavaliação pós-quimioterapia de indução, os quais tiveram suas amostras novamente coletadas. Os dados clínicos descritos acima foram recuperados dos prontuários a medida que os pacientes tiveram suas amostras iniciais coletadas. Utilizou-se 17 amostras de controles saudáveis pareados por sexo e idade ao grupo de estudo.

3.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

3.3.1 Critérios de inclusão

Os seguintes pré-requisitos foram considerados para inclusão no estudo:

- Idade maior que 18 anos;
- Pacientes com gamopatia monoclonal com investigação de mieloma múltiplo;
- Pacientes com biópsias prévias de áreas medulares ou extramedulares sugestivos ou compatíveis com mieloma múltiplo ou plasmocitoma extramedular.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que:

- Apresentaram registros de doenças autoimunes (reumatológicas ou não);
- Apresentaram algum outro tipo de neoplasia;
- Tratamento quimioterápico prévio.

3.4 PESQUISA DE ANA – FAN HEP-2

3.4.1 Coleta e obtenção do soro

A coleta de sangue periférico dos controles e dos pacientes com MM foi realizada em tubos secos a vácuo, os quais foram centrifugados a uma velocidade de 3000 rpm durante 10 minutos. Após esse período realizou-se a retirada do soro, onde foram aliquotados e armazenados em microtubos no freezer -80 até o momento da realização do ensaio.

3.4.2 FAN HEp-2

O kit FAN HEp-2 (Hemagen) foi utilizado para realização dos ensaios. Inicialmente os soros foram diluídos em PBS na proporção de 1:40 para triagem. As amostras que positivaram, ou seja, apresentaram fluorescência em 1:40, tiveram o soro titulado de forma seriada até 1:640. Já nas amostras negativas em 1:40 foram realizadas análises nas diluições de 1:20 e 1:10 com intuito de observar os padrões morfológicos formados. Para a análise dicotomizada os títulos acima de 1:80 foram considerados altos e os títulos abaixo de 1:40 foram considerados baixos. A titulação de cada amostra foi definida com a última diluição positiva.

Após a diluição 20 μ L das amostras foram aplicados em poços contidos nas lâminas. Em todos os ensaios foram utilizados dois controles positivos (homogêneo e centromérico), o controle negativo e o controle diluente (PBS). As lâminas foram incubadas durante 30 minutos em câmara úmida na geladeira (4°C), em seguida, lavadas 2x em PBS com lavagem inicial de 7 minutos e a subsequente de 8 minutos. Após as lavagens foi adicionado o anticorpo secundário antiIgG humana conjugada à isotiocianato de fluoresceína (FITC). Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas por 30 minutos em câmara úmida na geladeira (4°C), lavadas e montadas com glicerol e lamínula.

As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência biológico invertido (Eclipse TS2-FL–Nikon). Os padrões morfológicos foram analisados independentemente por dois especialistas em laudo de FAN HEp-2 considerando as características descritas pelo ICAP.

3.5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os protocolos estabelecidos bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa utilizados neste estudo consideraram os aspectos éticos e legais vigentes de acordo com a Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e foram aprovados pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos dos centros participantes (CAAE: 87001418.5.0000.5208).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os estudos de comparação foram realizados usando os testes de X^2 e Fisher para dados nominais e o teste t não pareado para dados numéricos. A significância estatística considerou um valor de $p \leq 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism versão 6.0.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS CLÍNICOS

No grupo de pacientes com MM, a média de idade foi de 61,5 anos \pm 10,72, variando entre 39 a 85 anos. As principais informações clínicas estão disponíveis na tabela 1. A maioria dos pacientes com MM são do gênero masculino, entre as principais manifestações clínicas estão a anemia, dor óssea e o plasmocitoma. De acordo com o estadiamento, os indivíduos foram enquadrados no estadio III, tanto no ISS quanto no SDS. Como controles, incluímos 17 voluntários saudáveis com média de 59,5 anos \pm 14,84.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com MM.

	N (%)
Gênero	
Masculino	24 (54,54)
Feminino	20 (45,45)
Manifestações clínicas	
Hipercalemia	7/31 (22,58)
Anemia	22/33 (66,66)
Alteração renal	12/33 (36,36)
Doses ósseas	40/40 (100)
Plasmocitoma	31/36 (86,11)
Estadiamento	
SDS	
IA	2/31 (6,45)
IB	0/31 (0)
IIA	3/31 (9,67)
IIB	0/31 (0)
IIIA	19/31 (61,29)
IIIB	7/31 (22,58)
ISS	
I	6/26 (23,07)
II	8/26 (30,76)

III 12/26 (46,15)

4.2 ANÁLISE DOS TÍTULOS NO FAN HEP-2 DE PACIENTES COM MM E CONTROLES

As amostras processadas após o ensaio foram divididas em positivas (+) ou negativas (-) para a presença de ANA por meio da imunofluorescência indireta (tabela 2 e 3).

Tabela 2. Análise dos títulos de FAN de pacientes com MM recém diagnosticados.

	Paciente	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
1	MM 01		+	-				
2	MM 02		+	+	+	-		
3	MM 03		+	+	-			
4	MM 04		+	+	-			
5	MM 05			+	+	-		
6	MM 06			+	+	+	-*	
7	MM 07			+	+	-		
8	MM 08			+	+	+	-*	
9	MM 09			+	+	-	-*	
10	MM 10		-	-	-	-		
11	MM 11			+	+	-	-*	
12	MM 12			+	+	-		
13	MM 13			+	-			
14	MM 14			+	+	+	-*	
15	MM 15			+	+	+	+	
16	MM 17		-	-				
17	MM 19			+	-			
18	MM 20	-	-*	-				
19	MM 21	+	-	-				
20	MM 22			+	+	+	+	-
21	MM 23			+	+	+	+	-
22	MM 24	-	-	-				

23	MM 25			+	-			
24	MM 26			+	-			
25	MM 27		+	-	-			
26	MM 29	+	-	-	-			
27	MM 30	-	-	-				
28	MM 31	+	+	-	-			
29	MM 32	+	-	-				
30	MM 33	+	-	-				
31	MM 34			+	+	-		
32	MM 36			+	+	+	-*	
33	MM 37			+	+	+	+	-
34	MM 39			-*	-	-		
35	MM 40			+*	-			
36	MM 41			+	+*			
37	MM 43			+	+	-		
38	MM 44			+	-*			
39	MM 45			+	+	+	+	+
40	MM 46			-	-*			
41	MM 47			-	-*			
42	MM 48			-	-*			
43	MM 49			-	-	-		
44	MM 50			+	+	+	-	

*amostras com presença de fluorescência intensa ao redor da placa metafásica.

A titulação considerada está destacada com o sinal de mais (+).

Tabela 3. Análise dos títulos de FAN em controles saudáveis.

		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
1	CL 01	-	-	-	-			
2	CL 02	-	-	-	-			
3	CL 08			-	-	-		
4	CL 09			-	-	-		
5	CL 14			+	+	-		
6	CL 27	-	-	-	-	-		

7	CL 32			+	+	-
8	CL 41			+	+	-
9	CL 45			+	+	+
10	CL 48			-	-	
11	CL 49	-	-	-		
12	CL 56			+	-	
13	CL 58			+	+	-
14	CL 62			-		
15	CL 70			+	-	
16	CL 78			-		
17	CL 80			-		

A titulação considerada está destacada com o sinal de mais (+).

Pode-se observar através das tabelas que, nas amostras dos pacientes com MM, trinta e cinco foram positivas e nove negativas para o FAN HEp-2, independente dos títulos altos ($\geq 1:80$) ou baixos ($\leq 1:40$). Já nos controles, sete foram consideradas positivas e dez negativas, essa associação foi considerada significativa (figura 13). O número de amostras em cada titulação e sua respectiva porcentagem está demonstrado na tabela 4.

Figura 13. Amostras positivas e negativas dos pacientes com MM e os controles.

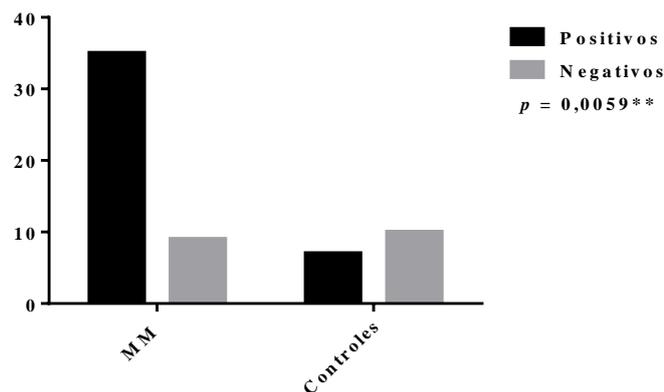


Tabela 4. Número absoluto e percentual de amostras positivas em relação a titulação obtida no ensaio de FAN HEp-2.

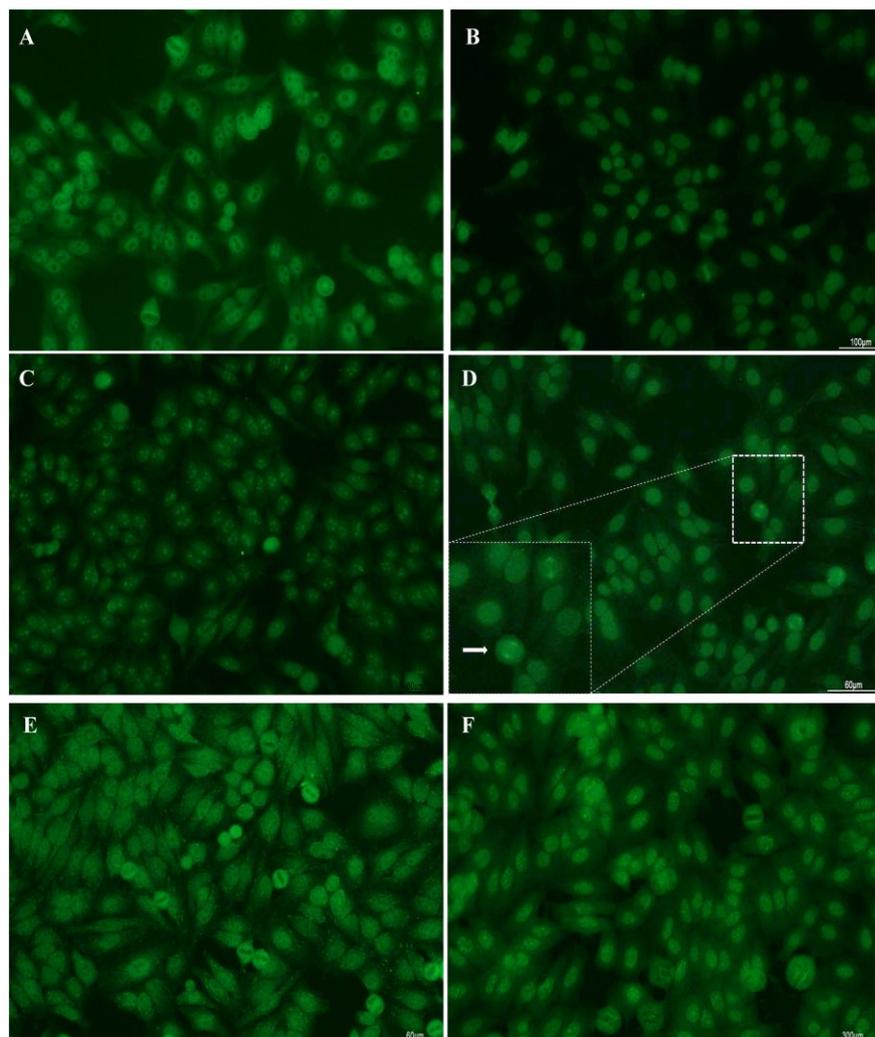
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
MM n (%)	4 (11,42)	3 (8,57)	9 (25,71)	9 (25,71)	5 (14,28)	4 (11,42)	1 (2,85)

Controles	n	-	-	2 (28,57)	4	1 (14,28)	-	-
	(%)				(57,14)			

4.3 ANÁLISE DOS PADRÕES MORFOLÓGICOS

Após análises dos títulos seguiu-se com a análise dos padrões morfológicos. Nas amostras dos pacientes com MM, pode-se observar seis padrões diferentes, o Nuclear Pontilhado Fino (NPF) (figura 14A), nuclear homogêneo (figura 14B), nucleolar (figura 14C), fuso mitótico (figura 14D), citoplasmático pontilhado fino (figura 14E) e NPF e nucleolar (figura 14F).

Figura 14. Padrões morfológicos do FAN, visualizados através de imunofluorescência, nos ensaios com soros dos pacientes com MM.

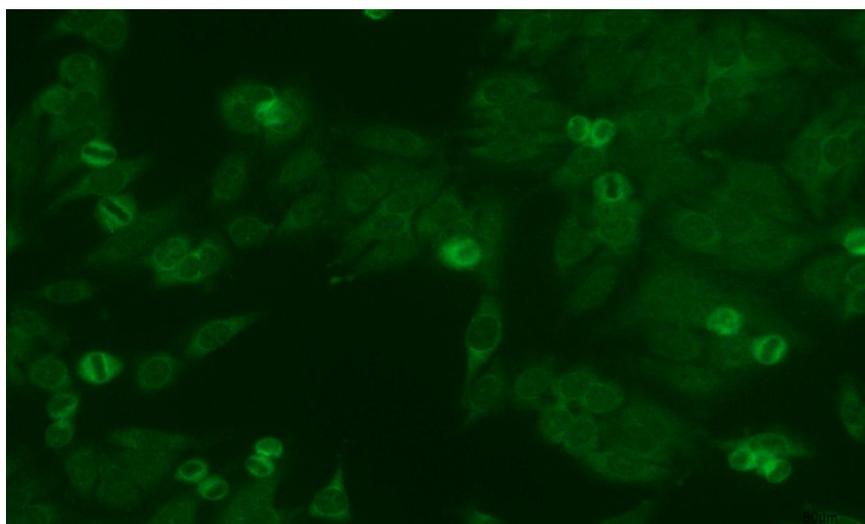


Para os pacientes com MM, o padrão mais prevalente foi o NPF, seguidos dos demais padrões, todos representados na tabela 5. Interessantemente, observou-se em quinze pacientes uma fluorescência intensa ao redor da placa metafásica, independente dos padrões morfológicos observados e se as amostras não apresentaram padrão (figura 15).

Tabela 5. Número e porcentagem dos padrões morfológicos.

	NPF	CPF	Homogêneo	Nucleolar	Fibras do fuso	NPF + nucleolar	NPG
MM n (%)	27 (77,14)	3 (8,57)	2 (5,71)	1 (2,85)	1 (2,85)	1 (2,85)	-
Controles n (%)	5 (71,42)	-	-	-	-	-	2 (28,57)

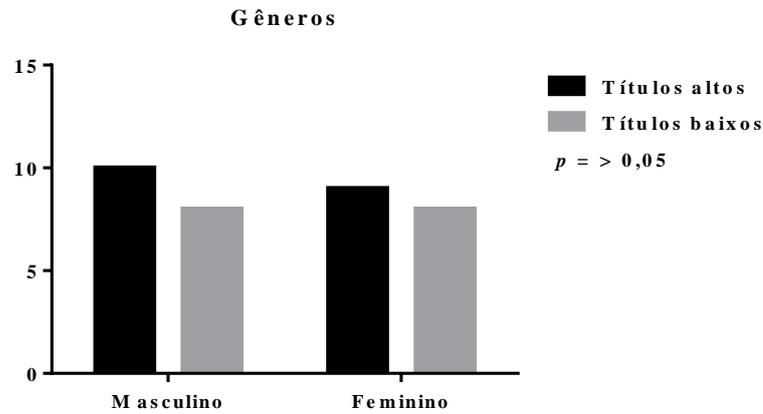
Figura 15. Fluorescência intensa ao redor da placa metafásica



4.4 COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM MM E OS TÍTULOS

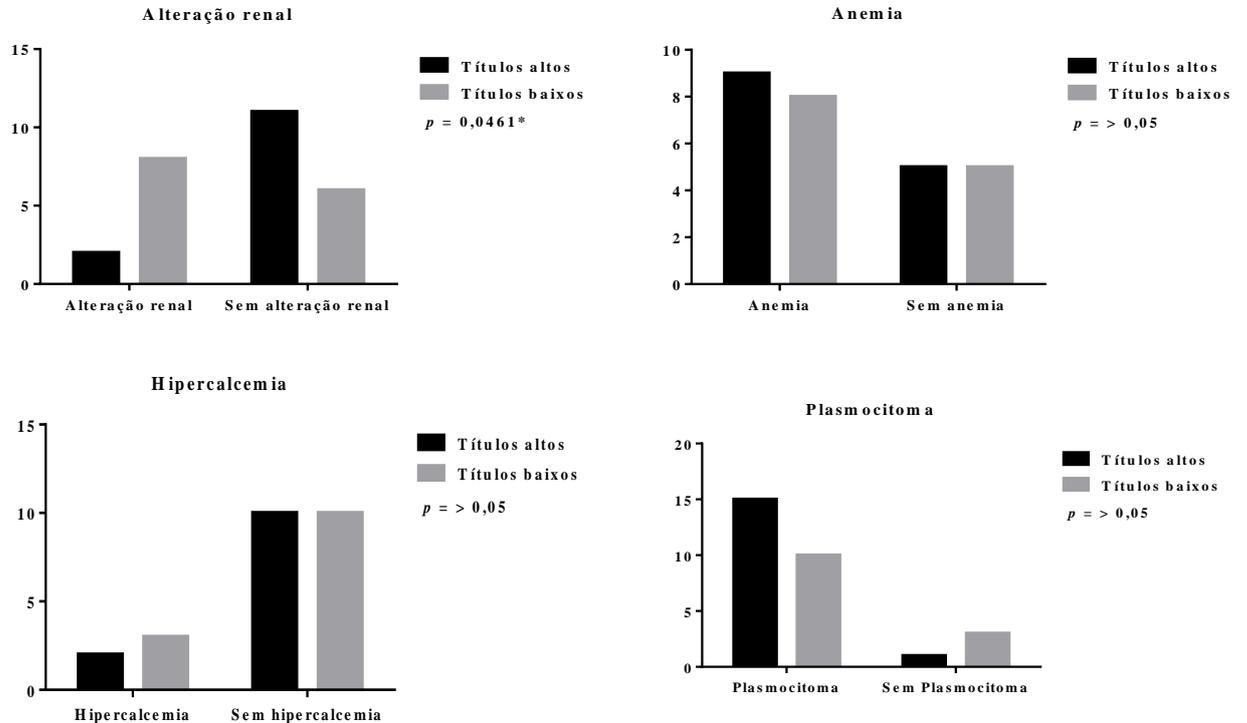
As características dos pacientes, envolvendo gênero, manifestações clínicas e estadiamento, foram comparadas com as titulações altas e baixas referentes à presença de ANA. Inicialmente os títulos foram comparados com os gêneros masculino e feminino, contudo não apresentaram diferenças significativas (figura 16).

Figura 16. Comparação dos gêneros com os títulos altos e baixos.



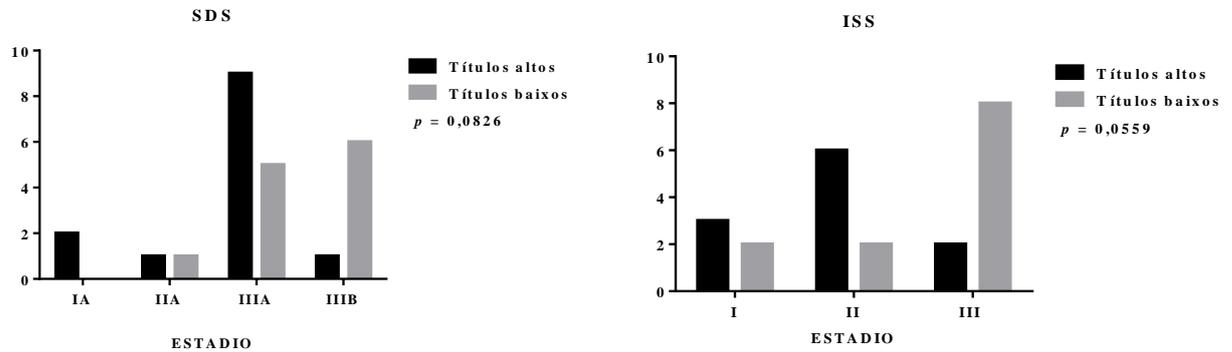
A figura 17 demonstra as comparações realizadas com as titulações altas e baixas das amostras e os dados clínicos descritas na tabela 1. Observou-se significância nas informações a cerca das alterações renais, quanto às titulações altas.

Figura 17. Comparação das características clínicas dos pacientes com MM e os títulos altos e baixos.



Com relação aos dados do estadiamento SDS e ISS em comparação com os títulos altos e baixos (figura 18) nenhuma das amostras apresentou significância.

Figura 18. Dados do estadiamento comparados com os títulos altos e baixos.

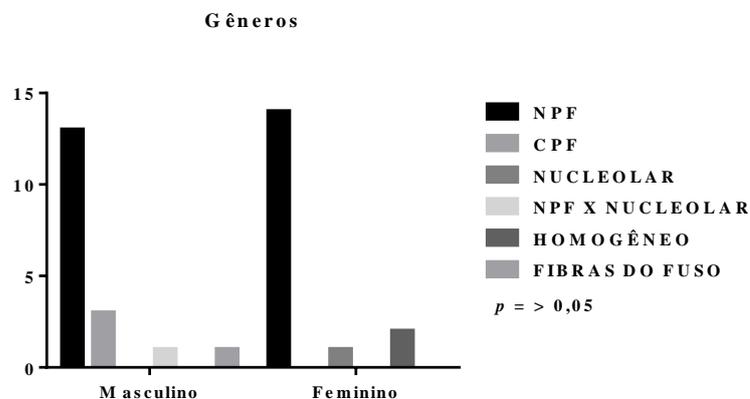


No SDS apenas os estadios que apresentaram números de pacientes foram considerados para análise.

4.5 COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM MM E OS PADRÕES MORFOLÓGICOS

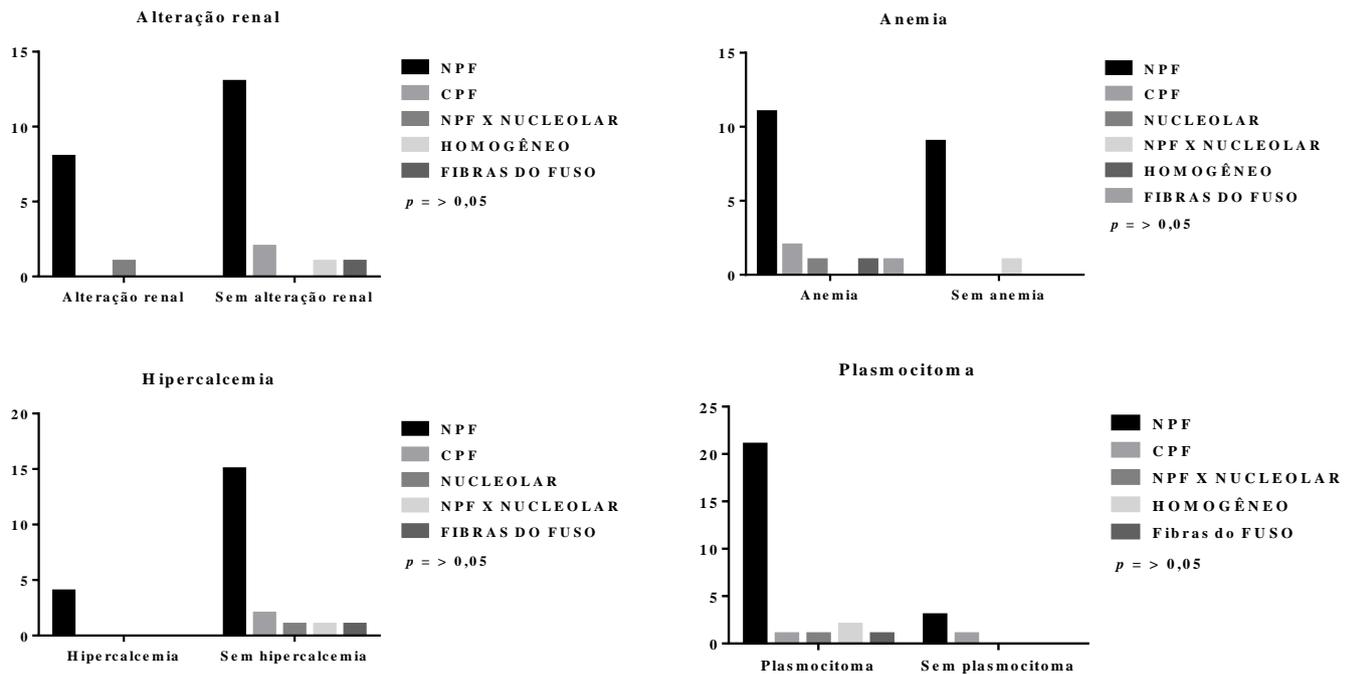
As características clínicas dos pacientes com MM foram comparadas com os padrões morfológicos obtidos através da IFI. Aqueles padrões que não apresentaram casos, não foram contabilizados. Assim como nas titulações, os padrões inicialmente foram comparados com os gêneros masculino e feminino, não sendo significativo estatisticamente (figura 19).

Figura 19. Comparação dos gêneros com os padrões morfológicos.



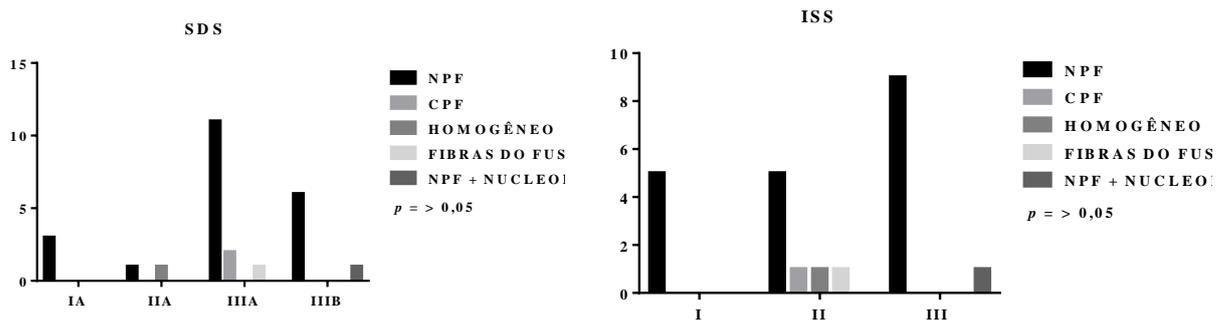
A figura 20 representa a comparação dos padrões morfológicos com as características clínicas. Nenhuma das análises apresentaram significância estatística.

Figura 20. Comparação das características clínicas dos pacientes com MM e os padrões morfológicos.



Com relação aos dados do estadiamento SDS e ISS em comparação com os padrões morfológicos (figura 21), nenhuma das análises apresentaram significância estatística.

Figura 21. Dados do estadiamento comparados com os padrões morfológicos.



4.6 AVALIAÇÃO DO FAN HEP-2 EM PACIENTES COM MM PÓS QUIMIOTERAPIA

Do total de pacientes incluídos na coorte nove retornaram para a avaliação ambulatorial pós-quimioterapia (tabela 6). Esses foram avaliados quanto a sua titulação e padrão morfológico no momento do diagnóstico e pós-quimioterapia, assim, foi possível

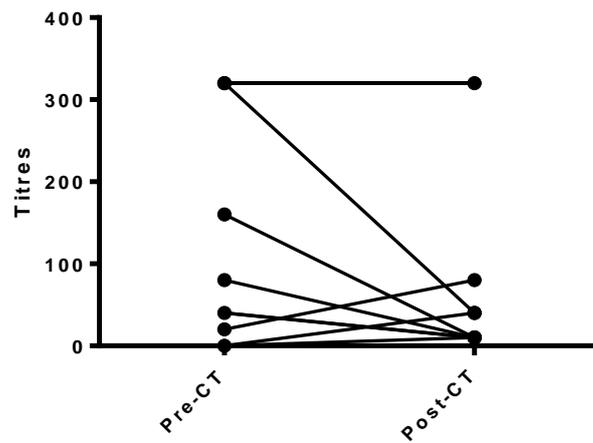
observar que cinco pacientes tiveram redução de título, três apresentaram aumento de titulação e um paciente manteve-se estável, independentes do esquema terapêutico utilizado (MM 15) (figura 22).

Tabela 6. Pacientes com MM pós-quimioterapia.

	Pacientes	Esquema terapêutico	Última titulação
1	MM 03	2 ciclos de MP + 9 ciclos de CD	1:10
2	MM 06	12 CTD + Talidomida (manutenção)	1:10
3	MM 09	6 ciclos de VCD + radioterapia	1:10
4	MM 10	6 ciclos de CTD + transplante de medula óssea	1:10
5	MM 13	CD	1:10
6	MM 15	CTD + radioterapia – fez transplante de medula óssea,	1:320
7	MM 20	-	1:40
8	MM 22	CTD (1ª linha)	1:40
9	MM 27	11 meses de CTD + 1 mês de VCD	1:80

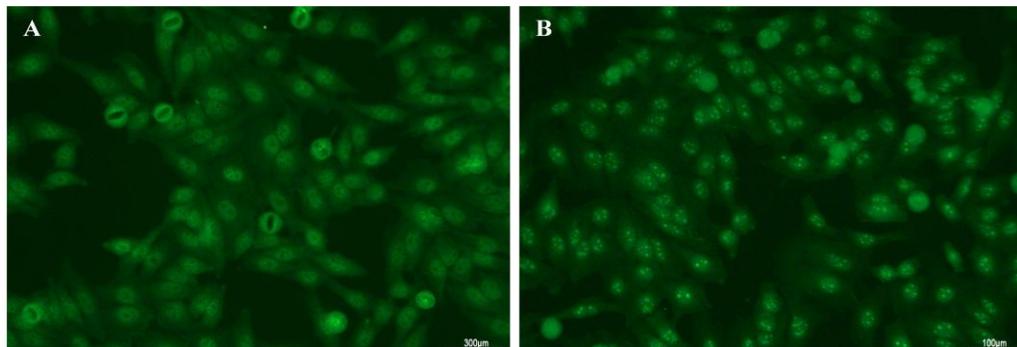
MP – metilprednisolona; CD – Ciclofosfamida e Dexametasona; CTD – Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona; VCD – Bortezomibe, Ciclofosfamida e Dexametasona;

Figura 22. Avaliação das amostras dos pacientes com MM pré e pós-quimioterapia.



Com relação ao padrão morfológico, foi possível observar uma alteração do paciente MM 27 que antes da terapia apresentava padrão NPF (figura 23A) e pós-quimioterapia passou a apresentar padrão nucleolar (figura 23B).

Figura 23. Padrão morfológico de FAN HEp-2, através da imunofluorescência indireta, paciente MM 27 pré e pós-quimioterapia.



5 DISCUSSÃO

Em relação às titulações as amostras de pacientes com MM recém diagnosticados, foi possível observar uma predominância de titulações $\geq 1:80$ positivas para a pesquisa de ANA. O mesmo pode-se observar em um estudo realizado por Al-shukaili et al. (2006) em amostras de pacientes com câncer gástrico (CG), onde ocorreu positividade para ANA em 59,1% dos casos de CG e 14% nos controles saudáveis, variando as titulações de 1:40 a $\geq 1:640$.

Segundo um estudo publicado por Guyomard e colaboradores (2003), as amostras de pacientes com linfoma não hodking's também apresentaram positividade na pesquisa de ANA, as titulações foram consideradas altas acima de 1:160 (61,70%). Semelhante ao nosso trabalho e o descrito anteriormente, Fernández Madrid e colaboradores (2015), através da pesquisa de ANA em amostras de pacientes com câncer de mama, pode-se observar títulos altos (1:320 e 1:640).

O estabelecimento do câncer surgiu devido ao acúmulo de mutações somáticas, que juntas formam assinaturas mutacionais. Essa ação leva a uma capacidade celular de causar respostas antitumorais, através, por exemplo, do aparecimento de autoanticorpos (CHEN; IRVING; HODI, 2012). A presença de ANA em neoplasias pode estar relacionada a processos patológicos desencadeados pelo câncer, esses autoanticorpos possivelmente surgem antes do diagnóstico, no momento inicial da tumorigênese. Assim, podem ser utilizados como marcadores de diagnóstico, auxiliando na descoberta de malignidades (VLAGEA, 2018).

Com relação aos padrões morfológicos visualizados por meio da IFI, nesse estudo observou-se a prevalência do NPF, esse já descrito em doenças autoimunes, exemplo do LES, contudo, até o momento não se tem registros referentes ao MM. O padrão NPF, já foi descrito no estudo de Nisihara et al. (2018), em amostras de pacientes com câncer de mama. Além do NPF outros trabalhos relataram os padrões homogêneo e nucleolar em amostras de linfoma e padrão pontilhado em amostras de câncer gástrico (GUYOMARD, 2003; AL-SHUKAILI, et al., 2006).

De acordo com o ICAP, o principal padrão encontrado em tipos de câncer é o CENP-F-LIKE, caracterizado por apresentar o padrão NPF com uma grande intensidade de fluorescência em torno na placa metafásica, o que diferencia da maior parte dos resultados nesse estudo, com exceção de três amostras que apresentavam possivelmente o padrão CENP-F-LIKE. Na maioria das análises o achado de fluorescência intensa ao redor da placa metafásica, estava presente independente dos padrões morfológicos já estabelecidos, assim

podendo indicar alguma característica dessa neoplasia, contudo novas pesquisas aprofundadas devem ser realizadas.

Com relação aos controles saudáveis, menos da metade apresentaram positividade para a pesquisa de ANA, esses tiveram titulação prevalente em 1:80. Segundo registros na literatura, indivíduos hígidos, podem apresentar titulações elevadas mesmo sem existir doenças autoimunes ou alguma neoplasia. De acordo com Brito et al. (2013), 12,9% dos indivíduos saudáveis podem apresentar positividade para o FAN na titulação de 1:80.

Estudo realizado por Mariz et al. (2011) referente a indivíduos saudáveis e com doenças reumáticas autoimunes, observou-se maior positividade de ANA em indivíduos hígidos com faixa etária entre 51 e 66 anos, considerando baixos títulos $\leq 1:160$. No geral, o estudo de ANA é comumente realizado para triagem de doenças autoimunes, contudo no câncer as análises de títulos estão em processos de estudos, por esse motivo as avaliações referentes a titulações baixas e altas são necessárias para conseguir parâmetros futuros.

Os padrões morfológicos em indivíduos hígidos podem ser diferenciados com relação a pacientes com doenças autoimunes ou outras comorbidades. Segundo Mariz e colaboradores (2011), os indivíduos hígidos apresentaram padrões NPF e NPFD mais prevalentes. O NPFD, de acordo com Dellavance et al. (2007), é o padrão mais comum em pessoas saudáveis. Brito et al. (2013) relatou em seu estudo com 120 amostras de indivíduos saudáveis achado de padrões nuclear pontilhado fino e o nuclear pontilhado fino denso.

Indivíduos sem nenhuma comorbidade pode apresentar tanto títulos altos quanto padrões específicos. Contudo, a presença de ANA pode estar futuramente relacionada a alguma doença, como o câncer, por exemplo. De acordo com Nisihara et al. (2018), indivíduos inicialmente saudáveis que apresentaram positividade para ANA com titulações elevadas, mais tarde apresentarão algum tipo de neoplasia, podendo o FAN ser útil na triagem desses pacientes.

As análises de comparações clínicas com as titulações e padrões morfológicos nas amostras de MM foram realizadas para se adquirir um panorama da doença, já que não se tem muitos trabalhos que caracterizem a mesma na pesquisa de ANA. Contudo, provavelmente devido ao número de pacientes presentes no estudo não foi possível obter análises estatísticas significantes, exceto na manifestação clínica de alteração renal em comparação com a titulação.

A avaliação de amostras pré e pós-quimioterapia foram realizadas com intuito de caracterizar a resposta dos autoanticorpos após o tratamento executado. Como os autoanticorpos podem estar presentes em grande quantidade antes mesmo da neoplasia

diagnosticada (VLAGEA et al., 2018), após o tratamento teoricamente os mesmos poderiam diminuir, ou deveria, obtendo um processo reduzido do tamanho ou atividade do tumor, o que pôde ser observado em cinco pacientes com MM. Como os pacientes em sua maioria ainda estão em seguimento clínico, muitos dados não foram obtidos, dificultando uma possível observação da resposta as terapias, conforme cada paciente e seus respectivos tratamentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que os pacientes com MM apresentaram elevada frequência de positividade para o FAN, quando comparado aos controles, principalmente nos títulos altos sendo o padrão morfológico NPF o mais prevalente, em ambos os grupos. Também foi possível observar que os pacientes com MM, pós-quimioterapia, tiveram alteração no padrão e principalmente nos títulos dos laudos analisados. Contudo, novos estudos devem ser realizados, principalmente para averiguar se o FAN HEp-2 poderá ser utilizado como possível marcador de diagnóstico e prognóstico.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415, 2013.
- AL-SHUKAILI, A. K.; AL-JABRI, A. A.; AL-MOUNDHRI, M. S. Prognostic value of auto-antibodies in the serum of Omani patients with gastric cancer. **Saudi medical journal**, v. 27, n. 12, p. 1873-1877, 2006.
- ANDERSON, K. C.; CARRASCO, R. D. Pathogenesis of Myeloma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 249–274, 2011.
- ALEXANDRE, C. S. et al. Associação entre gamopatia monoclonal de significado indeterminado e hiperparatireoidismo primário no diagnóstico diferencial das hipercalcemias - Relato de Caso. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 34, n. 3, p. 288–290, 2012.
- BLAES, F. et al. Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. **The Annals of thoracic surgery**, v. 69, n. 1, p. 254-258, 2000.
- BOTTINI, P. V. Testes laboratoriais para avaliação do componente monoclonal. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 23–26, 2007.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS); SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em Oncologia. 2014.
- BRITO, F. A. et al. Detection of anti-nuclear antibodies by indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 54, n. 1, p. 13-20, 2013.
- CANÇADO, R. D. Mieloma múltiplo e anemia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 67-76, 2007.
- CALADO, R. T.; FALCÃO, R. P. Heterogeneidade das células do sangue: órgãos hematopoéticos e linfopoéticos. **Hematologia; Fundamentos e práticas**, p. 1043, 2001.
- CALLERA, F. et al. Oncohematological diseases in the Vale do Paraíba, State of São Paulo: demographic aspects, prevalences and incidences. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 33, n. 2, p. 120-125, 2011.
- CHAN, E. K. L. et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 412, 2015.
- CHEN, D. S.; IRVING, B. A.; HODI, F. S. Molecular pathways: Next generation immunotherapy: Inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. **Clinical cancer research**, v. 18, n. 24 p. 1362.2012, 2012.

CHOUDHRY, P.; GALLIGAN, D.; WIITA, A. P. Seeking Convergence and Cure with New Myeloma Therapies. **Trends in cancer**, v. 4, n. 8, p. 567-582, 2018.

Consenso Internacional sobre Padrões de Anticorpos Antinucleares (ICAP). Disponível em <<https://www.anapatterns.org/index.php>>. Acesso em: 27 jan. 2019.

CONRAD, K. Autoantibodies in cancer patients and in persons with a higher risk of cancer development. In: **Cancer and autoimmunity**. p. 159-173. 2000.

COROA, M. E. F. C. **A imunologia do melanoma: evolução e aplicação terapêutica**. 2014. Dissertação (Mestrado integrado em medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra.

CURADO, M. P. et al. Epidemiology of multiple myeloma in 17 Latin American countries: an update. **Cancer medicine**, v. 7, n. 5, p. 2101-2108, 2018.

DANIELS, T. et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. **The Prostate**, v. 62, n. 1, p. 14-26, 2005.

DELLAVANCE, A. et al. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 3, 207-216, 2002.

DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Relevance of the immunofluorescence pattern for interpretation of the ANA test: the case of the dense fine speckled pattern. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 5, p. 439-445, 2007.

DELLAVANCE, A. et al. 3º Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN): recomendações para padronização do ensaio de pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2, controle de qualidade e associações clínicas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 2, p. 89-98, 2009.

DIAS, A. G. et al. Caracterização dos sinais e sintomas clínicos do mieloma múltiplo e os atuais métodos de diagnóstico laboratorial. **Revista Uningá Review**, v. 21, n. 1, p. 11-16, 2015.

DOMINGUES, M. H. A. **Mieloma Múltiplo: Estratificação de Risco e Tratamento**. 2015. Dissertação (Mestrado em medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.

DURIE, B. G. M. Concise Review of the Disease and Treatment Options: Multiple Myeloma. Cancer of the Bone Marrow. 2017.

FARIA, R. M. D.; SILVA, R. O. P. Gamopatas monoclonais – critérios diagnósticos e diagnósticos diferenciais. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 17-22, 2007.

FERNÁNDEZ MADRID, F. et al. Autoantibodies in breast cancer sera are not epiphenomena and may participate in carcinogenesis. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2015.

FRANCESCANTONIO, P. L. C. et al. IV Brazilian guidelines for autoantibodies on HEP-2 cells. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 54, n. 1, p. 44-50, 2014.

GHAFOURI-FRAD, S. et al. Immunotherapy in Multiple Myeloma Using Cancer-Testis Antigens. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 8, n. 5, p. 1-10, 2015.

GUYOMARD, S. et al. Prevalence and pattern of antinuclear autoantibodies in 347 patients with non Hodgkin's lymphoma. **British journal of haematology**, v. 123, n. 1, p. 90-99, 2003.

HEEGAARD, N. H.H. et al. Circulating antinuclear antibodies in patients with pelvic masses are associated with malignancy and decreased survival. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30997, 2012.

HEO, C. K.; BAHK, Y. Y.; CHO, E. W. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. **BMB reports**, v. 45, n. 12, p. 677-685, 2012.

HUNGRIA, V. T. M. Bone disease in Multiple Myeloma. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 60-66, 2007.

International Myeloma Foundation, IMF. Disponível em <http://www.mielomabrasil.org/o_que_e.php>. Acesso em 31 de maio de 2018.

KAZANDJIAN, D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. **Seminars in oncology**, v. 43, n. 6, p. 676-681, 2016.

KYLE, R. A. et al. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Smoldering Multiple Myeloma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 5, p. 775–790, 2014.

KRISTENSEN, V. N. The Antigenicity of the Tumor Cell - Context Matters. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 5, p. 491-493, 2017.

LANDGREN, O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering myeloma: new insights into pathophysiology and epidemiology. **American Society of Hematology**, v. 2010, n. 1, p. 295–302, 2010.

LOPES, M. R. **Evolução do Mieloma Múltiplo sob tratamento com os novos fármacos A propósito de um Caso Clínico**. 2017. Dissertação (Mestrado integrado em medicina) - Clínica Universitária de Hematologia, Faculdade de medicina de Lisboa, Lisboa.

LÓPEZ-CORRAL, L. et al. Transcriptome analysis reveals molecular profiles associated with evolving steps of monoclonal gammopathies. **Haematologica**, v. 99, n. 8, p. 1365–1372, 2014.

MACALUSO, J. P. *El rincón de la medicina interna: Imágenes de la sala*. Plasmocitoma óseo solitario, 2008. Disponível em: <<https://www.elrincondelamedicinainterna.com/2008/12/imagenes-de-la-sala-plasmocitoma-seo.html>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

MAIOLINO, A.; MAGALHÃES, R. J. P. Mieloma Múltiplo e insuficiência renal. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 29, n. 1, p. 86-91, 2007.

MARIZ, H. A. et al. Pattern on the antinuclear antibody–HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody–positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 1, p. 191-200, 2011.

MELO, <https://observatoriodeoncologia.com.br/o-atual-cenario-da-mortalidade-do-mieloma-multiplo-no-brasil/>, 2018.

MICHELS, T. C.; PETERSEN, K. E. Multiple myeloma: Diagnosis and treatment. **American Family Physician**, v. 95, n. 6, p. 373–383, 2017.

National Cancer Institute (NCI) – Cancer stat facts: myeloma. Disponível em <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/mulmy.html>>. Acesso em: 31 de maio de 2018.

NISIHARA, R. et al. Anti-nuclear antibodies in patients with breast cancer. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 193, n. 2, p. 178–182, ago. 2018.

PARREIRA, J. et al. Gamapatias monoclonais de significado indeterminado: Critérios de diagnóstico e acompanhamento clínico. **Revista Científica da Ordem dos Médicos**, v. 27, n. 5, p. 1–4, 2014.

PEDERSEN, J. W.; WANDALL, H. H. Autoantibodies as biomarkers in cancer. **Laboratory Medicine**, v. 42, n. 10, p. 623-628, 2011.

QIU, J. et al. Autoantibodies as Potential Biomarkers in Breast Cancer. **Biosensors**, v. 8, n. 3, p. 67, 2018.

RAJKUMAR, S. V. et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 12, p. e538–e548, 2014.

RODRIGUES, H. et al. Plasmocitoma extramedular das fossas nasais. **Revista Portuguesa de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial**, v. 50, n. 1, p. 85-88, 2012.

SANCHO, I. F. G. **Mieloma múltiplo: evolução e novas terapêuticas**. 2016.

SANDY JR, P. A. et al. Mieloma múltiplo aos 30 anos: o avesso da epidemiologia. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 13, n. 3, p. 210-2, 2015.

SANTOS, C. I. B. G. **Alterações Moleculares e Celulares no Mieloma Múltiplo- Implicações Clínicas e Terapêuticas**. 2016. Tese (Doutorado em ciências da saúde) - Faculdade de medicina, Universidade de Coimbra, Coimbra.

SANTOS, P. I. M. G. **Avaliação da incidência de Gamapatias Monoclonais nos doentes da área do Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, EPE**. 2009. Dissertação (Mestrado em análises clínicas) - Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, EPE Serviço de Patologia Clínica, Universidade do Porto, Portugal

SEPÚLVEDA, I. et al. Plasmocitoma Multifocal Extramedular de la Región Sinonasal: Reporte de un Caso y Revisión de la Literatura. **International journal of odontostomatology**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2013.

SHIMANOVSKY, A. et al. Autoimmune manifestations in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. **BBA Clinical**, v. 6, p. 12–18, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: Cancer Journal Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SILVA, R. O. P. et al. Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 63–68, 2009.

SILVA, S. C. V. **Mieloma Múltiplo: importância dos fatores de prognóstico no tratamento**. 2012. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal.

SOARES, J. P. M. R. **Doença Óssea no Mieloma**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto.

SOUTAR, R. Guidelines on the diagnosis and management of solitary plasmacytoma of bone and solitary extramedullary plasmacytoma. **British journal of haematology**, v. 124, n. 6, p. 717-726, 2004.

SPAAN, I. et al. Wnt signaling in multiple myeloma: a central player in disease with therapeutic potential. **Journal of hematology & oncology**, v. 11, n. 1, p. 67, 2018.

VLAGEA, A. et al. Antinuclear antibodies and cancer: A literature review. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 127, p. 42-49, 2018.

ZOU, H. Y. et al. Detection of serum antinuclear antibodies in lymphoma patients. **Genet Mol Res**, v. 14, n. 4, p. 16546-16552, 2015.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Avaliação da pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 (FAN) como biomarcador clínico em pacientes com mieloma múltiplo”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Valécia de Cassia Mendonça da Costa, email: valeciadecassia@hotmail.com, fone: 08199609-9850, CPF: 103.320.124-33, Endereço: Rua Epitácio Pessoa, 125, Penedo, São Lourenço da Mata, CEP: 54715-180. Também participam desta pesquisa os pesquisadores: Dra. Ângela Luzia Branco Pinto Duarte (Email: angelabduarte@hotmail.com, Tel: (81) 999288550) e Dr. Henrique de Ataíde Mariz (E-mail: henriquemariz@yahoo.com.br, Tel: (81)991272300). e está sob a orientação do Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo, (E-mail moacyr.rego@gmail.com, Tel: (81) 997943799).

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável. Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A busca por novas estratégias terapêuticas no câncer é de grande importância, visto que se tem muitas mortes relacionadas a essa doença. Sendo o mieloma múltiplo (MM) um dos tipos de câncer que acometem principalmente os idosos, levando ao acometimento ósseo, hipercalcemia, anemia e insuficiência renal, sendo esta uma das principais causas de morbidade, dessa forma a pesquisa apresenta como objetivo, avaliar a utilização da pesquisa de autoanticorpos em células HEp-2 através da técnica de FAN como biomarcador clínico em pacientes com mieloma múltiplo, utilizando o soro como principal material de estudo.

Portanto, nós solicitamos a sua colaboração e participação para esta pesquisa. Para este estudo, será necessário a coleta de sangue que é feita no braço, e a quantidade coletada são dois tubos secos (18 ml). Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados, competentes e orientados para reduzir os riscos. Os riscos envolvidos nesse projeto

se referem à coleta de sangue, o constrangimento durante a coleta dos dados e o tempo de espera para atendimento. A coleta de sangue pode ser um pouco desconfortável e o braço apresentar um pequeno hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta. Todos os riscos serão minimizados, pois os procedimentos serão realizados por profissional habilitado e orientado para reduzir os riscos. Os participantes da pesquisa, se caso aceitar, não terá benefício direto com os resultados, sendo estes voltados para a pesquisa e monitoramentos da doença mieloma múltiplo, auxiliando para que ocorra um melhor diagnóstico, de forma mais rápida, facilitando assim o início dos tratamentos futuramente.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa provenientes dos resultados das amostras coletadas, ficarão devidamente armazenados em arquivos digitais em computadores ou impressos em pastas de arquivos, sob a responsabilidade da pesquisadora Valécia de Cassia Mendonça da Costa, no Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino NUPIT-SG localizado no 1º andar do Prédio da Diretoria de Inovação e Empreendedorismo - DINE (ao lado do Dept. de Educação Física) cujo endereço é Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife – PE, por um período mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Avaliação da pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2 (fan) como biomarcador clínico em pacientes com mieloma múltiplo”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante:

Impressão digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: