



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
LABORATÓRIO DE IMUNOMODULAÇÃO E NOVAS ABORDAGENS
TERAPÊUTICAS

LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

GALECTINAS NO MIELOMA MÚLTIPLO: AVALIAÇÃO DA SUA UTILIZAÇÃO
COMO MARCADOR DE PROGNÓSTICO

Recife
2021

LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

**GALECTINAS NO MIELOMA MÚLTIPLO: AVALIAÇÃO DA
SUA UTILIZAÇÃO COMO MARCADOR DE PROGNÓSTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo

**Recife
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Carvalho, Lidiane Vasconcelos do Nascimento

Galectinas no mieloma múltiplo: avaliação da sua utilização como marcador de prognóstico / Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho. – 2021.

110 f. : il.

Orientador: Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Glicosilação 2. Mieloma múltiplo 3. Lectinas I. Rêgo, Moacyr Jesus Barreto de Melo (orient.) II. Título.

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021 - 377

Elaborado por Marylu Souza - CRB-4/1564

LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

**GALECTINAS NO MIELOMA MÚLTIPLO: avaliação da sua utilização como
marcador de prognóstico.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico Recife, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 11/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Antônio Roberto Lucena (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Matheus Filgueira Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba – UFPE

Dra. Carol Virginia Góes Leandro (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Dra. Marina Cadena da Matta (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

À minha mãe, **Maria Lilian**, a quem devo a vida, as oportunidades e muitas das minhas melhores risadas. Obrigada pelo colo e carinho que nunca me faltaram.

À meu parceiro de vida, **Pedro Luiz**, por ser meu amigo, meu porto e minha calma. Obrigada por toda paciência, disponibilidade e por todo apoio nas minhas escolhas.

À meu amor verdadeiro, **Amelie**. Te dedico esse trabalho, assim como tenho te dedicado tudo desde a tua chegada. Você é minha luz, minha força e meu motivo. Você é meu trabalho mais bonito. Que eu possa ser para você um exemplo. E nunca esqueça: Seja firme, gentil, forte e corajosa. Te amo, minha estrelinha.

AGRADECIMENTOS

Na certeza que ninguém nunca fará algo grande sozinho, agradeço a todas as pessoas que direta e indiretamente me ajudaram na conclusão desse trabalho.

Ao professor Moacyr Jesus Barreto, obrigada pela oportunidade e ajuda ao longo de todos esses anos de orientação.

A todos os meus amigos do laboratório, em especial a Maria Clara, por toda ajuda técnica e principalmente suporte emocional sempre.

A todos os amigos que o diagnóstico me aproximou e me apresentou, em especial a equipe do laudo. Obrigada pelas palavras, pelos sorrisos, lanches e auxílio nos perrengues.

Agradeço a meus amigos fora do laboratório, por entender minhas ausências e vibrarem por cada conquista. É lindo ver o quanto vocês torcem por mim.

RESUMO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma malignidade hematopoiética que possui como característica principal a proliferação clonal de células plasmocitárias na medula óssea e como reflexo, danos ósseo e renal, hipercalcemia e anemia. Seu estabelecimento e sustentação se dá através da dependência com o estroma medular, no qual os plasmócitos neoplásicos interagem com as células do microambiente induzindo a expressão de diversas moléculas que resulta em malignidade e resistência. Dentre as moléculas envolvidas no sucesso do estabelecimento do MM destacam-se as galectinas, em especial, galectina-1, galectina-3, galectina 4, galectina-7 e galectina-9 (Gal-1, Gal-3, Gal-4, Gal-7 e Gal-9). Diante deste contexto, o presente trabalho tem por objetivo avaliar os níveis destas galectinas em plasma de pacientes recém-diagnosticados e suas associações com os parâmetros clínicos e laboratoriais. Bem como, avaliar a expressão da Gal-9 em modelos celulares da doença. Para tal, amostras clínicas de sangue periférico (49) e biópsia de medula (10) foram coletadas de pacientes atendidos no serviço de oncohematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco. Além destes, amostras de sangue de 31 indivíduos foram usados como controle. A análise dos níveis plasmáticos das galectinas pela técnica de ELISA evidenciou uma maior expressão das Galectinas 3, 7 e 9 em pacientes quando comparadas ao grupo controle ($p= 0.0142$, $p= 0.0239$ e $p<0,0001$ respectivamente). As galectinas 1 e 4 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas ao controle. Os níveis de GAL-7 correlacionaram-se positivamente com parâmetros clínicos como uréia, creatinina, VSH, $\beta 2$ microglobulina e negativamente com hematócrito e hemoglobina. Gal-4 se correlacionou positivamente com níveis de creatinina e negativamente com hemoglobina. Os níveis de ambas as galectinas foram associados a danos renais e ao International Staging System. Níveis aumentados de Gal-9 foram correlacionados com os níveis de cálcio corrigido, hemoglobina, desidrogenase lática (DHL) e uréia. Os pacientes que apresentavam níveis aumentados de Gal-9 tiveram menor sobrevida em relação àqueles com valores abaixo da mediana ($p= 0,016$). Para avaliar Gal-9 como fator de diagnóstico de MM, utilizando o ponto de corte de <2835 pg/ml obteve-se um valor de área sobre a curva de 0,934. Nos blocos de medula e plasmocitoma dos pacientes, foi observada uma marcação bastante heterogênea para Gal-9, variando de forte a fraca. No modelo celular, a linhagem de MM1-S, em cocultivo com linhagem estrmal ou na presença do meio condicionado não apresentou secreção de Gal-9. Nas mesmas condições não houve detecção de Gal-9 na superfície celular. A expressão

intracelular evidenciou uma diferença da média de fluorescência (MFI) na condição de célula estromal com meio condicionado. Em conjunto esses resultados evidenciam o envolvimento das galectinas no contexto do MM e em especial, a capacidade da Gal-9 como fator associado a pior prognóstico em pacientes recém diagnosticados com MM.

Palavras-chave: oncohematologia; glicosilação; microambiente medular; glicobiologia.

ABSTRACT

Multiple myeloma is a malignancy of plasma cells originating from the bone marrow and, as reflex, several related organic damages. MM establishment and sustenance occur through dependence with bone marrow stroma, in which neoplastic plasma cells interact with cells of the microenvironment. Neoplastic plasma cells induce the expression of several molecules, leading to malignancy, aggressiveness and resistance to programmed cell death. Among the molecules involved in the success of MM establishment are galectins, especially galectin-1, galectin-3, galectin-4, galectin-7 and galectin-9 (Gal-1, Gal-4, Gal-3, Gal-7 and Gal-9). In this context, the present study aims to evaluate the expression of these galectins in the plasma of newly diagnosed patients and their associations with clinical and laboratory parameters. In addition, we looked at how to evaluate the expression of these galectins in cell models of the disease. Clinical samples of peripheral blood and bone marrow biopsy were collected from patients seen at the oncohematology service of the Hospital de Câncer de Pernambuco. The peripheral blood samples had the plasma separated for further analysis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique. The analysis of the plasma expression of galectins showed a greater expression of Galectins 3, 7 and 9 in patients when compared to the control group ($p = 0.0142$, $p = 0.0239$ and $p < 0.0001$ respectively). Galectins 1 and 4 did not show statistically significant differences when compared to the control. GAL-7 levels correlated positively with clinical parameters such as urea, creatinine, VSH, β_2 microglobulin and negatively with hematocrit and hemoglobin. Gal-4 correlated positively with creatinine levels and negatively with hemoglobin. The levels of both galectins have been associated with kidney damage and the International Staging System. Increased levels of Gal-9 were correlated with levels of corrected calcium, hemoglobin, lactate dehydrogenase (DHL) and urea. Patients with increased levels of Gal-9 had shorter survival than those with values below the median ($p = 0.016$). Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine the diagnostic capacity of Gal-9. Using a cut-off point of < 2835 pg / ml, a high value was obtained for the area on the curve (UAC = 0.934). In the patients' marrow and plasmacytoma blocks, a heterogeneous marking for Gal-9 was observed, varying from strong to weak. In the cell model, the MM1-S strain, in co-culture or in the presence of my conditioner, did not show Gal-9 secretion. Under the same conditions there was no detection of Gal-9 on the cell surface and even though there was a marked intracellular expression, there were no differences between the conditions. Together, these results show the involvement of galectins in the context of MM and, in particular, the ability of Gal-9 as a factor associated with a worse prognosis in patients newly diagnosed with MM.

Keywords: oncohematology; glycosylation; bone-marrow microenvironment; glycobiology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DO MIELOMA MÚLTIPLO NO MUNDO.	22
FIGURA 2. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM MM E DISTÚRBOS RELACIONADOS	23
FIGURA 3. ALTERAÇÕES GENÉTICAS NA PATOGÊNESE DO MM.	23
FIGURA 4. MORFOLOGIA DOS PLASMÓCITOS MALIGNOS NO MM.	24
FIGURA 5. IMUNOFENOTIPAGEM DE PM EM ASPIRADO MEDULAR.	25
FIGURA 6. PRINCIPAL MECANISMO DE AÇÃO DOS IMID´S.	31
FIGURA 7. CONDUTA CLÍNICA PARA PACIENTES DE MM RECÉM-DIAGNÓSTICADOS.	34
FIGURA 8. INTERAÇÕES ENTRE OS PM E CÉLULAS ESTROMAIS DA MEDULA NO MICROAMBIENTE TUMORAL.	36
FIGURA 9. OS GLICOCONJUGADOS CONTRIBUEM DE VÁRIAS MANEIRAS PARA OS HALLMARKS DO CÂNCER E FORMAÇÃO DE METÁSTASES.	39
FIGURA 10. ESTRUTURA DAS GALECTINAS E SUA LOCALIZAÇÃO INTRA E EXTRACELULAR.	41
FIGURA 11. GRÁFICOS DE PIZZA COM ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GALECTINAS EM PACIENTES COM CÂNCER.	42
FIGURA 12. GALECTINAS NO MICROAMBIENTE MEDULAR DO MM.	46
FIGURA 13. NÍVEIS PLASMÁTICOS GALECTINAS 1 e 4 EM PLASMA DE PACIENTE	56
FIGURA 14. NÍVEIS PLASMÁTICOS GALECTINAS 3,7 E 9 EM PLASMA DE PACIENTE	57
FIGURE 15. ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GAL-4 E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES	58

FIGURA 16. ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GAL-7 E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES	58
FIGURA 17. ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES ENTRE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GAL-9 E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS PACIENTES	60
FIGURA 18. ANÁLISE CURVA ROC DA CAPACIDADE DIAGNÓSTICA GALECTINA 9	64
FIGURA 19. AVALIAÇÃO DO TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES	65
FIGURA 20. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GALECTINA 9 EM TECIDO	66
FIGURA 21. ANÁLISE EXPRESSÃO INTRACELULAR DOS NÍVEIS GAL-9 EM LINHAGEM	68

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. MECANISMOS PATOGÊNICOS, SINAIS E ACHADOS MAIS COMUNS ASSOCIADOS AO MM.	27
QUADRO 2. ALTA EXPRESSÃO DE GALECTINA ASSOCIADAS A CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EM ONCOHEMATOLOGIAS.	43
TABELA 1. ESTADIAMENTO CONFORME DURIE-SALMON E ÍNDICE PROGNÓSTICO ISS.	29
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES COM MM.	55
TABELA 3. ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS COM VARIÁVEIS CATEGÓRICAS DOS PACIENTES.	61
TABELA 4. ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DAS GALECTINAS COM DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.	62

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATL	Leucemia de células T do adulto
Bcl-2	do inglês, B-cell lymphoma 2
BMCA	do inglês, B-cell maturation agente (agente de maturação de células B)
BMO	Biópsia de medula óssea
BMSCs	Células tronco adultas mesenquimais derivadas da medula óssea
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CAR-T Cell	do inglês, Chimeric antigen receptor (CAR) T cell Therapy.
CP	Células plasmáticas ou plasmocitárias
CTLA-4	do inglês, Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4
DHL	Desidrogenase láctica
DRM	Doença Residual Mínima
eGFR	Taxa de filtração glomerular estimada
ECOG	do inglês, Eastern Cooperative Oncology Group
ELISA	do inglês, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMM	Manifestações extramedulares
EPS	Eletroforese de proteínas séricas
EUA	Estados Unidos da América
Fas-L	do inglês, Fas ligand
FDA	do inglês, Food and Drug Administration
FISH	Hibridização Fluorescente in situ
FLC	do inglês, Free light chain (cadeias leves livres)
GEP	Perfil de expressão gênica
GITR	do inglês, Glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgG	Imunoglobulina G
IgH	Locus da cadeia pesada da imunoglobulina
IgM	Imunoglobulina M
IMiDs	Imunomoduladores
IMWG	do inglês, International Myeloma Working Group
IPs	Inibidores de proteassoma

ISS	do inglês, International Staging System
JNKs	c-Jun N-terminal kinases (JNKs)
LAG-3	do inglês, Lymphocyte-activation gene 3
MABs	Anticorpos monoclonais
MEC	Matriz extra celular
MDCs	Células dendríticas mielóides
MDSC	do inglês, myeloid-derived suppressor cells (células supressoras derivadas da linhagem mieloide)
MGUS	Gamopatia Monoclonal de Significado indeterminado
MHC	Complexo de Histocompatibilidade maior
MM	Mieloma múltiplo
MO	Medula óssea
NF-$\kappa$$\beta$	do inglês, factor nuclear kappa
OS	Sobrevida global
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PCs	Células plasmáticas
PDCs	células dendríticas plasmocitóides
PD-1	do inglês, Programmed cell death protein 1
PD-L1	do inglês, Programmed death-ligand 1
PET-CT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons
PI3K	Inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
sβ2M	β 2 microglobulina sérica
SLP	Sobrevida livre de progressão
SMM	Mieloma múltiplo assintomático ou <i>smoldering</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
TGF-β	Fator de Crescimento e Transformação Beta
Th	Células T <i>Helper</i>
TIL	Infiltrados linfocitários tumorais
TIM-3	do inglês, <i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
TLR	receptor Toll-like
TNF-α	Fator de Necrose tumoral
TNFRs	do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>

Treg	Células T reguladoras
TSLP	Linfopoetina estromal tímica
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
	2.1 Mieloma múltiplo	20
	2.1.1 Epidemiologia e fisiopatologia	20
	2.1.2 Critérios diagnósticos	23
	2.1.3 Tratamento	30
	2.1.4 Microambiente do mieloma múltiplo	35
	2.2 Galectinas: moléculas chave no estudo da glicobiologia	38
	2.2.1 Galectinas no contexto tumoral	41
3	OBJETIVOS	47
	3.1 Objetivo geral	47
	3.2 Objetivos específicos	47
4	MATERIAIS E MÉTODOS	48
	4.1 Desenho do estudo	48
	4.2 População de estudo	48
	4.2.1 Pacientes	48
	4.2.2 Controles	48
	4.3 Critérios de elegibilidade	48
	4.3.1 Critérios de inclusão	48
	4.4 Captação e acompanhamento dos pacientes	49
	4.5 Coleta de amostras biológicas	49
	4.6 Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA)	50
	4.7 Imunohistoquímica	50
	4.8 Cultura de células	51
	4.9 Avaliação dos níveis de galectina solúvel	51
	4.10 Citometria de fluxo	51
	4.11 Análise estatística	52
	4.12 Considerações éticas	52
5	RESULTADOS	54
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÃO	79

8 REFERÊNCIAS	80
ANEXO A– FORMULARIO DE PESQUISA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS...	99
ANEXO B – SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER-SPCC...	101
APÊNDICE A. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- CONTROLES.....	103
APÊNDICE B. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE.....	105
APENDICE C. ARTIGO EVELUATION OF IL-33 E IL-34 EM PLASMA DE PACIENTES COM MM.....	108
APENDICE D. ESTRATÉGIA DE GATE.....	110

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal plasmocitária. Responsável por 10% dos distúrbios hematológicos malignos o MM é caracterizado por destruição esquelética, insuficiência renal, anemia e hipercalcemia (RAJKUMAR et al., 2020). É considerada uma doença do idoso, com mais de 90% dos casos ocorrendo após os 50 anos, sendo a idade média ao diagnóstico de 60 anos, no Brasil (HUNGRIA et al., 2007,2008).

O MM parece surgir a partir de desregulação de células plasmáticas no centro pós germinativo, o que é apoiado pela identificação de mutações somáticas na região variável dos genes das imunoglobulinas, ocorrendo como um evento que o precede. A evolução se dá a partir de uma condição pré-maligna, chamada de gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), que geralmente é assintomática e identificada como achado laboratorial acidental (BRIGLE e ROGERS, 2017). Dois processos moleculares e citogenéticos já são bem compreendidos e culminam na evolução da célula plasmocitária maligna, são eles: hiperdiploidias e rearranjos no gene da cadeia pesada das imunoglobulinas, observados em aproximadamente 55% e 40% dos pacientes respectivamente (GLAVEY, 2017).

Várias terapias são aprovadas para o tratamento do MM que associam corticosteroides, drogas quimioterápicas clássicas e, nos últimos anos, inibidores de proteassoma e de histona desacetilase, drogas imunomoduladores e anticorpos monoclonais visando moléculas de superfície celular (SAN-MIGUEL et al., 2016; LONIAL et al., 2015; STEWART et al., 2015; LOKHORST et al., 2015). Há também pacientes que se beneficiam do transplante de células- tronco hematopoéticas (TCTH) cujo o principal objetivo é melhorar a resposta terapêutica alcançada com a quimioterapia de primeira linha (BIRD et al., 2011; MOHTY et al., 2014). No entanto, apesar do progresso no tratamento com a introdução de diversas classes de quimioterápicos, o MM permanece incurável com mediana de sobrevida de 3 anos em pacientes com doença de alto risco (BERGSAGEL et al., 2013).

O MM é uma condição heterogênea tanto biológica como clinicamente resultante das mudanças complexas, não só na própria célula do MM, mas também no ambiente circundante

da medula óssea, que fornece sinais de crescimento e sobrevivência para as células neoplásicas (COSTA, DALLA PALMA, GIULIANI, 2019). Células do MM estão intimamente associadas ao microambiente da medula óssea, com uma variedade de interações adesivas ocorrendo entre a matriz extracelular (MEC) e a superfície das células MM. Em vez de representar um papel passivo, a própria MEC é um participante ativo na patogênese da doença interagindo diretamente com as células plasmáticas por meio da ligação de proteínas, receptores e enzimas moduladoras que são críticas para a sobrevivência e proliferação de células MM (ANDERSON e CARRASCO, 2011). À medida que o MM progride, alterações na expressão gênica e proteica ocorrem nas células neoplásicas e em alguns casos há independência do nicho medular com posterior disseminação para sítios extramedulares.

Apesar da clara importância das interações proteicas do microambiente no estabelecimento e progressão do MM, ainda há escassez de estudos que explorem o efeito das modificações sofridas pelas proteínas e como estas são capazes de contribuir funcionalmente no desfecho tumoral. Dentre os principais processos que alteram a expressão, função e estruturas das proteínas está a glicosilação (SILSIRIVANIT, 2019). A glicosilação é uma modificação proteica pós-traducional frequente, que resulta na adição de carboidratos, chamados “glicanos”, em proteínas e lipídios da superfície celular. Esses glicanos desempenham um papel crucial nas interações célula-célula e célula-matriz através da modulação da adesão e do tráfico celular (SILVA-NETO et al., 2017).

A glicosilação é cada vez mais reconhecida como um modulador do fenótipo maligno de células tumorais, onde a interação entre as células e o microambiente tumoral é alterada para facilitar processos como resistência a drogas e metástases (PINHO e REIS, 2015; WU et al., 2016). Alterações na glicosilação de moléculas de adesão da superfície celular, tais como ligantes de selectina, integrinas e mucinas, têm sido implicadas na patogênese de várias neoplasias sólidas e hematológicas, frequentemente com implicações prognósticas (VARKI, KANNAGI E TOOLE, 2009). No entanto, até o momento, a glicosilação tem sido relativamente pouco investigada no MM.

As células MM além de alterar a homeostase medular também se envolvem em uma cascata de invasão-metástase, que inclui a disseminação de células neoplásicas para microambientes permissivos anatomicamente distantes (PINHO e REIS, 2015). Este processo de várias etapas é caracterizado pela invasão celular, egresso via migração trans-endotelial para os vasos sanguíneos, circulação, direção a tecidos distantes e formação de micrometástase (VALASTYAN e WEINBERG, 2011; TALMADGE e FILDLER, 2010). Estes

eventos resultam em alterações nos glicanos da superfície das células tumorais e, conseqüentemente, as interações com lectinas endógenas são impactadas, o que influencia a potencial metastático das células tumorais (BIANCHI et al., 2012).

As galectinas são uma família de lectinas imunoreguladoras que se ligam à beta galactose e são expressas por uma grande variedade de células, elas têm uma gama de funções incluindo a mediação da interação célula-célula, adesão célula-matriz e apoptose (HAUSELMANN e BORSIG, 2014). Vários estudos apontam para um papel das galectinas na regulação das funções das células tumorais, como adesão, invasão e metástase (VASTA, 2012; RABINOVICH e CROCI, 2012). Além de se ligar a proteínas da matriz extracelular e conjugados de glicol da superfície celular de uma maneira dependente de carboidratos, as galectinas também podem estabelecer interações independentes de carboidratos com alvos citosólicos ou nucleares (REILY et al., 2019). Ao considerar as células do MM dentro e fora do microambiente medular é importante considerar as alterações dos glicanos e de seus ligantes, em especial as galectinas, que podem funcionalmente alterar as propriedades das proteínas da superfície celular. As múltiplas atividades biológicas das galectinas sugerem que essas proteínas são alvos terapêuticos potenciais valiosos e podem ser usadas como marcadores de diagnóstico, prognóstico e desfecho. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo inicial a avaliação dos níveis das galectinas 1,3,4, 7 e 9 em plasma de pacientes com mieloma múltiplo e suas associações com parâmetros clínicos e avaliação das conseqüências funcionais decorrentes da modulação de galectinas em modelos celulares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Mieloma múltiplo

2.1.1 Epidemiologia e fisiopatologia

O mieloma múltiplo (MM) caracteriza-se pelo acúmulo de plasmócitos neoplásicos (PN) na medula óssea e cursa, na grande maioria dos casos, com a expressão aumentada de uma proteína monoclonal (proteína M) quantificável no sangue e/ou urina e vários danos orgânicos relacionados (JOSHUA et al., 2019). Apesar de não ser um câncer comum, é a segunda oncohematologia mais incidente em todo o mundo (**Figura 1**). Em muitos países, como no caso do Brasil, o MM não faz parte das estatísticas de câncer o que gera escassez de dados epidemiológicos.

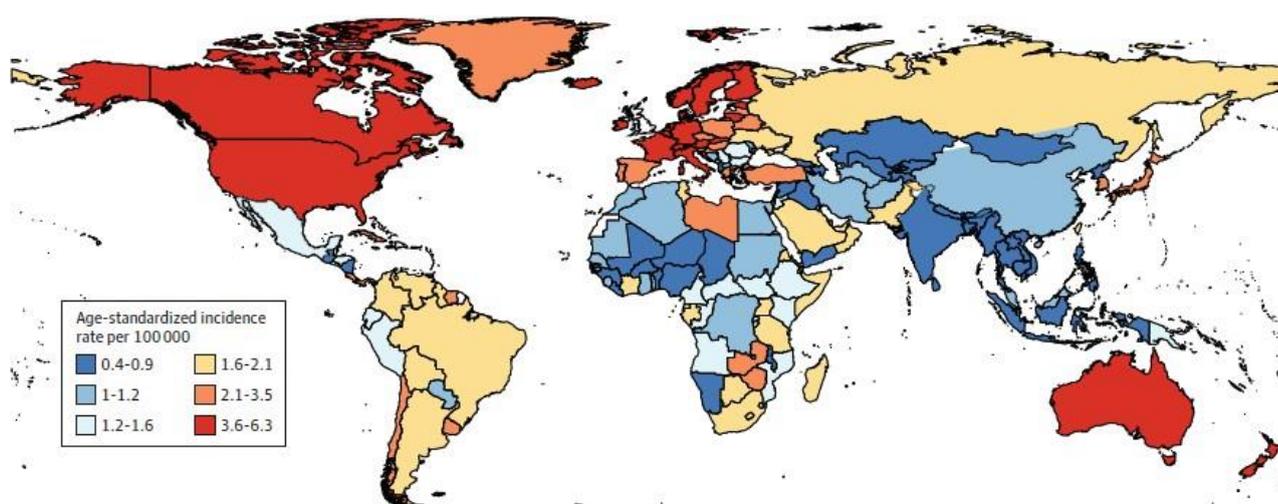
O MM é predominantemente uma doença do idoso, com mediana de idade ao diagnóstico de 69 anos; as taxas de incidência para homens são de 7,7 casos por 100.000 pessoas por ano e 4,9 para mulheres, nos Estados Unidos. Os negros são afetados 2 a 3 vezes mais quando comparados a indivíduos brancos. As taxas de mortalidade também são 2 a 3 vezes maiores em negros comparados a brancos sendo 7,9 por 100.000 homens e 5,4 por 100.000 mulheres versus 4,0 por 100.000 homens e 2,5 por 100.000 mulheres, respectivamente. Segundo a American Cancer Society, nos Estados Unidos, houve mais de 30.000 novos casos e mais de 12.000 mortes no ano de 2016 (SIEGEL et al., 2014; 2018).

Estatísticas adaptadas da publicação da American Cancer Society (ACS) e do banco de dados da National Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) afirma que a taxa de sobrevida em 5 anos para pessoas com MM é de cerca de 50%. Para os 5% das pessoas diagnosticadas precocemente, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 71%. Se o câncer se espalhar para uma parte distante do corpo, a taxa de sobrevida em 5 anos é de 48%. As taxas de sobrevivência aumentaram de forma constante ao longo da última década, o que reflete o impacto do progresso recente no tratamento desta doença.

No Brasil dados publicados em 2011 revelaram que a incidência e prevalência do MM foram de 5,7 e 0,7, respectivamente, a cada 100.000 habitantes na região do Vale do Paraíba, em São Paulo (CALLERA et al., 2011). Os dados mais recentes disponíveis são de um estudo conduzido por Curado e colaboradores que descreve a incidência, as taxas de mortalidade e as tendências do MM na América Latina. Segundo o estudo, o Brasil apresentou um aumento na tendência de mortalidade para indivíduos acima de 60 de ambos sexos, sendo 1,4% para homens

e 0,9% mulheres, mesmo com redução do tempo de espera até o transplante de medula óssea em alguns centros de referência (SACCILOTTO et al, 2015; CURADO et al., 2018).

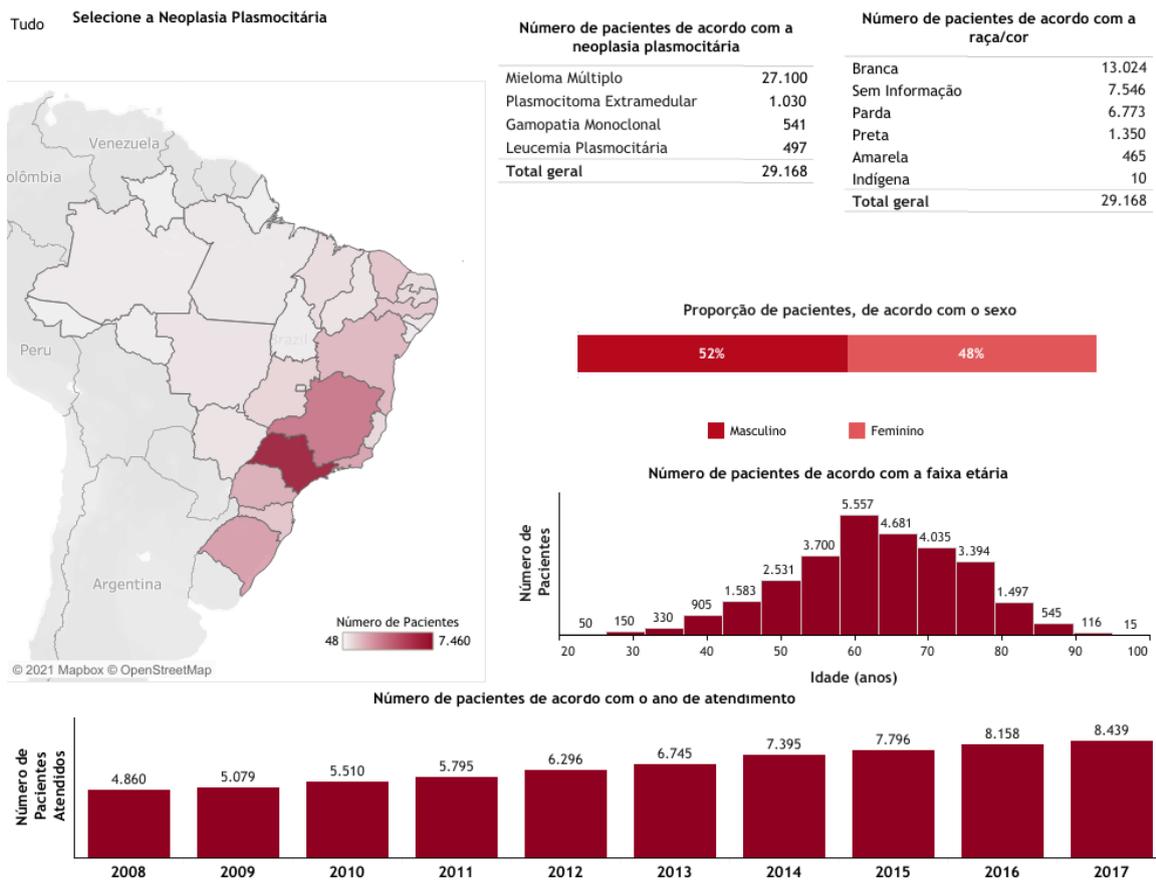
Figura 1. Distribuição do mieloma múltiplo no mundo. O mapa representa a incidência de MM em todo o mundo para ambos os sexos no ano de 2016, as regiões laranjas e avermelhadas concentram a maior quantidade de casos notificados. Os países com maior número de incidência e morte são Estados Unidos, China e Índia, respectivamente.



Fonte: COWAN et al., 2018.

Em 2019, o Observatório de Oncologia publicou em seu site um estudo retrospectivo descritivo, sobre a epidemiologia do Mieloma Múltiplo no Brasil no período de 10 anos. O estudo baseou-se em dados secundários e abertos disponibilizados pelo Sistema de Informações Ambulatoriais do SUS- SIA/SUS e em informações das bases de dados das APAC (Autorização de Procedimentos de Alta Complexidade) de Quimioterapia e Radioterapia do SIA/SUS e as informações da base de dados dos Óbitos do SIM/SUS, de todos os estados brasileiros, no período de 2008 a 2017. Foi demonstrado que a mediana de idade dos pacientes foi de 63 anos com predomínio de sexo masculino e assim como nos países da Europa e dos EUA, nota-se um aumento progressivo das taxas de diagnóstico, com o número de pacientes atendidos quase dobrando no período analisado, subindo de 4.860 pacientes em 2008 para 8.439 pacientes em 2017. Foi um crescimento de 174% na comparação entre 2008 e 2017 (Figura 2 (Corrêa Neto 2019)).

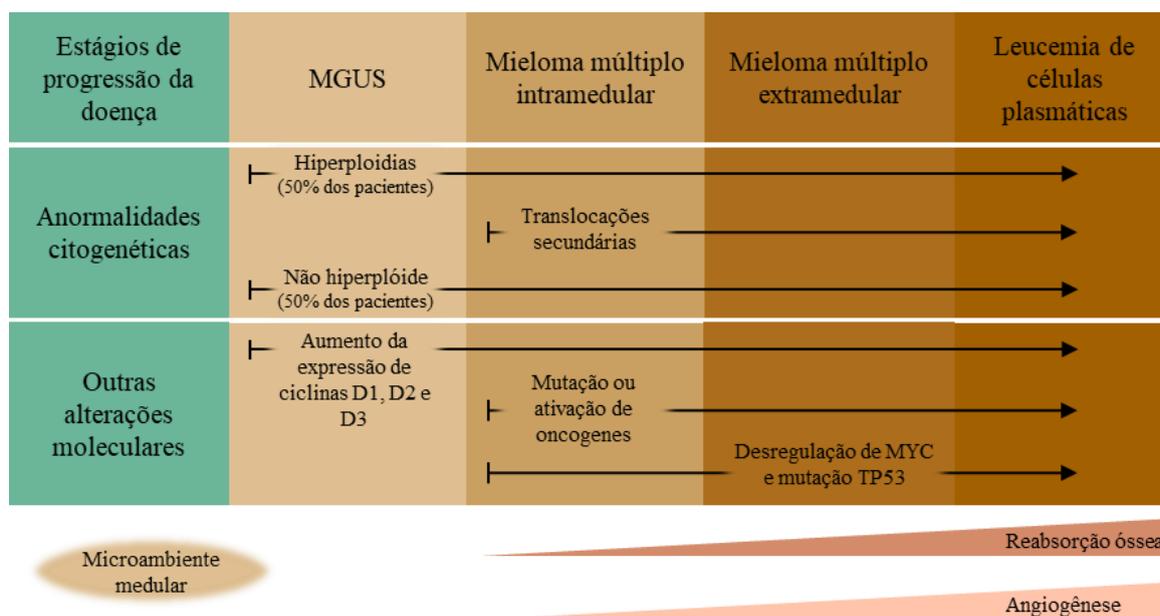
Figura 2 Características dos pacientes diagnosticados com Mieloma múltiplo e distúrbios relacionados, tratados no Sistema único de saúde no período de 2008 a 2017.



Fonte: Corrêa Netto (2019) DISPONÍVEL EM <https://observatoriodeoncologia.com.br/epidemiologia-do-mieloma-multiplo-e-disturbios-relacionados-no-brasil/> ACESSO EM 01/01/2021

O MM surge de uma proliferação pré-maligna assintomática de células plasmáticas derivadas de células B no centro pós-germinal. Alterações genéticas, mudanças ambientais e microambientais levam à transformação dessas células em neoplásicas. Mais comumente a evolução se dá a partir de uma gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS) que progride para mieloma múltiplo indolente (MMI) e, finalmente, para mieloma múltiplo sintomático ou ativo (MMS) (BIANCHI E ANDERSON, 2014). Os mecanismos etiopatogênicos exatos que levam ao MM são desconhecidos, mas várias alterações foram identificadas. A progressão para as formas sintomáticas no MM requer uma sucessão de eventos genéticos nas células acometidas (**Figura 3**) e de alterações no microambiente tumoral que darão suporte ao crescimento dos plasmócitos neoplásicos (PALUMBO e ANDERSON, 2011; KUEHL e BERGSAGEL, 2012) bem como servirão de arcabouço para o desenvolvimento de todos os danos orgânicos relacionados ao MM.

Figura 3. Alterações genéticas na patogênese do MM. Algumas anormalidades cromossômicas tais como trissomias e translocações nas cadeias pesadas das imunoglobulinas estão comumente presentes nos PN. Além destas, há também translocações secundárias e mutações envolvendo MYC, RAS e TP53 que desempenham um papel fundamental na determinação do tumor, progressão e resistência a drogas.



Fonte: PALUMBO e ANDERSON, 2011, modificado.

Os PN acumulam várias lesões genéticas, como translocações, mutações, deleções ou amplificações, que levam à desregulação de diferentes vias proliferativas. No MM, as principais translocações já descritas envolvem os loci das imunoglobulinas, potencializando o controle de diferentes grupos de oncogenes como ciclinas (D1, CCND3, FGFR3), MYC, MAF e MAFB. Um evento genético posterior é a mutação e a deleção do cromossomo no locus 17p13, que carrega o gene onco-supressor p53. Outras mutações recorrentes envolvem genes da via ERK (NRAS, BRAF e KRAS) e da via do fator nuclear-kappa B (NF-kB) (CYLD, TRAF3 e BIRC2/3) (GONZALEZ, et al., 2007; ANNUNZIATA et al., 2007; MORGAN, WALKER e DAVIES, 2012). Além das alterações moleculares das células plasmáticas, interações anormais entre as células plasmáticas e a medula óssea, bem como a angiogênese aberrante, são marcas da progressão da doença.

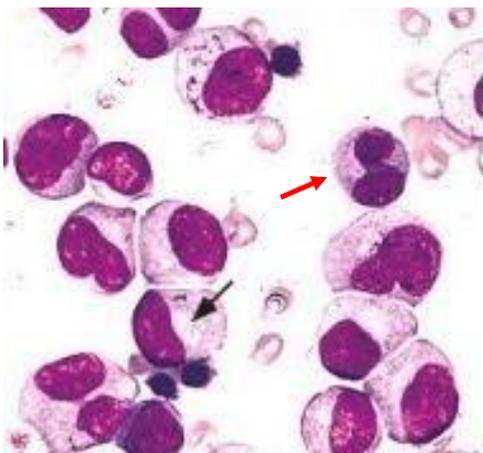
2.1.2 Critérios diagnósticos

Diante da suspeita clínica, o primeiro passo para o diagnóstico no MM é a identificação do aumento de PN (acima de 10%) em um tecido, quase sempre na medula óssea. Os plasmócitos são grandes, redondos ou elípticos, com abundante citoplasma basofílico e um núcleo localizado excêntricamente, com cromatina grosseiramente concentrada (**Figura 4**). PN podem ser encontrados infiltrando também outros tecidos, como pele, órgãos e tecidos parenquimatosos e no caso de estágios avançados a corrente sanguínea (leucemia plasmocítica). A avaliação da quantidade de PM é feita por meio de mielograma e biopsia de medula, em

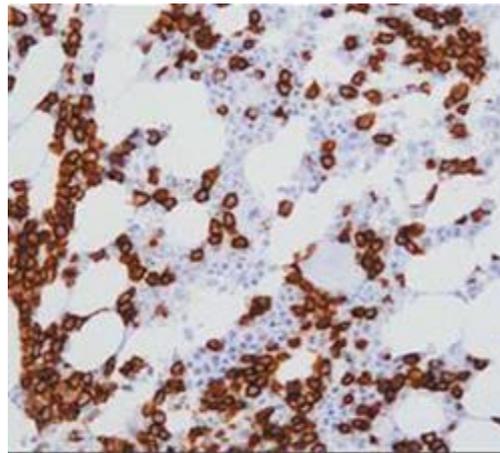
pacientes com MM não secretor, o diagnóstico é baseado na presença de 30% de PM na medula óssea ou de um plasmocitoma comprovado por biópsia (DURIE et al, 2003).

Figura 4. Morfologia dos PN no MM. Morfologicamente os plasmócitos apresentam um aspecto ovoide com núcleo esférico e deslocado do centro da célula. **A)** Devido à hipertrofia do retículo endoplasmático rugoso, seu citoplasma apresenta basofilia, é possível ver áreas com Golgi predominante (seta preta). No MM é possível ver formas aberrantes, binucleadas (seta vermelha) ou multinucleadas; figuras mitóticas; e nucléolos proeminentes. **B)** Imunohistoquímica com marcação de CD138 e consequente identificação dos PM na medula óssea.

A)



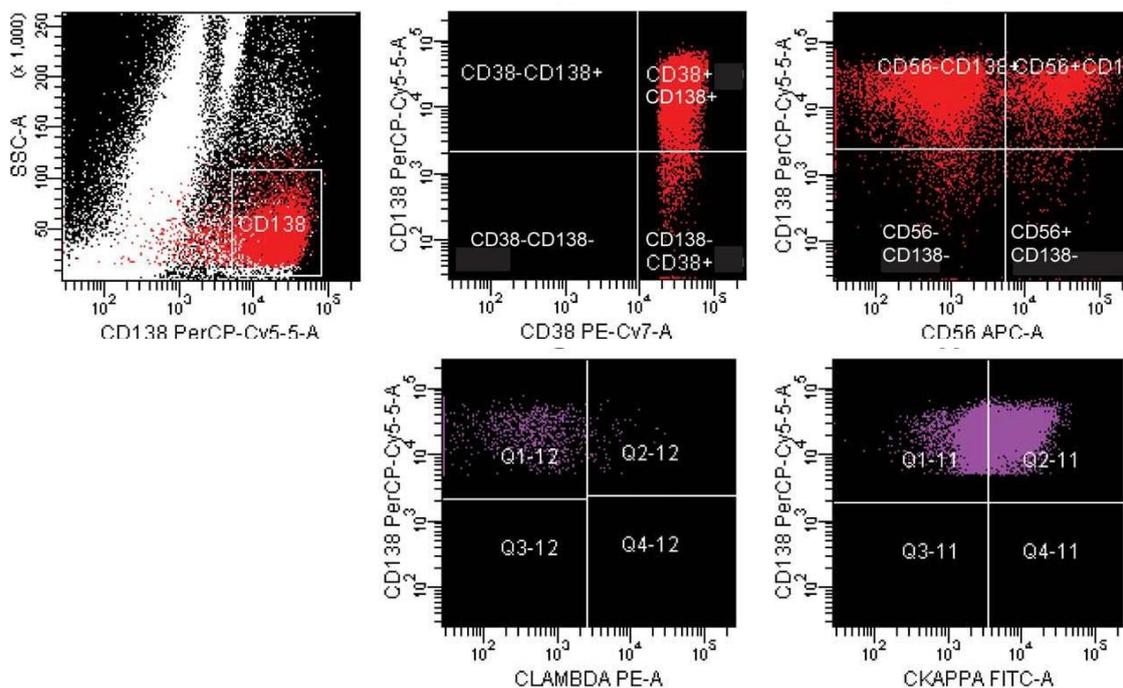
B)



Fonte: <https://ccr.cancer.gov/news/inthejournals/landgren>, acesso em 30 de maio de 2018 as 14:30.

Imunofenotipicamente, os PN expressam fortemente CD138 e CD38 e cadeia leve monotípica (κ ou λ). Ao contrário dos plasmócitos normais, os PM normalmente não apresentam expressão de CD19 (antígeno de linfócito B), CD27 e CD45 (proteína tirosina fosfatase C do tipo receptor), e expressam CD56 de forma aberrante também conhecida como molécula de adesão celular neuronal 1 (NCAM1) (BIANCHI E ANDERSON, 2014 (**Figura 5**). Essas diferenças fornecem uma base para o uso da citometria de fluxo multiparamétrica para diagnóstico e monitoramento (BIANCHI E ANDERSON, 2014).

Figura 5. Imunofenotipagem de PN em aspirado medular. Nos PN há também expressão aumentada de CD28 (glicoproteína de superfície CD28 específica para células T) e CD38. (adenosina difosfato) cíclico (ADP) - ribolase hidrolase 1).



Fonte: BIANCHI E ANDERSON, 2014.

Além dos achados celulares, em 2003 o International Myeloma Working Group (IMWG) definiu alguns critérios de diagnóstico com intuito de agrupar as manifestações clínicas típicas no mieloma múltiplo, sendo elas: hipercalcemia, disfunção renal, anemia e dor óssea, sob o acrônimo CRAB. Esses critérios são usados para distinguir entre MM ativo e seus estados precursores, MGUS e MMI, essa distinção é relevante não só para classificação e diagnóstico, mas também na decisão quanto ao início da terapia e o prognóstico. (NAKAYA et al., 2017).

A anemia está presente em cerca de 60% a 80% dos pacientes no momento do diagnóstico (IBRICEVIC-BALIC et al, 2016). Geralmente está relacionada à inibição da produção de precursores eritróides devido a infiltração medular e/ou a disfunção renal (BIRGEGARD; GASCÓN; LUDWIG, 2006). Diversos estudos, porém, descrevem um outro mecanismo funcional que envolve a participação do hormônio hepcidina e da interleucina 6 (IL-6), presentes em maior quantidade tanto na urina quanto no soro de pacientes. A superprodução de hepcidina, induzida pela IL-6, resulta em redução de ferro sérico disponível para eritropoiese, exacerbando os efeitos da anemia associados ao tumor (SHARMA et al, 2008; GANZ e NEMETH, 2011; MAES et al, 2010 MANOLOV et al, 2018).

A doença óssea no MM é a característica mais importante da doença, com cerca de 80% dos pacientes apresentando dor óssea no momento do diagnóstico e até 90% dos pacientes desenvolvendo lesões ósseas durante o seu curso (MELTON et al., 2005; RODMAN, 2009). A doença óssea no MM tem impacto direto na qualidade de vida e tem influência negativa na progressão da doença. Mais de 80% dos pacientes têm diferentes graus de danos nos ossos, o que é chamado de doença óssea relacionada ao mieloma (DMO). Dor óssea intensa, lesões osteolíticas, fraturas patológicas, colapso vertebral e hipercalcemia são os sintomas comuns de DMO. (PANARONI et al., 2017). Comparados a outros pacientes com mieloma sem DMO, os pacientes com fratura patológica teriam mortalidade 20% maior e custariam 50.000 dólares a mais pelo atendimento (SCHULMAN; KOHLES, 2007; SAAD et al., 2007).

O microambiente medular é um dos principais contribuintes para o crescimento do tumor e o processo destrutivo. O remodelamento ósseo está alterado no MM e é caracterizado pela ativação generalizada dos osteoclastos, que resulta em reabsorção óssea exacerbada e pela função osteoblástica suprimida com consequente redução na formação óssea (DELGADO-CALLE; BELLIDO; RODMAN, 2014). Os fatores produzidos pelos PM que podem aumentar a atividade osteoclástica incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), proteína inflamatória macrofágica-1 α (MIP-1 α), interleucina-3 (IL-3) e interleucina-6 (IL-6) (CHOI ET AL., 2000; GIULIANI ET AL., 2004; LEE ET AL., 2004; GUNN ET AL., 2006; RODMAN, 2010; YACCOBY, 2010). Outras moléculas derivadas de osteócitos que regulam a atividade de osteoblastos e osteoclastos ao liberar fatores parácrinos, são o receptor do fator nuclear kappa B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), que regulam localmente a formação e reabsorção óssea (BOLZONI et al., 2018).

Outro dano orgânico comum é o comprometimento renal presente em 50% dos pacientes durante a progressão do MM e ocorre principalmente como resultado do dano tubular direto pelo excesso de paraproteína, níveis elevados de cálcio e/ou ácido úrico, infecção, e os efeitos dos medicamentos como antibióticos nefrotóxicos, medicamentos anti-inflamatórios ou agentes de contraste ou corantes usados para estudos diagnósticos (ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU et al., 2007; DIMOPOULOS et al., 2008). Em alguns pacientes com proteinúria de Bence-Jones o acúmulo de cadeias leves causa danos tubular severo e resulta na síndrome de Fanconi, um tipo de dano tubular renal seletivo que resulta na presença de aminoácidos e fosfatos na urina, que por sua vez pode causar doença óssea metabólica (IMWG, 2017).

Além dos critérios CRAB, há ainda diversas manifestações clínicas comumente relatadas pelos pacientes (**Quadro 1**) e que são resultado da presença de pelo menos 1 desses 3 mecanismos patogênico do MM:

1. Falha da medula óssea secundária à infiltração por PM;
2. Deposição/precipitação de Ig monoclonal ou de cadeias leves livres;
3. Alteração em citocinas na medula óssea.

Quadro 1. Mecanismos patogênicos, sinais e achados diagnósticos mais comuns no MM. Na tabela estão descritos alguns dos sinais e sintomas / sinais mais comuns apresentados pelos pacientes com MM recém-diagnosticado, além dos seus achados diagnósticos correlatos e mecanismos patogênicos subjacentes.

Sinais e sintomas	Achados diagnósticos	Mecanismos patogênicos
Dor nas costas/ossos, compressão da medula espinhal, cauda equina	Lesões líticas, fraturas patogênicas	Mieloftise, plasmocitoma solitário, aumento da osteoclasogênese, inibição de osteoblastos
Fadiga, indisposição	Anemia	Mieloftise, diminuição da produção de EPO, hemólise
	Dano renal	Deposição de cadeia leve, nefropatia do mieloma, vasoconstrição induzida por hipercalcemia, amiloidose AL, nefropatia por urato
	Hipercalcemia	Desbalanço de OC/OB secundário ao efeito direto do MM e citocinas na MO
	Hepatite, disfunção hepática	Deposição amiloide, infiltração de CMM
Infecções recorrentes	Hipogamaglobulinemia, leucopenia	Mieloftise
Encefalopatia	Hipercalcemia	Ver acima
	Dano renal agudo	Ver acima
	Pico M elevado, tipicamente IgM; viscosidade sérica elevada	Hiperviscosidade
Neuropatia periférica	Poliradiculopatia	Amiloidose AL, crioglobulinemia do tipo I, plasmocitoma
Cefaleia, convulsões, distúrbios visuais	Pico M elevado, tipicamente IgM; viscosidade sérica elevada	Hiperviscosidade
	CMM presentes no líquido cefalorraquidiano, aumento leptomenigeal na RM	Infiltração do MM no sistema nervoso central

Paralisia do nervo cranial	CMM presentes no flúido cérebro-espinal, aumento leptomenigeal na RM	Infiltração do MM no sistema nervoso central
Dificuldades respiratórias	Cardiomiopatia restritiva ou dilatada	Amiloidose AL cardíaca
	Efusão pleural	Infiltração de CMM, plasmocitoma
	Edema pulmonar	Hiperviscosidade
	Infiltrado pulmonar	Amiloidose AL pulmonar, plasmocitoma
Sangramentos, petequias	Pico M elevado, tipicamente IgM; viscosidade sérica elevada	Hiperviscosidade
	Trombocitopenia	Mieloftise
Púrpura	Crioglobulina do tipo I	Crioglobulinemia do tipo I
	Teste de cadeia leve livre (Freelite) anormal, comumente com cadeia lambda	Amiloidose AL
Acrocianose	Crioglobulinemia do tipo I	Crioglobulinemia do tipo I

Fonte: Adaptado de BIANCHI E ANDERSON, 2014.

Durante décadas, o diagnóstico do MM exigiu a presença de todos os critérios CRAB, esta condição era destinada, principalmente, para impedir que pacientes com MGUS e MMI recebessem doses de quimioterapia tóxicas e desnecessárias (RAJKUMAR; LARSON, KYLE, 2011; LARSEN et al., 2013). Em 2014, a revisão IMWG permitiu o uso de outros biomarcadores específicos para definir a doença, além dos recursos CRAB estabelecidos, chamados de “eventos definidores de mieloma”. Dentre eles: hiperviscosidade sanguínea, amiloidose e infecção por repetição (mais de 2 episódios em 12 meses). A presença de pelo menos um desses marcadores juntamente com a contagem de plasmócitos no mielograma, razão kappa/lambda e análise das lesões ósseas são consideradas suficientes para o diagnóstico de mieloma múltiplo, independentemente da presença ou ausência de sintomas ou características CRAB (RAJKUMAR, 2016).

Os testes recomendados para o diagnóstico de mieloma incluem a realização de um exame detalhado com história médica e exame físico, exames laboratoriais de rotina (hemograma completo, análise química, eletroforese de proteínas séricas e urinárias com imunofixação e quantificação de proteína monoclonal) e exame da medula óssea (biópsia e aspirado para citogenética). A radiografia convencional da coluna vertebral, crânio, tórax, pelve, úmeros e fêmures continua sendo o padrão para identificar lesões ósseas mielorelizadas.

A ressonância magnética (RM) é recomendada para avaliar sintomas em pacientes com resultados normais na radiografia convencional e em todos os pacientes com radiografias sugerindo a presença de plasmocitoma solitário (KYLE et al., 2009; FONSECA et al, 2009).

O prognóstico do MM pode ser determinado por vários fatores que identificam cada paciente segundo seu risco. Em 1975, o sistema de estadiamento Durie-Salmon foi desenvolvido baseado numa combinação de fatores (hemoglobina, cálcio sérico, concentração do componente monoclonal e acometimento ósseo) que se correlaciona com a massa tumoral (DURIE E SALMON, 1975). De acordo com esse sistema, existem três estágios, chamados de estágios I, II ou III (1, 2 ou 3). Cada estágio é ainda classificado em A ou B, dependendo de a função renal ter sido afetada. A classificação B significa que há dano renal significativo (GREIPP ET AL., 2005; MARTINEZ 2007).

Em 2005, um novo sistema de estadiamento foi desenvolvido pelo International Myeloma Working Group (IMWG), avaliando a $\beta 2$ microglobulina sérica ($\beta 2$ -M) como potencial fator prognóstico. A combinação de $\beta 2$ -M e albumina sérica forneceram uma classificação mais poderosa, simples e reprodutível, surgindo assim o International Staging System (ISS), agora usado mais comumente para classificar o mieloma múltiplo. O ISS possui 3 estágios baseados na dosagem da albumina sérica e nos níveis séricos de $\beta 2$ -M. Em agosto de 2015 o IMWG publicou o Sistema de Estadiamento Internacional Revisado (R-ISS) (**Tabela 1**) para o MM afim de incorporar dois fatores prognósticos adicionais: risco genético avaliado por FISH e nível de LDH.

Tabela 1. Estadiamento conforme Durie- Salmon e índice prognóstico internacional (ISS) do mieloma múltiplo.

<i>FATOR PROGNÓSTICO</i>		<i>CRITÉRIOS</i>
Estadio ISS	I	$\beta 2$ microglobulina sérica < 3,5 mg/L, albumina sérica \geq 3,5 g/dL
	II	Estadio ISS nem I nem III
	III	$\beta 2$ microglobulina sérica \geq 5,5 mg/L
CA por iFISH	Alto risco	Presença de del(17p) e/ou translocação t(4;14) e/ou translocação t(14;16)
	Risco padrão	CA não alto risco
LDH	Normal	LDH sérica < o limite superior do normal
	Alto	LDH sérica > o limite superior do normal
<i>Um novo modelo para estratificação de risco para mieloma múltiplo</i>		
Estadio R-ISS	I	Estadio ISS I e CA de risco padrão por iFISH e LDH normal
	II	Estadio R-ISS nem I nem III
	III	Estadio ISS III e CA de alto risco por iFISH ou LDH alta

Abreviações: CA, anormalidades cromossômicas; iFISH, hibridização por fluorescência in situ interfase; ISS, Sistema de Estadiamento Internacional; LDH, desidrogenase láctica, R-ISS, Sistema de Estadiamento Internacional Revisado.

Fonte: Publicação do International Myeloma Foundation Latin America.

2.1.3 Tratamento

O cenário para o tratamento do MM tem se transformado radicalmente durante a última década graças a introdução de vários novos fármacos com diferentes mecanismos de ação, o que levou a doença de um status intratável a uma que ainda não é curável, mas tratável principalmente com terapia ambulatorial (POZZI et al., 2013; KUMAR et al., 2013, 2016). Antes dos novos agentes talidomida, lenalidomida e bortezomib estarem disponíveis, o MM foi caracterizado por uma relativamente fraca profundidade de remissão com opções de quimioterapia convencional, como melfalano + prednisona (MP) ou vincristina-adriamicina-dexametasona (VAD) (KYLE e RAJKUMAR, 2008). A quimioterapia de alta dose com transplante autólogo de células-tronco (ASCT) foi a primeira intervenção demonstrada por melhorar a sobrevida global quando comparada aos regimes convencionais e rapidamente se tornou a meta padrão para todos os pacientes com MM (CHILD et al, 2008; PREESHAGUL, VAN BESIEN e MARK, 2014).

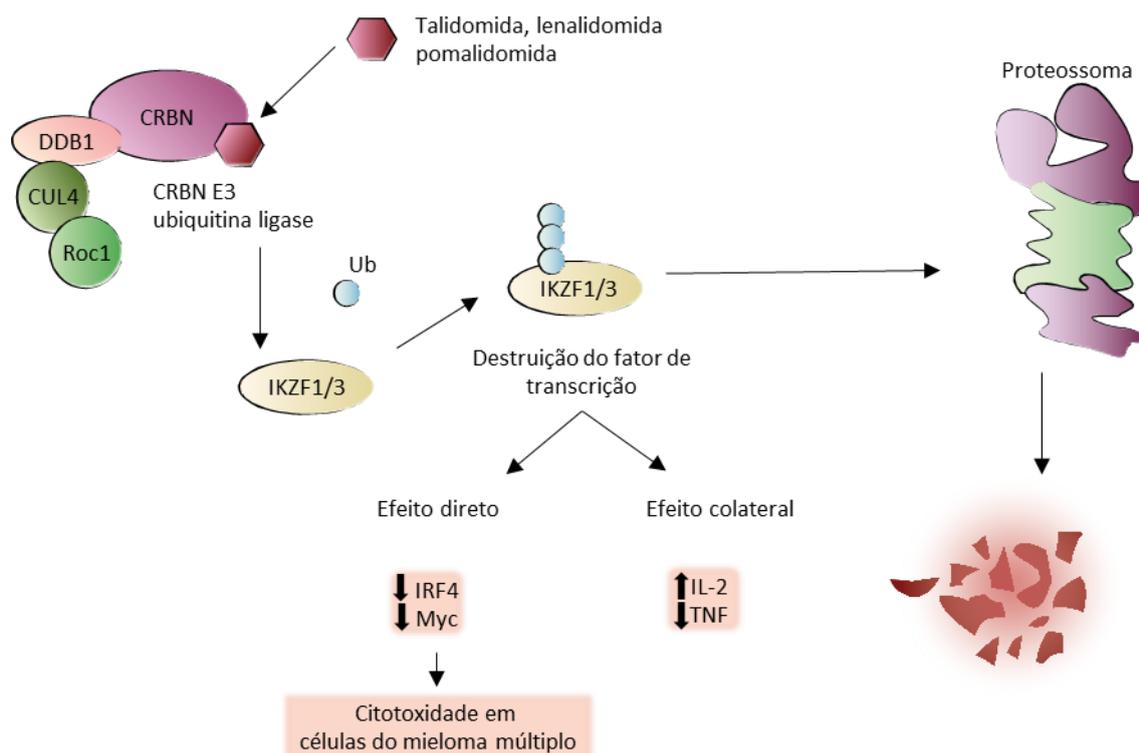
Novos agentes foram desenvolvidos no final da década de 1990 e início de 2000 - começando com as chamadas drogas imunomoduladoras (IMiDs), tais como a talidomida e lenalidomida e seguidos pelos inibidores de proteassoma (IPs), bortezomib, carfilzomibe e o ixazomibe. Mais recentemente, anticorpos monoclonais (MAbs), como o ataratumumab e o elotuzumab, e os agentes de acetilação histona, como o panobinostat, também foram aprovados a Food and Drug Administration (FDA) (RAJKUMAR, 2016). A disponibilidade de tantos novos agentes levou ao desenvolvimento de uma infinidade de opções de tratamento viáveis que também alteraram o paradigma da terapia.

A talidomida foi o primeiro IMiD desenvolvido e utilizado para o tratamento de MM, embora não seja usado com frequência devido sua capacidade de gerar neurotoxicidade, fadiga e constipação pode ainda ser um agente útil, especialmente em pacientes com insuficiência renal ou citopenias, nos quais pode ser usado com segurança em combinação com outros agentes, como agentes alquilantes, dexametasona e IPs com bom efeito (MORGAN et al., 2011; CAVO et al., 2012; STEWART et al., 2015; SONNERVELD et al., 2015). A lenalidomida é uma IMiD de segunda geração que é mais potente e geralmente tem um perfil de segurança melhor do que a talidomida. É aprovada para terapia inicial para mieloma e doença recorrente. A sua combinação com dexametasona tem sido o padrão de tratamento para mieloma múltiplo recorrente de acordo com dois grandes ensaios clínicos randomizados (WEBER et al., 2007;

DIMOPOULOS et al., 2009). Também pode ser combinado com IP, agentes alquilantes, e MAbs, levando a altas taxas de resposta (RICHARDSON et al., 2010; REECE et al., 2015; PLESNER et al., 2016). A pomalidomida foi aprovada pela Food and Drug Administration para terapia combinada com dexametasona em pacientes com recaída e parece induzir respostas mesmo em pacientes resistentes à lenalidomida ou refratários (SAN MIGUEL et al., 2013). A associação de pomalidomida, bortezomibe e dexametasona está associada a uma taxa de resposta de 65% e 80% em pacientes refratários à lenalidomida, mesmo com exposição prévia a um IP (LACY et al., 2015).

O mecanismo de ação da talidomina e seus derivados se dá pela ligação ao cereblon, um componente crítico do complexo de ligase de ubiquitina E3, resultando na rápida ubiquitinação e degradação de dois fatores específicos de transcrição de células B, Ikaros (IKZF 1) e Aiolos (IKZF3) (**Figura 6**) e acúmulo tóxico de proteínas que levam à morte celular. Além disso, eles podem causar citotoxicidade mediada por radicais livres induzindo dano direto ao DNA. Eles também têm propriedades inibitórias anti-angiogênicas, imunomoduladoras e fator de necrose tumoral alfa (ITO et al., 2010; KRONKE et al., 2014; LEE et al., 2014).

Figura 6. Principal mecanismo de ação dos IMID's. A talidomida bem como seus análogos, se ligam à proteína cereblon (CRBN), que ativa a atividade enzimática do complexo de ubiquitina ligase CRBN E3. Os fatores de transcrição Ikaros (IKZF1) e Aiolos (IKZF3) são modificados com moléculas de ubiquitina (Ub), visando a proteólise. Isso altera a função das células T e B, com um resultado tóxico para as células do mieloma múltiplo.



Fonte: Stewart, 2014.

Os inibidores do proteassoma são considerados componentes críticos de qualquer esquema sendo usado para tratar pacientes com MM de alto risco ou pacientes com insuficiência renal. Podem estar associados a um risco aumentado de cardiotoxicidade, e essa complicação potencial deve ser lembrada quando os pacientes apresentam sintomas de insuficiência cardíaca congestiva. Os representantes dos IP's usados no tratamento do MM são o bortezomibe, carfilzomibe e o ixazomibe (YUI et al., 2016; GRANDIN et al., 2015; HIDEHIMA et al., 2016).

O bortezomibe é um IP reversível de primeira classe que é administrado por via parenteral. Juntamente com a dexametasona, pode ser combinado com ciclofosfamida, talidomida e lenalidomida, resultando em regimes altamente ativos para mieloma múltiplo recorrente (REEDER et al., 2009; PINEDA-ROMAN et al., 2008; RICHARDSON et al., 2009). O Carfilzomib é um novo tetrapeptídeo de epoxicetona que se liga e inibe irreversivelmente ao proteassoma. É administrado por via intravenosa foi aprovado para o MM em recidiva e refratário em 2013 para pacientes que foram previamente tratados com lenalidomida e bortezomibe (SIEGEL et al., 2010). Os principais efeitos adversos do carfilzomibe são fadiga, anemia, náusea, trombocitopenia e hipertensão (DIMOPOULOS et al., 2016). A incidência de neuropatia com carfilzomib é baixa e, portanto, o carfilzomibe é um agente atraente em pacientes com neuropatia preexistente e nos quais a terapia com um IP é considerada importante. Já o ixazomibe é o primeiro IP oral aprovado pela Food and Drug Administration em 2015 para terapia de mieloma múltiplo em recidiva em combinação com lenalidomida e dexametasona (MOREAU et al., 2016). Embora o risco de neuropatia periférica associada ao ixazomibe seja menor do que com o bortezomibe, está associada a uma maior incidência de toxicidade gastrointestinal (náuseas, vômitos e diarreia).

O daratumumabe e o elotuzumabe são anticorpos monoclonais utilizados no tratamento do MM, voltados para o CD38 e o SLAMF7 respectivamente (LONIAL et al., 2015, 2016; LAKHORST et al., 2015). O daratumumab, aprovado pela FDA em 2015, pode ser utilizado como monoterapia em pacientes que receberam pelo menos três terapias prévias, incluindo um inibidor de proteassoma e um agente imunomodulador ou são duplamente refratários, segundo os estudos CASTOR E POLLUX, demonstra ainda mais atividade quando combinado com PIs ou IMiDs (PALUMBO et al., 2016; DIMOPOULOS et al., 2016). O daratumumab mata as células do mieloma através de vários mecanismos, incluindo

citotoxicidade celular dependente de anticorpos, citotoxicidade dependente de complemento e por interferir com a atividade enzimática de CD38 (DE WEERS et al., 2011; HORESTEIN et al., 2015).

O elotuzumab é um MAb que tem como alvo a molécula sinalizadora de ativação de linfócitos, SLAMF7, que é expressa nas células natural killer (NK), linfócitos T ativados e plasmócitos. Foi o primeiro MAb aprovado para terapia nos pacientes em recidiva, embora não tenha atividade de agente único contra MM (DINGLI et al., 2017). A maioria das células do MM expressa a molécula sinalizadora de ativação de linfócitos F7, e essa sinalização independe da anormalidade citogenética subjacente que conduz a doença. O mecanismo de ação do elotuzumabe se dá pela ativação direta de células NK bem como por citotoxicidade celular dependente de anticorpos (COLLINS et al., 2016).

Outra classe de medicamentos utilizados incluem os agentes alquilantes. Os representantes dessa classe são: ciclofosfamida, melfalano e bendamustina. Embora possam ser usados com agente único, quase sempre são usados na terapia combina com IMiDs e IP e até mesmo com o corticoide dexametasona (MOREAU ET AL., 2011; KUMAR et al., 2012; KHAN et al., 2012; LINTZSCH et al., 2012; LUDWING et al., 2014; MATEOS et al., 2016)

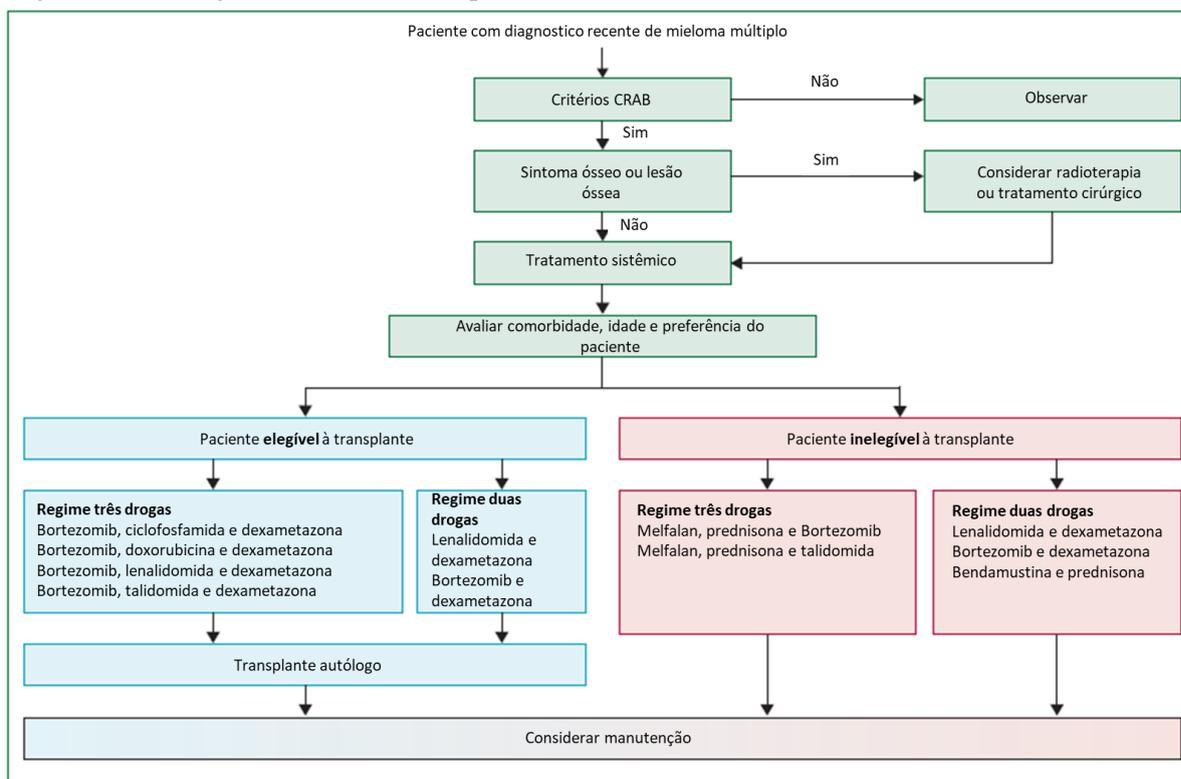
A ciclofosfamida é usado como agente único para terapia de manutenção após transplante autólogo de células-tronco (ASCT) (COOK et al., 2014). Enquanto que o melfalano (agente mais antigo para o tratamento) tem seu uso estabelecido como o agente condicionante de escolha antes do ASCT e para pacientes que não são candidatos a ASCT. Os principais efeitos adversos associados aos agentes alquilantes são fadiga, erupção cutânea, dor de cabeça, constipação e citopenias.

Vários agentes estão sendo estudados atualmente em ensaios clínicos com resultados promissores principalmente para terapia com pacientes em recidiva. Dentre esses estão um IP oral, oprozomib; Selinexor um inibidor oral da quinase dependente de ciclina; Venetoclax, inibidor seletivo da exportina 1; Isatuximab, inibidor seletivo de bcl-2 e um novo MAb que também tem como alvo CD38 e pode ter um perfil farmacológico mais favorável do que o daratumumab (RICHARDSON et al., 2016; KUMAR et al., 2015; ROSEBECK et al., 2016; RAJAN et al., 2016; ZAGOURI et al., 2016). Outros agentes em ensaios iniciais incluem inibidores do checkpoint imunológico (pembrolizumab e nivolumab). O surgimento desses e de novas terapias de combinação criam um novo paradigma para o tratamento do MM.

Dado o aumento nas opções terapêuticas disponíveis para pacientes com MM, um dos principais desafios para médicos e órgãos de financiamento é decidir quais agentes usar e em que ordem e / ou combinação, as opções de tratamento podem variar dependendo se o

paciente tem mieloma múltiplo recém-diagnosticado, é elegível para transplante, tem mieloma múltiplo recidivante e / ou refratário ou é considerado ter doença de alto risco (GOLDSCHMIDT et al.,2019). No geral, no esquema de indução são utilizados esquemas compostos por 2 (terapia dupla) ou 3 drogas (terapia tríplice), sendo uma delas corticóide em altas doses. Os protocolos quimioterápicos mais comuns são: Lenalidomida e Dexametasona (Rd); Bortezomib, Lenalidomida e Dexametasona (VRD); Bortezomib, Talidomida e Dexametasona (VTD); Bortezomib, Ciclofosfamida e Dexametasona (VCD) (Figura 7). (Rajkumar e Kumar 2016; (D'agostino et al. 2019).

Figura 7. Conduta clínica para pacientes de MM recém-diagnosticados. Estão listados os principais, não todos, esquemas quimioterápicos de tratamento usados em pacientes recém-diagnosticados elegíveis ou não ao transplante.



Fonte: Adaptado de Röllig, Knop e Bornhäuser, 2015.

Nos pacientes tratados em hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS), de acordo com as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo, regidas pela Portaria nº 708, agosto 2015, os esquemas disponíveis são mais restritos e em geral composto por Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona (CTD) ou Talidomida e Dexametasona (TalDexa), para os pacientes elegíveis a transplante de TCTH ou Melfalano, Talidomida e Prednisona (MPT) ou Melfalano e Prednisona (MP) para os idosos ou não elegíveis, com taxas de resposta, sobrevida global e sobrevida livre de progressão inferiores aos esquemas utilizados no mundo, assim como, quando comparado aos

pacientes tratados na medicina privado em nosso próprio país (Brasil 2015).

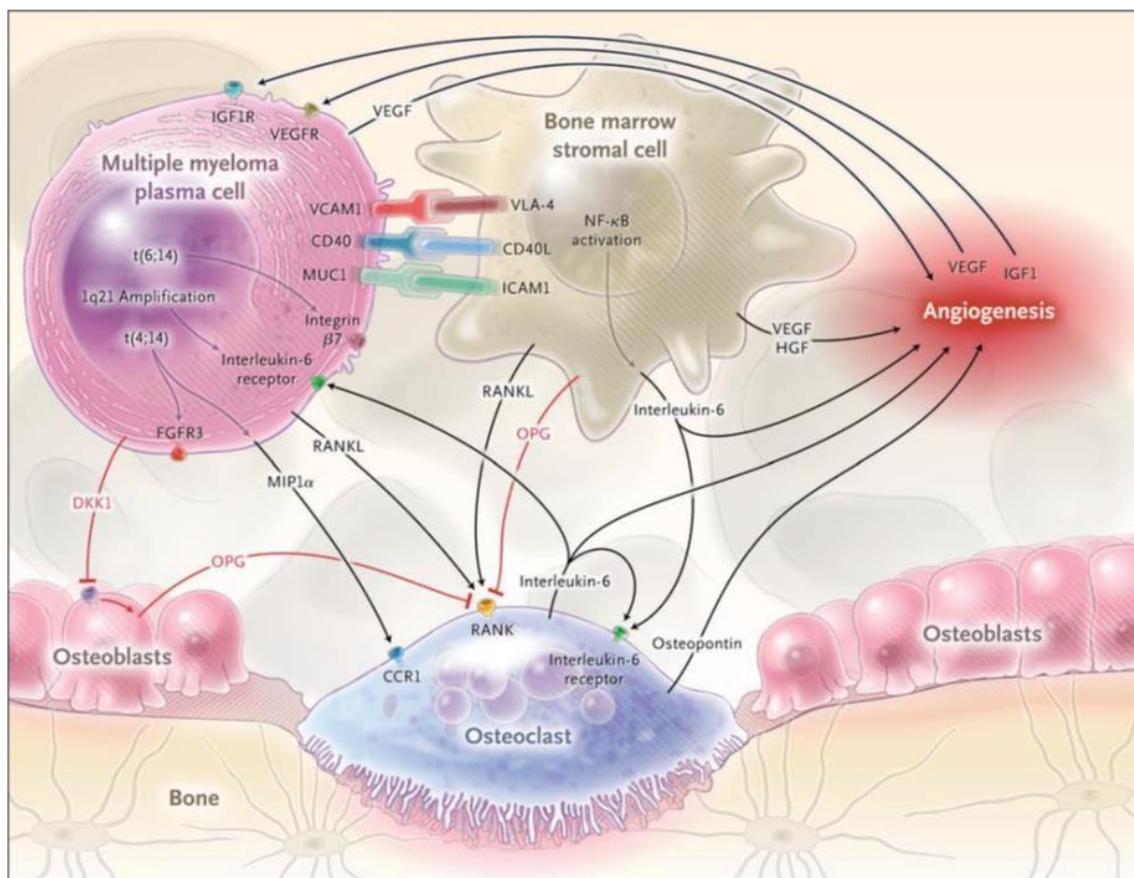
2.1.4 Microambiente do mieloma múltiplo

Os PN são extremamente dependentes do microambiente medular, que inclui a matriz extracelular e muitos tipos de células, tais como: células estromais, osteoclastos, osteoblastos, células imunes (linfócitos T, células dendríticas) e outras células hematopoiéticas. A interação entre os PM e as células da medula óssea ocorre principalmente através de comunicação positiva e negativa entre moléculas de adesão, quimiocinas e fatores de crescimento que suportam a sobrevivência e a proliferação dos clones malignos (ESTEVE e ROODMAN, 2007; ANDERSON e CARRASCO, 2011).

Estímulos adicionais, como a hipóxia, resultam na ativação do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α) e secreção de moléculas pró angiogênicas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), angiopoietina (ANG)-1 e osteopontina (OPN), que podem atuar tanto como quimiotáticos ou se ligarem aos receptores nas células endoteliais, promovendo proliferação (HU et al., 2010; KUEHL e BERGSAGEL, 2012).

Além disso, os PM aderem a matrix extracelular através de moléculas, como fibronectina e colágeno tipo I e interagem com células estromais da medula (BMSCs) usando diferentes complexos moleculares como VLA-4, VCAM, CD38 e ICAM (**Figura 8**). Todas essas interações suportam a produção de fatores solúveis que sustentam o crescimento dos PM. Dentre os principais fatores de crescimento está a interleucina 6 (IL-6) secretada tanto pelos PM quanto pelas células estromais da medula óssea, é capaz de promover a proliferação de células do mieloma e protege-las da apoptose (LAUTA, 2011).

Figura 8. Interação entre os plasmócitos malignos (PM) e células estromais da medula no microambiente tumoral. Anormalidades genéticas alteram a expressão de moléculas de adesão nas células do mieloma, bem como respostas a estímulos de crescimento no microambiente. A parte inicial da interação entre os PM e as células do estroma se dá por moléculas de adesão celular. Essa interação aumenta a produção de fatores de crescimento, como a interleucina 6 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que estimula tanto as células plasmáticas quanto a angiogênese tumoral. Há também o aumento da atividade lítica resultante no desbalanço da atividade osteoclastos/osteoblastos.



Fonte: Adaptado de PALUMBO, 2011.

A expressão e ativação de moléculas de adesão são essenciais para mediar as interações celulares. As integrinas, incluindo o VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), facilitam a ligação das células do mieloma às células do estroma através da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), e às células extracelulares componentes da matriz tais como fibronectina (KATZETAL et al., 2010). Fatores de crescimento como o $TNF-\alpha$ podem regular expressão de VLA-4 em células de mieloma, aumentando o "homing" e a adesão à fibronectina e células estromais. O CD138, um marcador de superfície celular comumente usado para identificar os PM é um proteoglicano responsável pela ligação às proteínas da matriz extracelular, bem como por regular a atividade da integrina (HIDESHIMA et al., 2001; MORGAN et al., 2007; SHAY, HAZLEHURST e LYNCH, 2016).

Além disso, tanto as BMSCs quanto os PM secretam enzimas proteolíticas, as metaloprotease 1, 2 e 9 que ajudam a remodelar o compartimento extracelular pela degradação de constituintes principais na membrana basal e matrix extracelular e a migração das células endoteliais (VACCA et al., 1999; SEGARRA et al 2005; COHEN et al., 2014). A interação entre as células MM e endoteliais, além de apoiar o processo angiogênico, favorece o retorno dos PM para a medula óssea apoiando sua sobrevivência (DE BRUYNE et al., 2006; ABDI, CHEN e CHANG, 2013).

O MM ativo tem como característica chave a presença de lesões ósseas, que se dão principalmente pelo desequilíbrio entre a atividade de osteoclastos e osteoblastos, suportada majoritariamente na medula óssea (ROODMAN, 2009). Está claro que a supressão da atividade dos osteoblastos é responsável tanto pelo processo osteolítico quanto pela progressão da carga do tumor MM. Sugere-se que os mecanismos pelos quais os osteoblastos participam na estimulação e sobrevivência dos PM relacionam-se com a maior secreção de IL-6 e bloqueio a morte celular programada mediada por TRAIL, pela secreção de osteoprotegerina (OPG) (BARILLE et al., 1995; SHIPMAN, CROUCHER, 2003; KAWANO et al., 2015).

Além disso, os PM interagem com BMSCs e pré-osteoblastos, através da ligação com a molécula de adesão de células neurais (NCAM), também chamada de CD56, e suprimem a atividade do principal fator de transcrição pró-osteoblastogênico, fator de transcrição relacionado ao Runt (Runx)-2, levando a uma inibição da diferenciação de osteoblastos (OB) (ELY, KNOWLES, 2002; GIULIANI et al., 2005). Os PM têm ainda a capacidade de inibir a diferenciação dos OB's através do bloqueio da ativação da via não canônica Wnt, mais precisamente agindo no receptor Wnt-5, ROR-2 e o Dickkopf-1 (DKK1) (TIAN et al., 2003; GIULIANI, RIZZOLI, ROODMAN, 2006; CAPOCEFALO et al., 2013).

O DKK1 é um inibidor da via de sinalização Wnt, que atua ligando-se à LRP5 / 6, impedindo a sinalização Wnt e levando à translocação da b-catenina para o núcleo (BAFICO et al., 2001). Seus níveis elevados tanto na medula quanto no sangue periférico mostraram-se associados à presença de lesões ósseas focais. Estudos demonstraram que o bloqueio de DKK1 e a ativação da sinalização Wnt previnem a doença óssea no MM e estão associados a uma redução na carga tumoral (YACCOBY et al., 2007; EDWARDS et al., 2008). Fulciniti e colaboradores evidenciaram que anticorpo anti-Dkk1 aumentou a diferenciação de osteoblastos e reduziu a secreção de IL-6, *in vitro* e *in vivo* aumentou o número de osteoblastos (FULCINITI et al., 2009). QIAN e colaboradores desenvolveram uma vacina de DNA (DKK1-DNA) em modelo murino de mieloma, MOPC-21, e os resultados mostraram que a vacinação ativa usando a vacina DKK1 não só foi capaz de proteger os camundongos do desenvolvimento, mas também foi terapêutica contra o MM estabelecido (QIAN et al., 2012).

As células do mieloma também promovem no seu microambiente medular a formação de osteoclastos através da expressão endógena do RANKL, do fator de necrose tumoral alfa

(TNF α) e da proteína inflamatória macrofágica 1alfa (MIP1 α) (HAN et al., 2001; FERRUGIA et al., 2003; HEIDER et al., 2003). O RANKL é um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF) e desempenha um papel importante da osteoclastogênese implicada na doença óssea no MM, pelo aumento na atividade dos osteoclastos através da ligação do RANKL ao seu receptor, nas células precursoras dos osteoclastos, o que promove sua diferenciação pela via da NF- κ B e JunNterminal quinase (ROODMAN, 2009). O envolvimento de RANKL na inibição da apoptose em células de MM foi observada em alguns estudos. O bloqueio da forma solúvel de RANK, expressas apenas por células primárias de MM, demonstrou modular a perda óssea e a carga tumoral, em modelos MM in vivo (BODY et al., 2006; SCHMIEDEL et al., 2013).

Uma vez gerados, os osteoclastos formam um selo de reabsorção na superfície da matriz óssea mineralizada e degradam o osso secretando ácido clorídrico e collagenases acidofílicas, como a catepsina K (CROCKETT et al., 2011). Hipotetiza-se que os PM também podem induzir a destruição óssea diretamente, formando células “semelhantes a osteoclastos” capazes de reabsorção óssea pelo menos in vitro. Curiosamente, 30% dos núcleos de osteoclastos em pacientes com mieloma foram identificados como contendo cromossomos transcricionalmente ativos da origem das células do mieloma, sugerindo que as células do mieloma podem se fundir com os osteoclastos normais e, potencialmente, influenciar sua funcionalidade (CALVANI et al., 2005; ANDERSEN et al., 2007).

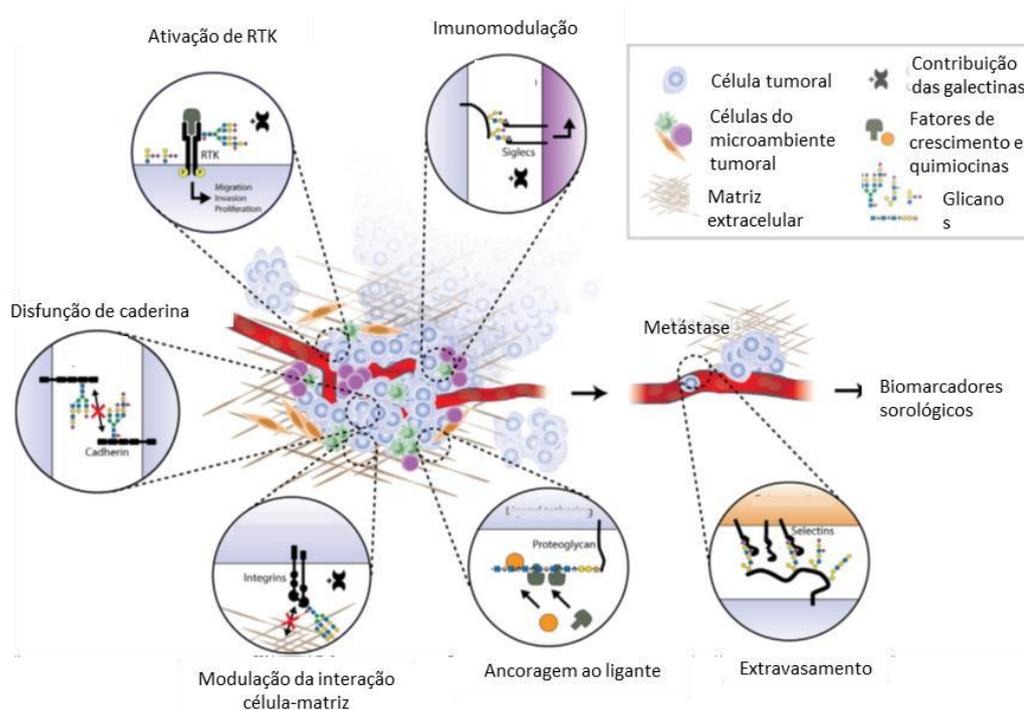
2.2 Galectinas: moléculas chave no estudo da glicobiologia

Por muito tempo, as áreas de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios reuniram toda a atenção de pesquisadores no mundo. Os carboidratos, porém, apenas recentemente passaram a receber maior atenção por meio da expansão da glicobiologia. A glicobiologia é um ramo da ciência que busca o entendimento das modificações moleculares e funções provenientes dos carboidratos e seus conjugados (GHAZARIAN, IDONI, E OPPENHEIMER, 2011). Cada glicoconjugado é composto por uma porção de carboidrato (também chamado de glicano), com tamanhos e complexidades variáveis (WIEDERSCHAIN, 2013). Através da regulação rígida e ação dinâmica de uma variedade de enzimas, glicosiltransferases e glicosidases, a glicosilação é capaz de produzir uma ampla gama de estruturas de glicano, que pode existir livre ou conjugado a proteínas ou lipídios (FUSTER e ESKO, 2005; VARKI et al., 2015; PINHO e REIS, 2015).

Os glicanos têm grande impacto na sinalização celular, geralmente estão associados a mecanismos celulares que envolvem interações célula-célula, célula-matriz extracelular, resposta imune e transdução de sinal (MONNEAU; ARENZANA-SEISDEDOS e LORTAT-

JACOB, 2016; DRAKE, 2015). Estima-se que mais de 50% das proteínas humanas tenham uma porção de carboidratos, e que este processo representa uma das mais importantes modificações pós-traducionais da proteína (CHRISTIANSEN et al., 2014; MUNKLEY e ELLIOTT, 2016). Sabe-se, porém, que os glicanos apresentam diferentes padrões nas células neoplásicas e microambiente tumoral. A glicosilação aberrante foi amplamente reconhecida como uma marca registrada do tecido neoplásico com implicação em diferentes etapas da progressão tumoral de todas as características do câncer (SILVA-FILHO, 2017). Durante a progressão do câncer, a expressão de diferentes padrões de glicosilação da superfície celular, incluindo O-glicanos simples truncados, alterações na ramificação de N-glicano, sialilação aumentada e fucosilação levam à proliferação tumoral, invasão, transição epitelial-mesenquimal, metástase e angiogênese (SHETA et al., 2016; QIAO et al., 2016; LUCENA et al., 2016, WU et al., 2016).

Figura 9. Os glicoconjugados contribuem de várias maneiras para os hallmarks câncer e auxiliam na formação de metástases. Receptores de tirosina quinases (RTKs) são ativadas pela alteração da glicosilação, pela expressão de gangliosídeos e galectinas, levando ao aumento da migração, invasão e proliferação de células cancerígenas. Interações célula-célula e célula-matriz são moduladas por glicosilação, resultando em fenótipos de células cancerígenas migratórias. Proteínas de ligação ao glicano, como siglecs e galectinas, regulam a resposta imune, permitindo a tolerância imunológica. Os epitopos de Sialyl Lewis são ligantes para selectinas e contribuem para as células cancerígenas e interações endoteliais, facilitando o extravasamento e a formação de metástases.



Fonte: Rodrigues, 2018.

As células tumorais expressam diferentes subconjuntos de epítomos de glicanos que podem ser reconhecidos por proteínas ligadoras de carboidratos. As selectinas e seus ligantes, por exemplo, medeiam um sistema altamente regulado de adesão celular entre leucócitos e

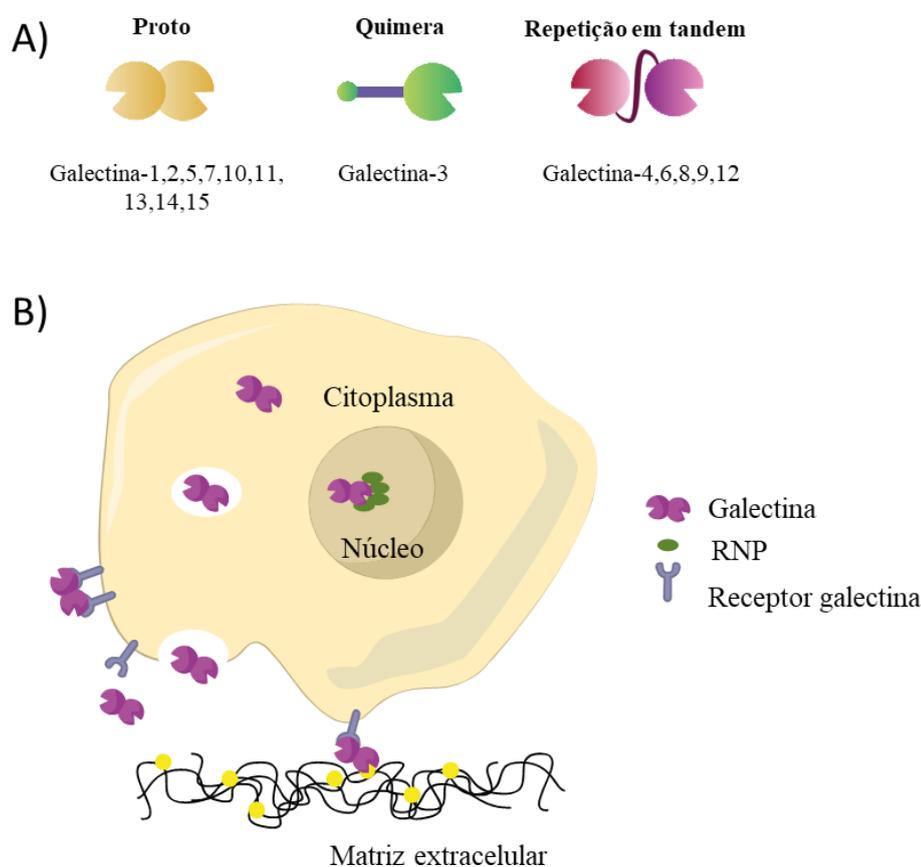
células endoteliais vasculares, um processo importante durante a inflamação (MARTH, GREWAL, 2008; ZARBOCK, LEY, MCEVER, 2011), que é utilizado pelas células tumorais no processo tumoral e de metastização (Figura 9). Além disso, os glicanos também estão envolvidos na modulação da resposta imune com proteínas de ligação ao glicano, como siglecs e galectinas, regulando as principais funções das células imunes (MACAULEY, CROCKER, 2014; JOHANNESSEN, LEPENUS, 2017). Como chave na ligação ao glicano, as galectinas desempenham um papel fundamental na modulação da resposta no contexto tumoral.

Galectinas são proteínas ligadoras de beta galactosídeos e fazem parte da família das lectinas que apresentam um domínio conservado de reconhecimento de carboidratos (CRDs), atualmente existem 15 proteínas pertencentes a essa família (GORDON-ALONSO, BRUGER e VAN DER BRUGGEN, 2018). Mesmo sendo a ligação á carboidratos o modo de ação clássico da galectina, elas também podem interagir com outras proteínas de maneira independente de carboidratos (WELLS e MALLUCCI, 1991). São proteínas encontradas no núcleo, no citoplasma e no espaço extracelular. As galectinas intracelulares presumivelmente estabelecem interações proteína-proteína, enquanto as galectinas extracelulares interagem principalmente com glicanos que decoram as glicoproteínas (NAGAE e YAMAGUCHI, 2015).

As principais fontes de galectinas extracelulares no câncer são mieloides e células neoplásicas, mas outras células, como células mesenquimais e células linfóides, também podem secretar galectinas (MATARRESE et al., 2005; GIESEKE et al., 2010, RABINOVICH e TOSCANO, 2015). As galectinas reconhecem vários padrões de glicano e formam “redes” de galectina-glicano cuja força de ligação se correlaciona com o número de interações estabelecidas (GORDON-ALONSO, BRUGER e VAN DER BRUGGEN, 2018).

Em termos estruturais as galectinas podem ser classificadas como diméricas e em tandem. A galectina-3 é a única proteína desta família que possui um CRD e um domínio diferente das demais, responsável por sua forma quimérica. Acredita-se que a pluralidade estrutural presente neste grupo molecular está diretamente relacionada a complexidade das funções e informação geradas no microambiente celular (Figura 10). As galectinas podem frequentemente ser moduladores negativos e positivos dos mesmos processos, sugerindo plasticidade em isoformas, modificações pós-translacional e/ou diferenças na localização.

Figura 10. Estrutura das galectinas e sua localização intra e extracelular. (A) As galectinas diferem entre si devido seu CRD e por seus domínios de ligação a outras moléculas. (B) Nas células, as galectinas podem se ligar a receptores membranares e a moléculas da matriz, ocupar o citoplasma e no núcleo podem interagir com ribonucleases (RNP) tudo isso a depender do estímulo que recebem.



Fonte: González-Sánchez, Nava, 2014.

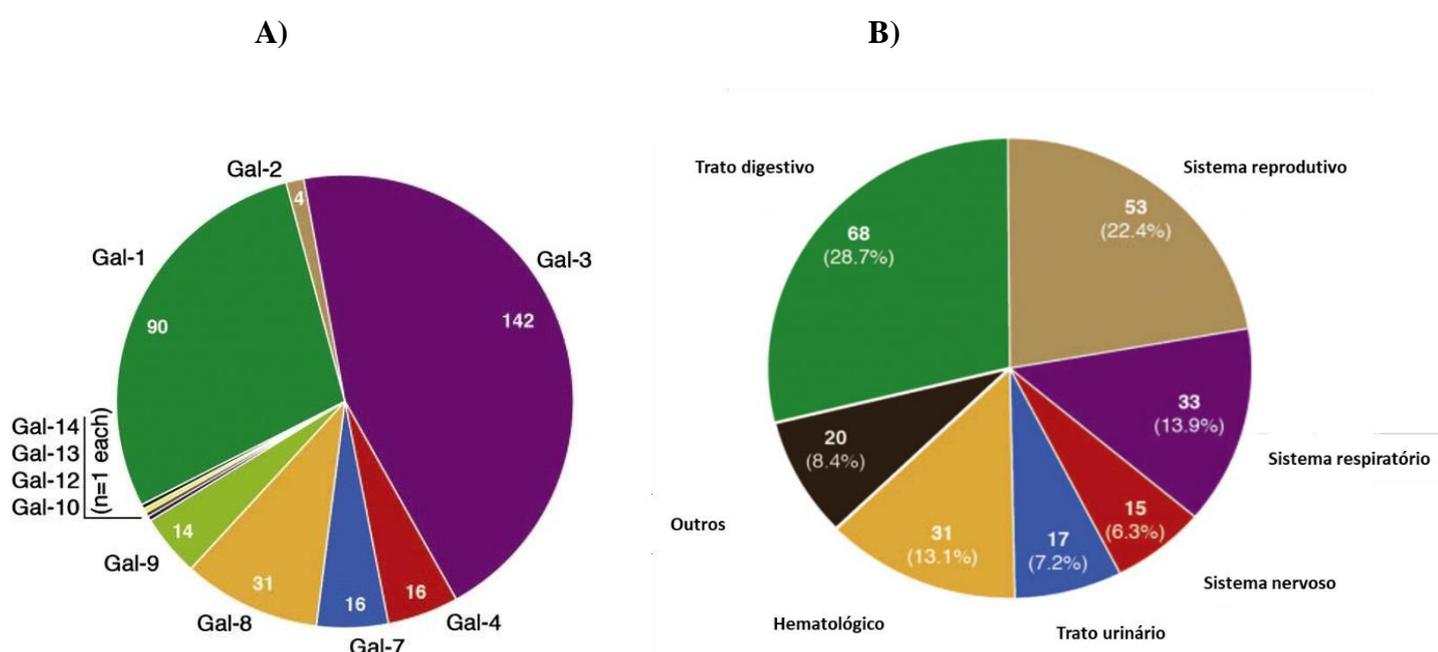
2.2.1 Galectinas no contexto tumoral

As galectinas se envolvem em interações diretas proteína-proteína, influenciando a sinalização celular, a progressão do ciclo celular e apoptose (LIU et al., 2011). Em consonância com essa diversidade funcional, qualquer disfunção ou expressão alterada tem sido frequentemente associada a diversas doenças, incluindo câncer (BALAN, NANGIA-MAKKER e RAZ, 2010; GIORDANO, CROCI e RABINOVICH, 2013). Nas últimas duas décadas, tem-se mostrado a contribuição das galectinas para muitas características do câncer, incluindo sinalização proliferativa sustentada, resistência a sinais de morte celular, evasão de vigilância imunológica, indução de angiogênese e ativação do potencial metastático (LIU e RABINOVICH, 2005; YANG e RABINOVICH, 2008; RABINOVICH e CROCI, 2012).

Esforços vêm sendo feitos para desenvolver terapias direcionadas às galectinas, variando de ligantes de carboidratos competidores a pequenas moléculas de ligações não-carboidratos e anticorpos bloqueadores (OBERG, LEFFLER E NILSSON, 2011). No entanto, para implementar com sucesso esses inibidores em terapias futuras é fundamental identificar

onde e como se dá a expressão destas. No estudo publicado por Thijssen e colaboradores em 2015, foram identificados mais de 200 estudos originais sobre o padrão de expressão de galectinas em pacientes com câncer. A maioria dos estudos (70%) eram focados em galectina-1 e galectina-3, enquanto tumores do trato digestivo e o sistema reprodutivo foram os tipos mais estudados, representando pouco mais de 50% (Figura 11).

Figura 11. Análise da expressão de Galectinas em diversas neoplasias. A) Apresentação de estudos que analisaram a expressão de galectinas específicas em pacientes com câncer. B) Distribuição de estudos sobre os diferentes sistemas de órgãos e tecidos.



Fonte: Adaptado de Thijssen et al., 2015.

No tecido hematopoiético, as galectinas desempenham um papel fisiológico importante devido aos seus efeitos pleiotrópicos na medula óssea e no microambiente com consequente associação clínica (**Quadro 2**), bem como, na criação de interações específicas de galectina-glicano entre as células hematopoiéticas e estromais, sustentando a formação de um nicho microambiental (RABIVINOVICH e VIDAL, 2011).

Quadro 2. Alta expressão de galectina associadas a características clínicas em oncohematologias.

Malignidade hematológica		Galectina	Função/associado com	Referência
Tipo	Subtipo			
Linfoma	Hodgkin	Galectina-1	Carga tumoral Aspectos clínicos adversos	Ouyang <i>et al</i> , 2013
	Não Hodgkin	Galectina-1 (LAGC)	Invasão	Suzuki e Abe, 2014
		Galectina-1 (LCCT)	Evasão imune (ambiente tolerogênico Th2)	Cedeno-Laurent <i>et al</i> , 2012
		Galectina-3 (LDGCB, LEP)	Proteção de apoptose induzida por Fas	Hoyer <i>et al</i> , 2004
		Galectina-7	Aumento de indução de metástase Baixa sobrevida (modelo murino)	Demers, Magnalo e St-Pierre, 2005
Leucemia	LCP	Galectina-1	Agressividade	Storti <i>et al</i> , 2016
	LLA pré-B	Galectina-3	Resistência a droga	Fei <i>et al</i> , 2015
	LMA	Galectina-3	Alta taxa refratária	Cheng <i>et al</i> , 2013
			Baixa sobrevida global	Gao <i>et al</i> , 2013 Ruvolo <i>et al</i> , 2016
			Resistência a droga	Hu <i>et al</i> , 2015
		Galectina-9	Evasão imune	Gonçalves <i>et al</i> , 2017 Zhou <i>et al</i> , 2011
	Galectina-12	Baixa sobrevida global	El Leithy <i>et al</i> , 2015	
		LLC	Galectina-1	Estroma pró-tumoral
	LMA	Galectina-9	Progressão da doença	Taghiloo <i>et al</i> , 2017
			Galectina-1	Resistência a droga
	LPA	Galectina-3	Resistência a droga	Kobayashi <i>et al</i> , 2010
			Baixa sobrevida livre de recaída	Gao <i>et al</i> , 2013
	Mieloma múltiplo		Galectina-1	Agressividade Baixa sobrevida global
Galectina-3			Pró-tumoral	Strutly <i>et al</i> , 2010
Galectina-9			Antiproliferativa	Kobayashi <i>et al</i> , 2010

Fonte: Adaptado de Gordon-Alonso, Bruger e van der Bruggen, 2018.

Durante o desenvolvimento das células T, no timo, as galectinas-1, -3, -8 e -9 induzem a apoptose dos timócitos, favorecendo a interação entre timócitos e células epiteliais do timo. Uma vez na periferia, as galectinas regulam a homeostase das células T. Gal-1 prolonga a sobrevivência de células T virgens, induz a apoptose de Th helper (Th)1 e Th17 e protegem as células Th2, promovendo a liberação de citocinas anti-inflamatórias (interleucina (IL) -4, IL-5 e IL-10) (ZHU *et al.*, 2005; RABIVINOVICH e VIDAL, 2011). Além disso, a alta expressão de Gal-1 se correlaciona com a progressão da doença, agressividade e baixa sobrevida na leucemia linfocítica crônica (LLC) e MM (CROCI *et al.*, 2013; STORTI *et al.*, 2016). Em ambos os casos, a galectina-1 é secretada pelo estroma tumoral e favorece o crescimento e a sobrevida do tumor. A galectina-9 interage com sua imunoglobulina de células T receptoras e

contendo o domínio 3 da mucina (TIM-3) na superfície das células Th1, levando à sua apoptose. Galectina-1 e -9 induzem a expansão das células reguladoras FoxP3 + T (Treg).

Na diferenciação de células B, a galectina-1 cria uma sinapse entre o receptor das células pré-B (pré-BCR) nas células pré-B e nas BMSC's, levando à agregação e sinalização pré-BCR (ELANTAK et al., 2012). Na periferia, a galectina-1 é regulada positivamente em plasmócitos pela ativação da proteína de maturação induzida por linfócitos B (BLIMP)-1 e, com a galectina-8, promove a produção de imunoglobulinas (TSAI et al., 2011). Por outro lado, a galectina-3 intracelular favorece a diferenciação em relação às células B de memória. Posteriormente, as galectinas regulam as funções celulares que apresentam antígeno; em particular, a galectina-1 induz o fenótipo tolerogênico de células dendríticas (DC) e a migração de macrófagos para o fenótipo M2 (STAROSSOM ET AL., 2012) e a galectina-9 estimula as DCs e ativa a imunidade inata (ANDERSON, 2007). Finalmente, a galectina-3 também está envolvida na homeostase óssea. Camundongos deficientes em galectina-3 exibem atividade de osteoclastos e, *in vitro*, a galectina-3 interfere na sinalização do ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligante (RANKL) em osteoclastos, reduzindo sua diferenciação.

No MM, as galectinas já se mostraram associadas em múltiplos processos biológicos e podem ser um alvo terapêutico atrativo, bloqueando o crescimento tumoral. Análises de dois conjuntos de dados independentes de expressão gênica revelaram que o alto nível de expressão do gene da galectina-1 (LGALS1) em células MM CD138+ estava correlacionado com redução da sobrevida global dos pacientes (GLAVEY et al., 2017; STORTI et al., 2017). Recentemente, foi publicado que o nível de galectina-1 no soro de pacientes recém diagnosticados era significativamente (limítrofe) maior quando comparados com controles saudáveis, embora sem associação com parâmetros clínicos e sobrevida (ANDERSEN et al., 2017). Além disso, a galectina-1 foi identificada como uma proteína associada à matriz extracelular que caracteriza apenas o MM e não a matriz de pacientes com MGUS ou controles saudáveis. No mesmo trabalho, Storti e colaboradores mostraram que a supressão de LGALS1 por um vetor lentiviral shRNA leva a regulação positiva de moléculas anti-angiogênicas e negativa de moléculas pro-angiogênicas como a MMP-9.

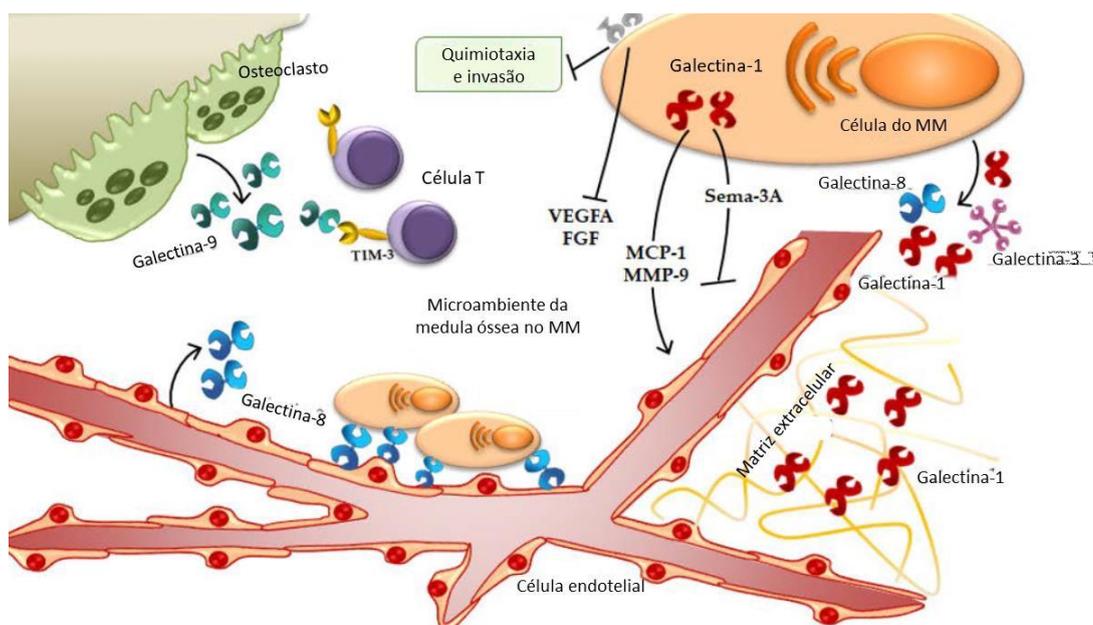
A galectina-3 é considerada uma proteína pro-angiogênica e pro-metastática, sua expressão é variável tanto em linhagens quanto em células primárias de MM (RABINOVICH e TOSCANO, 2009). O polissacarídeo GCS-100, antagonista de galectina-demonstrou inibir as respostas às citocinas TNF α , IGF-1 e IL-6 pelas linhagens celulares de mieloma bem como modifica o ciclo celular pelo acúmulo nas fases sub-G1 e G1 e induz a apoptose nas células (CHAUHAN et al., 2005; STREETLY et al., 2010). Além disso, o GCS-100 supera a resistência

ao bortezomibe e aumenta a apoptose induzida por dexametasona (CHAUHAN et al., 2005). No estudo conduzido por Mirandola e colaboradores utilizando a galectina-3C, uma forma truncada da galectina-3 que atua como um inibidor negativo foi observado que o mesmo exibiu modestos efeitos antiproliferativos nas células MM, porém, inibiu a quimiotaxia e a invasão de células U266 por meio do fator derivado de células estromais (SDF)-1 α . Além disso, galectina-3C facilitou a atividade do inibidor de proteossoma, bortezomibe, usado para o tratamento do MM (MIRANDOLA et al., 2011).

Outra galectina envolvida na patogênese do MM é a galectina-8. Em um estudo publicado recentemente, Friedel e colaboradores relataram que a galectina-8 está presente no soro de cerca de 45% dos pacientes com MM e está correlacionada com o desfecho dos pacientes. *In vitro* as suas isoformas (Gal-8S e Gal-8L) se ligam a células de MM e Gal-8L induz a adesão de células a matrix extracelular mais fortemente que Gal-8S tanto em testes estáticos quanto sob teste de estresse dinâmico de cisalhamento, inclusive após estímulo com TNF- α (FRIEDEL et al., 2016).

Diferentemente das galectinas vista até então, a galectina-9 tem um efeito antiproliferativo nas células cancerígenas. Nas células MM, a indução apoptótica por Gal-9 é mediada pela ativação de caspase-3, -8 e -9, além disso, o tratamento com Gal-9 provoca uma regulação positiva de c-Jun e JunD, a fosforilação da proteína H2AX e a ativação das vias JNK e p38/MAPK que, em conjunto, suportam o processo pró-apoptótico (KOBAYASHI et al., 2010). Além disso, An e colaboradores explorou o papel da galectina-9 na osteoclastogênese e na imunossupressão no MM. Foi observado que Gal-9 teve efeito apoptótico em células T efeito sem que houvesse efeito algum nas linhagens de MM. Foi visto também que Gal-9 é expressa por osteoclastos (OC) maduros, mas não por precursores (monócitos) ou por PM's. Posteriormente, o plasma de pacientes com MM bem como da medula óssea mostra níveis significativamente mais altos de galectina-9, em comparação com controles saudáveis (AN et al., 2016).

Figura 12. Galectinas no microambiente medular do MM. Galectina-1 está presente na MEC de pacientes com MM, *in vitro* induz a secreção de moléculas pró-angiogênicas e inibe a produção de anti-angiogênicas. A galectina-3C reduz a quimiotaxia e invasão de células MM e a secreção de proteínas pró-angiogênicas. A Gal-8 é produzido por CEs e medeia a adesão entre PM's e CEs. A galectina-9 é secretada pelos COs e pode mediar a inibição da atividade das células T.



Fonte: Storti, Marchica e Giuliani, 2017.

Conforme visto, as galectinas têm efeitos pleiotrópicos no microambiente medular, desempenhando um papel na sobrevivência, apoptose, propriedades angiogênicas das células do MM. Com base nisso, é de extrema importância o conhecimento acerca da sua expressão nos pacientes bem como no estudo dos processos guiados por elas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel das galectinas 1,3,4,7 e 9 no Mieloma múltiplo e sua utilização como possível biomarcador clínico.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar os níveis plasmáticos e a expressão tecidual de galectinas presentes em pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo;
- Associar os níveis e expressão das galectinas com os parâmetros clínicos e laboratoriais e indicadores de resposta à terapia dos pacientes;
- Caracterizar um modelo celular para expressão de galectinas visando avaliar suas consequências funcionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo prospectivo.

4.2 População de estudo

4.2.1 Pacientes

Foram coletadas amostras de 53 pacientes não tratados, com suspeita clínica de mieloma múltiplo por apresentarem pico monoclonal em eletroforese de proteínas e/ou características clínicas como anemia, hipercalcemia, elevações de ureia e creatinina sérica, lesões líticas ou fraturas patológicas. Encaminhados ao ambulatório de Onco- hematologia do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP) para diagnóstico e tratamento.

Dos 53 pacientes coletados entre maio de 2016 a janeiro de 2019, após a revisão do diagnóstico, 4 pacientes foram excluídos do estudo. Três por apresentarem tumores não hematológicos e 1 por falta de amostra suficiente para realização dos testes laboratoriais. Foram incluídos na nossa coorte 49 pacientes com diagnóstico confirmado e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2.2 Controles

Foram convidados 31 indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade, que não estavam em uso de medicamentos imunomoduladores, sem histórico prévio de câncer e que aceitaram assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice A**).

4.3 Critérios de elegibilidade

4.3.1 Critérios de inclusão

Para inclusão no estudo, os pacientes receberam informações sobre o projeto e apenas foram incluídos no trabalho após a assinatura do termo de consentimento livre (**Apêndice B**) e esclarecido, para tal cumpriram os seguintes pré requisitos:

- Maiores que 18 anos;
- Pacientes com gamopatia monoclonal em investigação de mieloma múltiplo e/ou com alguma alteração clínica sugestiva de mieloma múltiplo;
- Pacientes que tinham condições clínicas de serem submetidos a biópsia de medula óssea em crista ilíaca posterior;
- Pacientes virgens de tratamento, excetuando-se uso de corticoide em doses de até 1 mg/kg/dia

de prednisona ou até 10 mg/dia de dexametasona por menos de 10 dias.

- Não ter nenhuma alguma outra oncologia associada.

4.4 Captação e acompanhamento dos pacientes

Todos os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo. Receberam a orientação de que todos os exames e amostras coletados para o estudo já faziam parte dos exames de investigação e estadiamento de rotina, e que o diferencial seria apenas uma quantidade maior de amostras coletadas, além da retirada do excedente do bloco de parafina das biópsias de medula óssea para a revisão dos casos. Após assinarem o TCLE tiveram suas amostras coletadas. As informações clínicas e de tratamento foram obtidas dos prontuários para o preenchimento do formulário com dados clínicos e laboratoriais de rotina de diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. (**Anexo A**). Os exames de controle pós tratamento foram realizados no mesmo momento em que os pacientes passavam pela reavaliação na rotina clínica de acompanhamento (entre 4 e 6 meses de tratamento), a decisão deste momento ficou exclusivamente a cargo do médico, não tendo o estudo qualquer interferência nesta decisão.

4.5 Coleta de amostras biológicas

Nos pacientes com mieloma múltiplo e nos controles saudáveis, foram coletados 8 mL de sangue periférico em tubo com anticoagulante, ácido etilenodiamino tetra-acético (BD Vacutainer®) para realização de ELISA. A biopsia de medula óssea foi realizada através da técnica por punção com agulha modelo Jamshidi, em umas das cristas ilíacas posteriores, com expectativa de fragmento ósseo de pelo menos 1,5 cm, aceitando-se fragmentos menores devido a fragilidade óssea.

Os fragmentos de medula óssea após coletados foram fixados em formol tamponado, enviados inicialmente ao serviço de patologia do HCP e após processamento padrão, os blocos de parafina excedentes foram retirados e levados para laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas-LINAT para confecção de lâminas e realização de imunohistoquímica/imufluorescência.

4.6 Ensaio imunoadsorvente ligado a enzima (ELISA)

Um volume de 3 mL de sangue total coletado com anticoagulante EDTA, foi centrifugado a 1800 RPM, por 5 minutos a uma temperatura de 4° C para obtenção do plasma rico em plaquetas. Posteriormente, o plasma foi separado em alíquotas de 1 mL e centrifugado a 14000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram feitas alíquotas de 500 µL e congeladas em freezer a – 80°C, até a realização dos testes laboratoriais. A determinação da concentração de galectinas no plasma foi feita pela técnica de ELISA sanduíche utilizando os kits para Gal-1, Gal-3, Gal-4, Gal-7 e Gal-9 humanos (R&D Systems), seguindo as instruções do fabricante. Em linhas gerais o anticorpo de captura foi, inicialmente, adsorvido na placa de 96 poços. Depois o plasma dos pacientes diluído 2 vezes foi adicionado, na presença do antígeno houve a ligação ao anticorpo. Por último, um segundo anticorpo (anticorpo de detecção) ligado à enzima foi adicionado. A intensidade de cor gerada resultante da reação foi proporcional à quantidade de antígeno na amostra e a leitura da absorbância foi realizada utilizando a leitora de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Germany). A análise foi feita no software *GraphPad®Prism* (Graphpad Software Inc, EUA) e as concentrações expressas em pg/ml. Os limites mínimos de detecção para os kits Gal-1, Gal-3, Gal-4, Gal-7 and Gal-9 kits were 150, 31.25, 62.5, 78.12, 46.87 pg / ml, respectivamente.

4.7 Imunohistoquímica

Foram obtidos cortes histológicos de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas adesivas tratadas com organossilano e mantidos em estufa a 60°C por 24 horas seguido de desparafinização das lâminas em xilol em estufa a 60°C por 1 hora, hidratação em gradiente de álcool (100%, 95%, 70% e 50%) por 5 minutos cada e água corrente pelo mesmo tempo. A recuperação antigênica foi realizada em banho maria a 96°C por 20 minutos em Target

Retrieval Solution, High pH 9 (Dako) 10mM, pH 7. O bloqueio de peroxidases endógenas foi feito com Dual endogenous enzyme block (kit Dako envision duoflex) por 10 minutos e o bloqueio de sítios inespecíficos com PBS/BSA por 1 hora. Para a marcação foi adicionado o anticorpo primário monoclonal anti-galectina 9 (1:100), diluído em PBS por 1h. Como anticorpo secundário foi usado Dako Envision Duoflex-HRP por igual tempo. Após serem lavadas novamente com PBS, foi adicionado DAB por 5 minutos. A contra coloração foi feita com hematoxilina e a desidratação das lâminas em sucessivos banhos em álcool de diferentes concentrações. Por último, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck) e analisadas no microscópio de fluorescência Eclipse Ts2 Nikon. Como controles negativo e positivo foram usados cortes de tecido renal.

4.8 Cultura de células

Para avaliação nos modelos celulares, foi usada a linhagem de mieloma múltiplo, MM.1S. A referida linhagem foi obtida da *American Type Cell Culture* (ATCC, USA) mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ cultivadas em meio RPMI-1640 (Gibco), suplementada com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10mM de HEPES (Gibco) e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco). A linhagem de estroma medular, HS-5, foi cultivada em iguais condições. O crescimento celular foi acompanhado diariamente com a utilização de microscópio invertido e a troca de meio realizada sempre que necessário para manter a viabilidade das células. As células foram negativas para o teste de micoplasma.

4.9 Avaliação dos níveis de galectina solúvel

Para avaliação dos níveis de Gal-9 solúvel, as linhagens HS-5 e MM1-S foram cultivadas e plaqueadas 1×10^5 células em placa de 6 poços. Após 24 horas, as células MM foram adicionadas às células HS-5 na condição de cocultivo. Para a condição de meio condicionado foi utilizado meio de 72 horas de exposição da linhagem MM1-S e adicionadas ao poço contendo células HS-5 e vice versa. Foram retiradas alíquotas de 500µl de cada condição nos tempos de 2,4,6,12,24,48 e 72 horas para avaliação dos níveis de Gal-9 solúvel pela técnica de ELISA sanduiche.

4.10 Citometria de fluxo

Para marcação de Gal-9 na superfície celular as células foram coletadas dos poços após 48 e 72 horas de cultura. A linhagem estromal foi deaderida do poço com uso de tripsina

0.5% + Edta 1mM. As células foram então lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) o pellet celular foi ressuspensionado em PBS e dividido em dois tubos de poliestireno (controle sem marcação e marcado). Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo anti-galectina-9 humana conjugada a ficoeritrina (PE) (BioLegend, San Diego, CA, EUA) por 30 minutos a 37°C. Para as condições que continham a linhagem MM-1S foi feita marcação com antiCD-38 PE-Cy5 (BioLegend, San Diego, CA, EUA). Os dados foram adquiridos em um citômetro de fluxo (FACSAria II; BD Biosciences).

Em seguida, foram realizadas 2 lavagens consecutivas com PBS. Para marcação intracelular foram adicionados 2 mL do reagente Fixation/Permeabilization (eBioscience) por 40 minutos a 37°C. Passado o tempo da incubação as células foram lavadas duas vezes com permeabilization buffer (eBioscience) e marcadas nas mesmas condições anteriormente descritas. Após a incubação, foi realizada uma última etapa de lavagem, em seguida foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo. Os dados foram analisados usando o software FlowJo (TreeStar).

4.11 Análise estatística

Todas as variáveis foram analisadas em termos de normalidade, usando o teste de normalidade de D'Agostino e Omnibus Pearson. A análise estatística foi realizada usando o *GraphPad®Prism6* (Graphpad Software Inc., EUA). As variáveis contínuas foram comparadas com teste não paramétrico de *MannWhitney U-test*. Os dados quantitativos serão apresentados como mediana, mínimo e máximo. As variáveis categóricas foram apresentadas em número (N) e percentual (%) e analisadas pelo teste do Chi-quadrado. A correlação entre variáveis foi determinada calculando o coeficiente de correlação de Spearman, foi considerada uma correlação fraca com $r < 0,5$; correlação moderada entre 0.5 a 0.7, correlação forte 0.7 a 0.9 e acima de 0.9 muito forte. As comparações estatísticas entre pacientes e indivíduos controles saudáveis foram realizadas pelo teste T não paramétrico (*Wilcoxon*). Valores considerados significativos, $p < 0,05$.

4.12 Considerações éticas

Os protocolos estabelecidos foram enviados aos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos dos centros participantes: HCP e UFPE, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Protocolo de Pesquisa, respeitando os aspectos éticos e legais vigentes,

de acordo com a Resolução 466/2012. Número do parecer: 2.177.317 (**Anexo B**).

5 RESULTADOS

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

Dos 49 casos incluídos no estudo, houve leve predominância do sexo masculino (57,1%), sendo 28 homens e 21 mulheres, desses, 67,3% se autodeclaravam pardos (33/49), 20,4% negros (10/49) e 12,2% brancos (6/49). A mediana de idade foi de 60 anos, variando de 39 a 85 anos. O intervalo em meses referido entre surgimento de algum sintoma e o diagnóstico, variou de 1 a 36 meses, com mediana de 6 meses. O sintoma mais frequentemente reportado foi dor óssea, presente em 100% dos pacientes no momento do diagnóstico, seguido de fraqueza (40/48, 83,3%). Fraturas patológicas já estavam presentes em 56,3% (27/48) dos pacientes. O relato de infecções por repetição esteve presente em 23,4% dos casos (11/47) e 42,6% (20/47) relataram perda de peso.

Utilizando-se os valores de classificação segundo os critérios de estadiamento de Durie- Salmon (DS), a maioria dos pacientes estavam entre os estadios mais avançados: IIIA ou IIIB, 66% (31/47) e 23,4% (11/47), respectivamente. Já em relação ao International Staging System- ISS, dentre os 45 pacientes passíveis de cálculo (valores de $\beta 2$ microglobulina), a distribuição foi a seguinte: ISS1- 12 casos (26,7%), ISS2- 11 casos (24,4%) e ISS3- 22 casos (48,9%). Os pacientes que possuíam imunofixação sérica (34) tiveram seu perfil de subtipos distribuídos da seguinte forma: IgG Kappa correspondendo a 41,2%, seguido de cadeia leve isolada (kappa ou lambda e IgA Kappa 17,6% cada. Os demais dados estão descritos na tabela 2.

Dos que possuíam dados laboratoriais descritos nos prontuários, 30,6% pacientes apresentava alteração de função renal (15/49). Dos 45 pacientes com dados sobre cálcio sérico, 13,3% (6) apresentaram-se com hipercalcemia (cálcio sérico ≥ 12 mg/dL), e 51,1% dos casos já tinham algum grau de anemia (24/47) (Hemoglobina < 10 g/dL). Os valores de hemoglobina variaram de 5,6 à 17,5 g/dL, com mediana de 10,1 g/dL. A dosagem de beta2 microglobulina esteve aumentada em 85,4% (35/41) (VR: 2000 ng/mL) dos pacientes. A mediana dos níveis de beta2 microglobulina foi de 4482 ng/mL (1438 a 20.000 ng/mL). A quantificação de plasmócitos através da contagem em aspirado de medula óssea apresentou como principal dificuldade um grande número de aspirados hemodiluídos, com contagem variando de 0-96% de plasmócitos (mediana = 16 plasmócitos/250 células contadas). No grupo com contagem abaixo de 10%, que excluiria o diagnóstico de mieloma múltiplo, havia a positividade através da quantificação de plasmócitos em biópsia de medula óssea. Quanto a presença

ou não de plasmocitoma 66% dos casos possuíam (31/47), todos acometendo tecido ósseo.

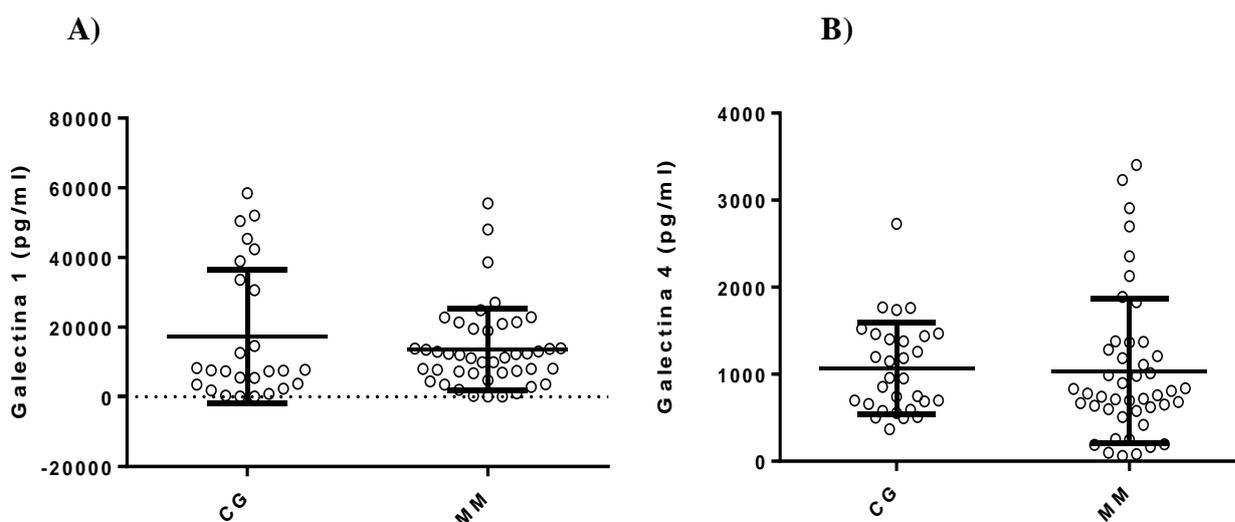
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes com MM.

Clinical and laboratory features	Patients (n = 49)			
	No.	%		
Sex				
Female	21	42.9		
Male	28	57.1		
Death			Seric Immunofixation	
No	36	26.5	IgG Kappa	14 41.2
Yes	13	73.5	IgG Lambda	2 6.0
Renal Function			IgA Kappa	6 17.6
No	34	69.4	IgA Lambda	5 14.6
Yes	15	30.6	Free light chain (Kappa or Lambda)	6 17.6
Hypercalcemia			IgM Kappa	1 3.0
No	38	80.9	Age (years), median	60
Yes	9	19.1	Interval	39.0 – 85.0
Anemia			Time for symptoms (months), median	6.0
No	22	45.8	Interval	1.0 – 36.0
Yes	26	54.2	Hemoglobin (g/dL), median	10.1
Plasmocytoma			Interval	5.6 – 17.5
No	16	34.0	Hematocrit (%), median	30.2
Yes	31	66.0	Interval	16.7 – 59.7
Bone Fracture			Platelets ($\times 10^9/L$), median	228.5
No	21	43.8	Interval	33.9 – 660.0
Yes	27	56.3	LDH (U/L), median	185.0
Weakness			Interval	83.6 – 446.0
No	8	16.7	Urea (mg/dL), median	39.5
Yes	40	83.3	Interval	12.0-222.0
Weight loss			Creatinine (mg/dL), median	1.0
No	27	57.4	Interval	0.45-22.3
Yes	20	42.6	Seric calcium (mg/dL), median	9.75
Recurrent Infection			Interval	5.19 – 14.27
No	36	76.6	Seric albumin (g/dL), median	3.5
Yes	11	23.4	Interval	2.10 – 5.30
Gamma monoclonal peak			Total protein (g/dL), median	8.05
No	6	13.3	Interval	3.31 – 14.5
Yes	39	86.7	Beta-2-microglobulin (ng/mL), median	4,482.0
Bone marrow biopsy, >10% plasmocytes			Interval	1,438.0 – 20,000.0
Negative	7	15.9	Plasmocytes in mielogram (%), median	16.0
Positive	37	84.1	Interval	0.0 – 96.0
Durie Salmon *				
IA	2	4.3		
IIA	3	6.4		
IIIA	31	66.0		
IIIB	11	23.4		
ISS				
I	12	26.7		
II	11	24.4		
III	22	48.9		

AVALIACAO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE GALECTINAS

A análise plasmática dos níveis das galectinas 1 [1,1650 (150-55,550) pg/ml] e 4 [7,79.25 (62.5-3,404.25) pg/ml] nos pacientes não evidenciou diferenças estatísticas quando comparadas a indivíduos saudáveis de mesmo sexo e média de idade (Figura 13). Mediana, máxima e mínima dos controles: [7,600(150-45,350) pg/ml] e [955.5 (366.75-2,729.25) pg/ml], respectivamente.

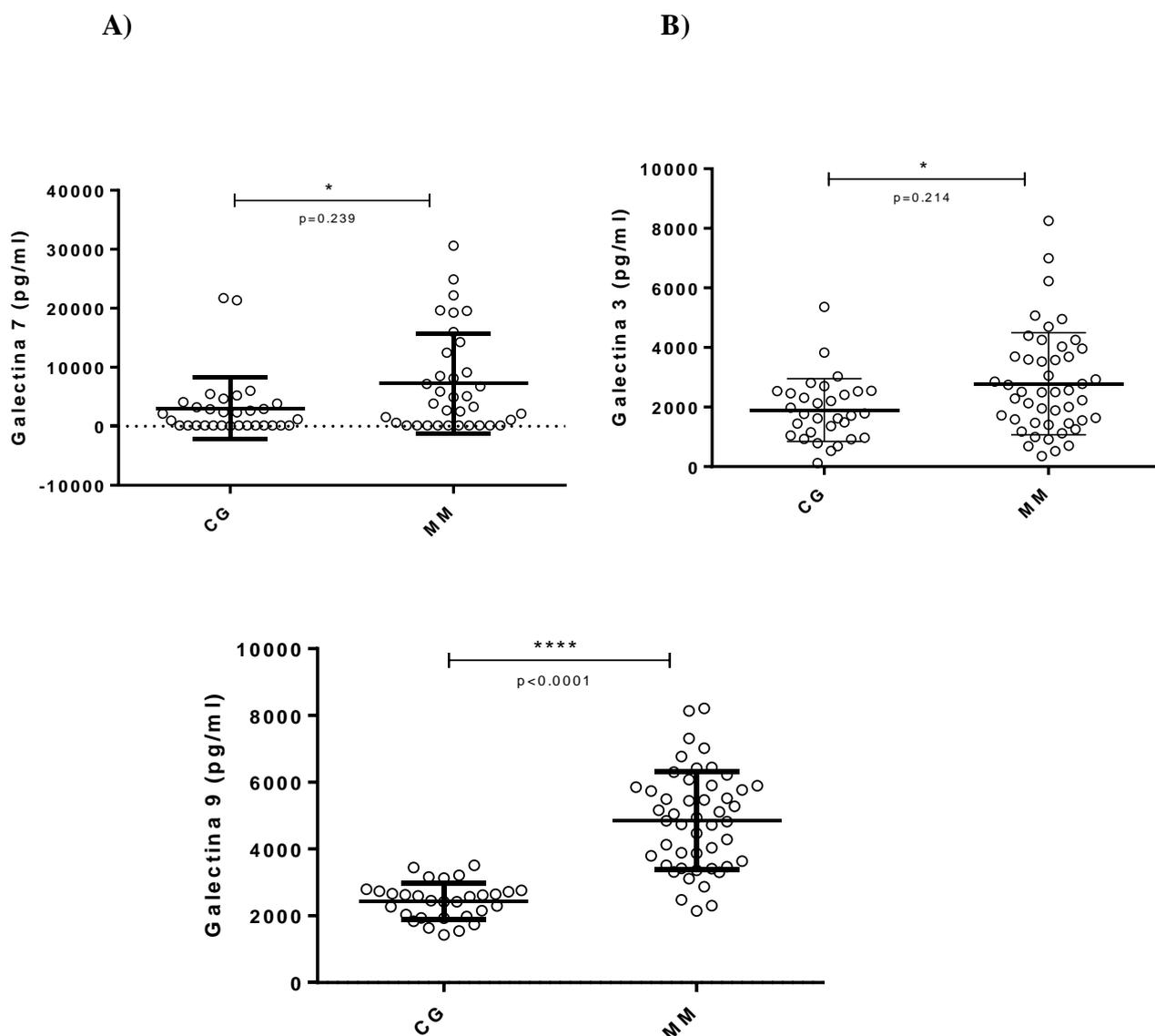
Figura 13. Expressão das galectinas 1 e 4 em plasma de pacientes diagnosticados com MM e de indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade. A comparação foi feita utilizando os valores da concentração plasmática segundo o kit de ELISA para galectinas, os valores são dados em pg/mL e os gráficos foram gerados pelo software *GraphPad®Prism6*. MM= pacientes de mieloma múltiplo. CG= grupo controle.



A análise dos níveis das galectinas 3, 7 e 9 evidenciou valores plasmáticos elevados quando comparadas a indivíduos saudáveis de mesmo sexo e média de idade, valor de [2501 (352-8252) pg/ml], [3,846 (156.25-30,606) pg/ml] e [4,939 (2,144-18,152) pg/ml], respectivamente (Figura 14). Mediana, máxima e mínima dos controles para galectina 3 de: [1,741.33 (118-5,364.66) pg/ml], galectina 7 [1,086 (78.12-21,726) pg/ml] e galectina 9 [2,454 (1,429-5,019) pg/ml]. Essa maior expressão mostrou-se estatisticamente significativa com valores de $p=0,0214$ para Gal-3, $p= 0.0239$ para Gal-7 e $p< 0,0001$ para Gal-9.

Figura 14. Expressão das galectinas 3, 7 e 9 em plasma de pacientes diagnosticados com MM e de indivíduos saudáveis pareados por sexo e idade. A comparação foi feita utilizando os valores da concentração plasmática segundo o kit de ELISA para galectinas, os

valores são dados em pg/mL e os gráficos foram gerados pelo software *GraphPad®Prism6*. MM= pacientes de mieloma múltiplo. CG= grupo controle.



Na análise de correlação dos níveis das galectinas com os dados laboratoriais dos pacientes, tais como hemoglobina, cálcio corrigido, hematócrito, ureia e creatinina, não foi possível encontrar correlação para as galectinas 1 e 3. Já a galectina 4 apresentou correlação positiva com os níveis de creatinina e correlação negativa com os valores de hemoglobina (Figura 15) No caso da galectina 7, houve correlação positiva moderada para os valores de ureia, creatinina, VSH e $\beta 2$ microglobulina (Figura 16), ou seja, valores altos na expressão de galectina 7, correlacionam-se com maiores valores dos respectivos parâmetros analisados. Foi possível ver ainda uma correlação negativa fraca entre os níveis de hemoglobina e hematócrito, porém, com p estatisticamente significativo $p=0.02$ e $p=0.016$, respectivamente (Figura 17).

Figura 15. Análise das correlações entre os níveis plasmáticos de galectina 4 e parâmetros bioquímicos dos pacientes com MM. Foi possível observar correlação positiva entre os níveis plasmáticos de Gal-7 e Creatinina (A) e negativo com os níveis de hemoglobina (B).

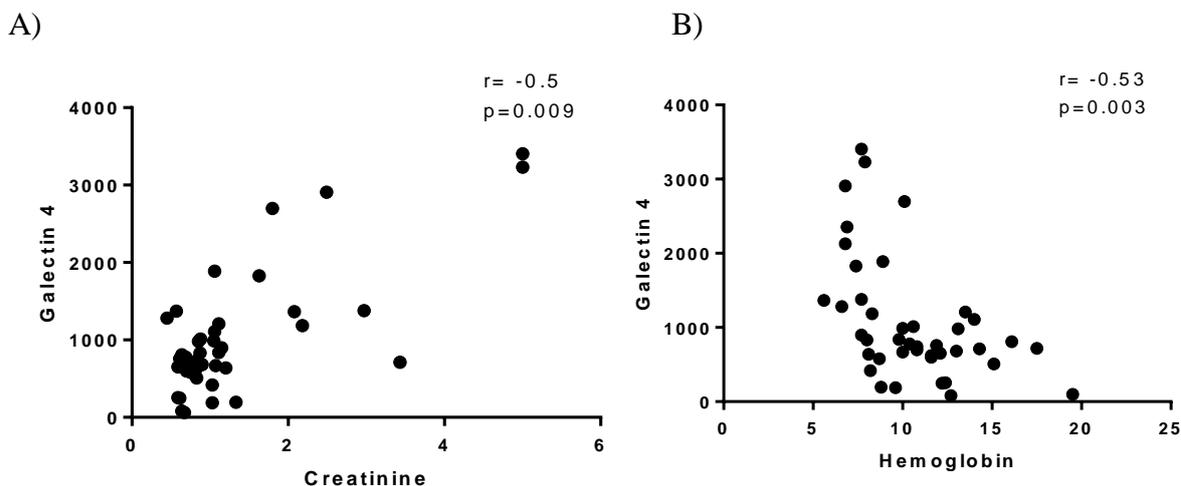
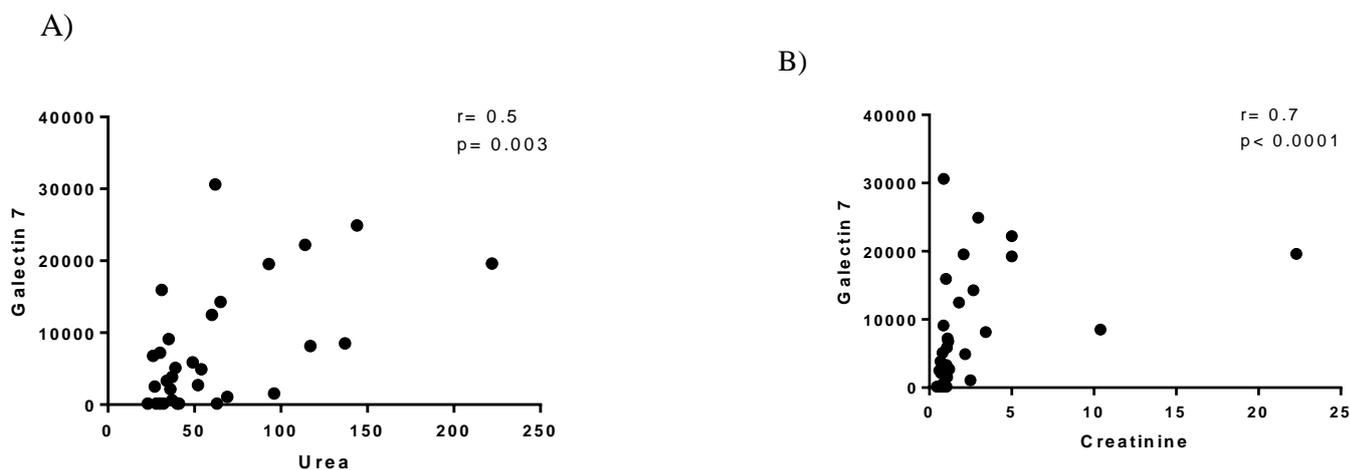
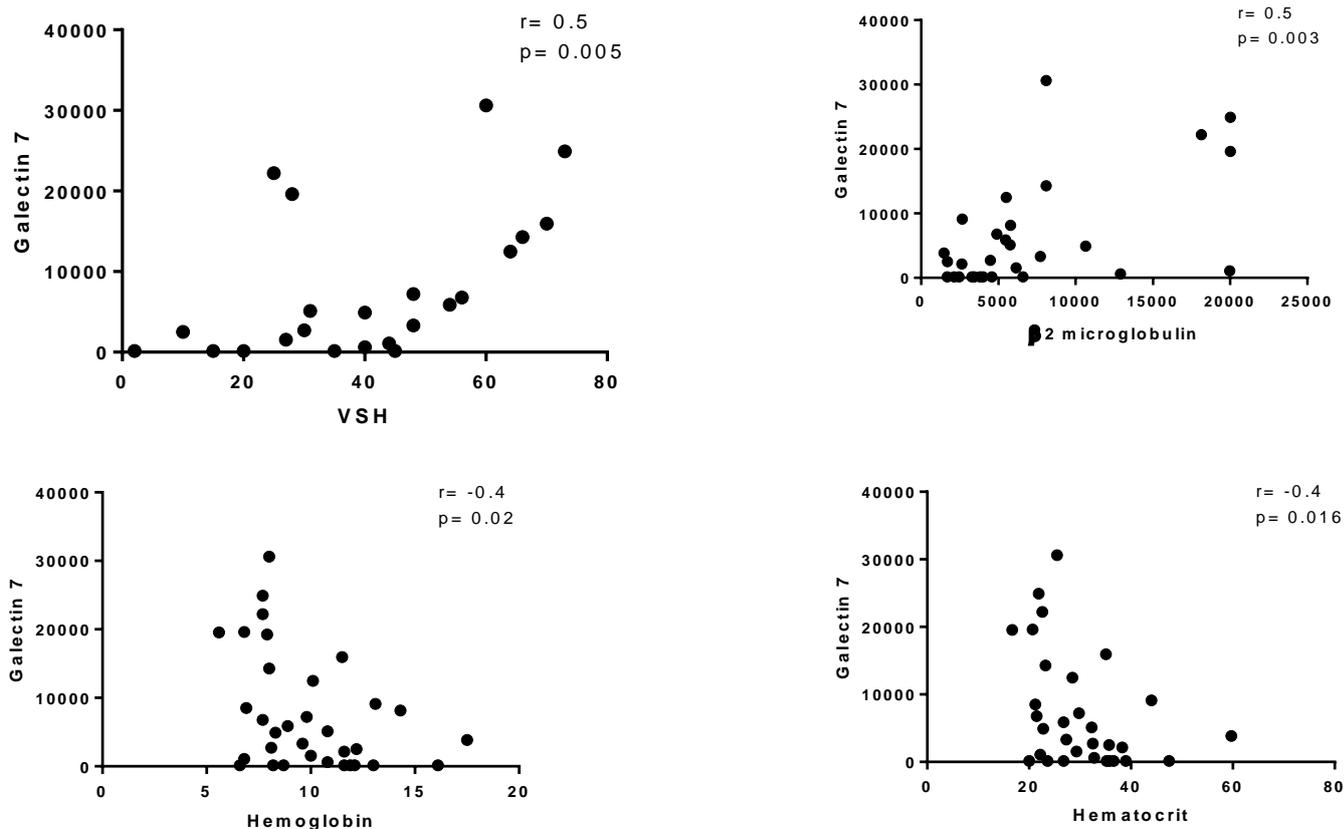


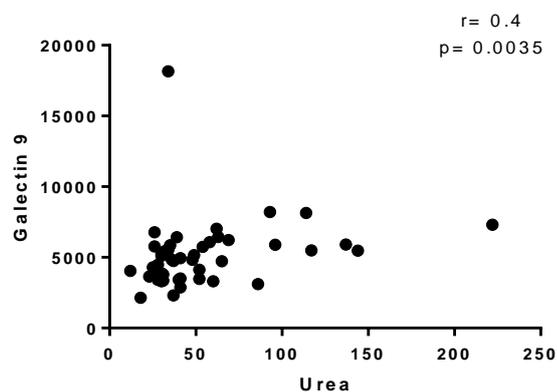
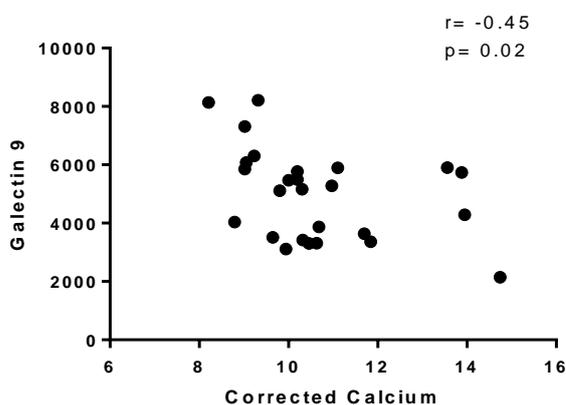
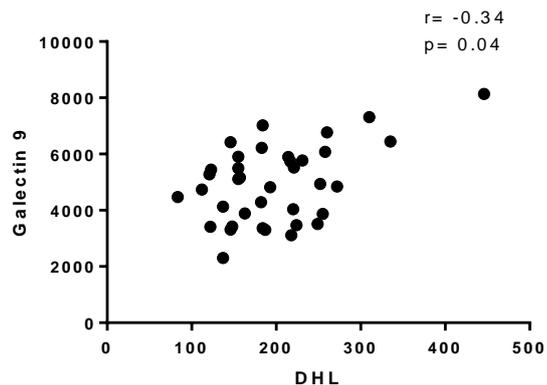
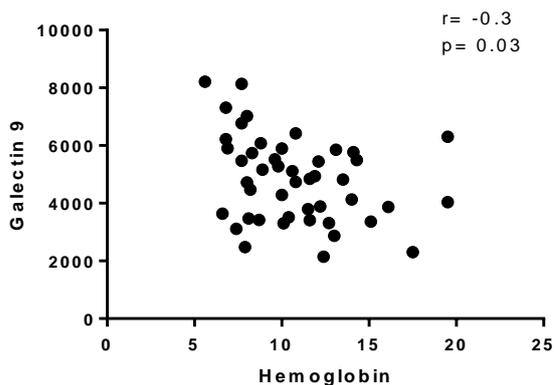
Figura 16. Análise das correlações entre os níveis plasmáticos de galectina 7 e parâmetros bioquímicos dos pacientes com MM. Foi possível observar correlação positiva entre os níveis plasmáticos de Gal-7 e Ureia (A), Creatinina (B), VSH (C), $\beta 2$ microglobulina (D). Além de correlações negativas ou seja, valores plasmáticos altos de galectina 7, correlacionam-se com menores valores de hemoglobina (E) e hematócrito (F).





Correlações estatisticamente significantes também foram encontradas associadas aos níveis de galectina 9. As correlações negativas estiveram presentes quanto associadas à hemoglobina, DHL e calcio corrigido. E correlação positiva foi observada com níveis de ureia (**Figura 17**).

Figura 17. Análise das correlações entre os níveis plasmáticos de galectina 9 e parâmetros bioquímicos dos pacientes. Foi possível observar correlação negativa entre os níveis plasmáticos de Gal-9 e hemoglobina (A), DHL (B) e calcio corrigido (C). E correlação positiva com uréia (E).



Os dados clínicos categóricos, a saber: dor óssea, presença de fatura patológica, hipercalcemia, anemia, alteração da função renal, presença de plasmocitoma e perda de peso foram avaliados por meio do teste de Fischer. Os valores absolutos encontrados, mediana e p valor estão apresentados na tabela 3. A presença de alteração renal esteve associada aos níveis de Gal- 4; 7 e 9), com valores de $p = 0.0016$, 0.001 e 0.02 , respectivamente. Outro dado interessante, é que foi possível ver associação estatísticas entre os níveis da galectina 9 e os estádios mais avançados da doença, tanto de acordo com Durie- Salmon ($p = 0.005$) quanto no ISS ($p = 0,016$).

As variáveis contínuas foram avaliadas e apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3. Associação com os níveis plasmáticos das galectinas com as variáveis categóricas dos pacientes de MM. Os valores estatisticamente significativos estão marcados em negrito.

<u>Features</u>		N	<u>Gal 1</u> Median	<u>Gal 3</u> Median	<u>Gal 4</u> Median	<u>Gal 7</u> Median	<u>Gal 9</u> Median
<u>Weight loss</u>	Yes	20	12,750.0	2,179.0	835.5	6,996.0	5,986.5
	No	27	11,200.0	2,501.0	756.75	3,306.0	4,129.0
<i>P value</i>			0.537	0.841	0.639	0.188	0.013
<u>Bone Fracture</u>	Yes	27	12,050.0	2,653.5	779.25	3,006.0	4,939.0
	No	21	10,600.0	2,179.0	831.75	7,026.0	4,819.0
<i>P value</i>			0.625	0.127	0.761	0.486	0.971
<u>Hypercalcemia</u>	Yes	9	15,950.0	2,369.0	1,754.25	19,266.0	5,519.0
	No	38	9,050.0	2,501.0	741.75	3,276.0	4,779.0
<i>P value</i>			0.432	0.945	0.101	0.606	0.184
<u>Renal Function</u>	Yes	15	12,450.0	1,838.0	1,379.0	12,486.0	5,734.0
	No	34	9,950.0	2,561.0	708.0	1,086.0	4,606.5
<i>P value</i>			0.099	0.238	0.016	0.001	0.024
Anemia	Yes	26	12,200.0	1,952.0	944.25	6,336.0	5,374.0
	No	22	8,050.0	3,051.0	704.25	2,346.0	4,769.0
<i>P value</i>			0.432	0.08	0.07	0.151	0.141
<u>Plasmocytome</u>	Yes	31	12,150.0	2,763.5	756.75	3,186.0	4,939.0
	No	16	10,550.0	2,226.0	910.5	7,206.0	4,999.0
<i>P value</i>			0.513	0.292	0.449	0.631	0.917
ISS	I	12	9,950.0	2,916.0	715.5	2,346.0	3,881.5
	II	11	7,750.0	2,888.5	636.75	156.25	4,939.0
	III	22	13,550.0	2,226.0	989.25	7,866.0	5,626.5
<i>P value</i>			0.323	0.750	0.097	0.060	0.016
<u>Durie-Salmon</u>	IA	2	5,500.0	2,776.0	464.25	1,341.125	3,379.0
	IIA	3	6,950.0	1,117.0	1,379.25	12,486.0	3,424.0
	III	31	10,550.0	2,671.0	741.75	2,436.0	4,819.0
	A						
	III	11	19,550.0	2,089.0	2,129.25	14,286.0	6,219.0
<i>P value</i>	B		0.039	0.271	0.114	0.023	0.05

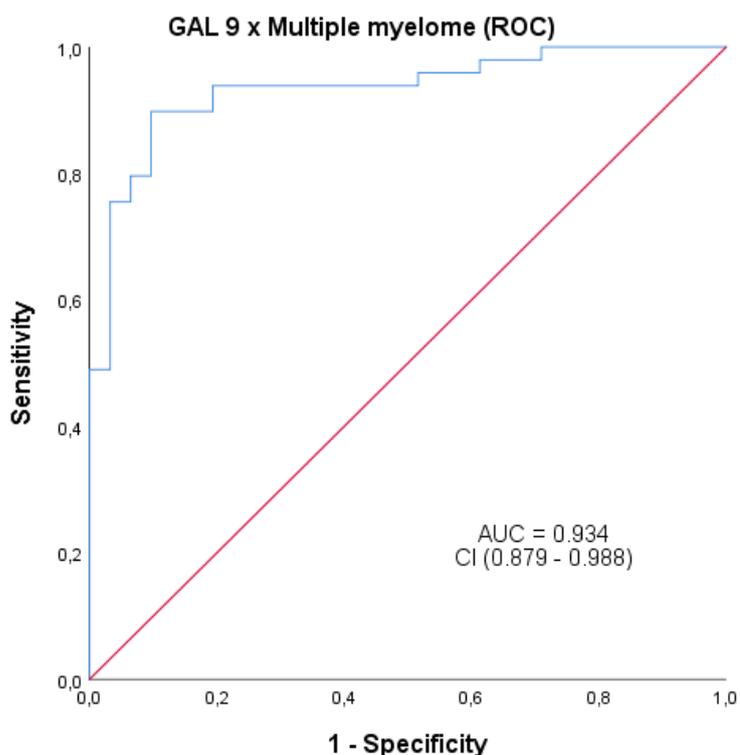
Tabela 4. Associação com os níveis plasmáticos das galectinas com os dados clínicos pacientes de MM. Os valores estatisticamente significativos estão marcados em negrito.

Features	Gal 1		Gal3		Gal 4		Gal 7		Gal 9	
	<=Q50	>Q50	<=Q50	>Q50	<=Q50	>Q50	<=Q50	>Q50	<=Q50	>Q50
Hb median	10.6	8.8	9.9	10.8	11.6	8.15	11.2	8.0	11.6	8.85
interval	6.6-17.5	5.6-17.5	5.6-17.5	6.8-16.10	8.1-17.5	5.6-17.5	6.6-17.5	5.6-14.3	6.6-17.5	5.6-17.5
<i>P value</i>	0.182		0.333		0.007		0.047		0.037	
Ht median	31.55	26.8	27.65	32.5	35.45	24.15	34	24.35	35.2	26.3
Interval	20-60	17-44	17-60	22-48	24-60	17-48	20-60	17-44	20-60	17-44
<i>P value</i>	0.211		0.074		0.005		0.027		0.011	
Platelets (10 ⁹ /L)	220.0	231.5	223.0	240.0	220.5	232.0	248.5	235.0	223.0	235.0
Interval	148-625	33.9-468.2	33.9-625.0	99-660.0	33.9-625.0	56.0-468.2	162.0-625.0	56.0-359.3	33.9-516.0	56.0-660.0
<i>P value</i>	0.979		0.285		0.458		0.564		0.427	
Urea	37	48	41	38	37	52	37	61	36.5	56
Interval	12-117	18-222	12-222	18-117	18-117	12-222	23-96	26-222	12-86	26-222
<i>P value</i>	0.209		0.352		0.252		0.024		0.012	
Creatinine	0.855	1.13	1.0	0.965	0.8	1.13	0.76	2.08	0.83	1.09
Interval	0.45-3.43	0.59-22.3	0.45-22.3	0.59-3.43	0.59-3.43	0.45-22.3	0.45-2.49	0.8-22.3	0.45-5.0	0.59-22.3
<i>P value</i>	0.022		0.883		0.002		<0.0001		0.009	
Corrected calcium	10.46	9.94	9.94	10.25	10.2	10.6	10.3	10.32	9.58	10.63
interval	8-13.56	8.79-14.8	8-14.74	8-14.8	9.0-14.8	8.0-14.74	9.02-13.88	8.21-14.74	8.0-12.6	8.0-14.8
<i>P value</i>	0.704		0.835		0.989		0.852		0.019	
Albumin	3.38	3.5	3.485	3.6	3.68	3.24	3.3	3.4	3.61	3.4
Interval	2.1-5.3	2.3-4.4	2.1-5.3	2.7-4.6	2.91-5.3	2.1-4.6	2.1-5.3	2.2-4.2	2.1-5.3	2.2-4.4
<i>P value</i>	0.797		0.253		0.063		0.692		0.432	
Total protein	8.6	7.65	8.65	7.95	7.3	8.9	8.9	8.65	7.75	8.2
Interval	4.39-14.0	3.31-14.5	3.31-14.0	4.39-14.5	3.31-14.5	4.39-14.0	4.39-14.5	6.0-11.9	3.31-14.5	5.4-11.9
<i>P value</i>	0.692		0.568		0.139		0.926		0.645	
DHL	183	193	173.5	193	163	187	183	184	184	186

Interval	112-335	83.6-446	121-446	83.6-335	83.6-335	121-446	63 83.6-335	121-446	83.6-272	121-446
<i>P value</i>	0.264		0.346		0.350		0.622		0.343	
Beta2-microglobulin interval	4,175.0	5,467.0	4,734.5	4,527	3,623	5,178	3,813	6,936	2,916.5	6,060
<i>P value</i>	0.259		0.957		0.128		0.009		0.001	
Plasmocyte in BM (%)	14.5	19	16	17.5	15	21	13	28	14	24
Interval	0-96	0-77	0-87	0-96	0-96	0-82	0-96	0-82	0-96	0-87
<i>P value</i>	0.599		0.869		0.539		0.437		0.178	

Visto que os níveis plasmáticos de Gal-9 foram mais mais altos em pacientes com MM, decidimos avaliar os parâmetros de acurácia em nossa coorte Na análise da área sobre a curva (AUC, *area under curve*) foi encontrada valores com significância estatística de acordo com o nível de sensibilidade e especificidade. Os valor de corte de Gal-9 usado para distinguir pacientes com e sem MM foi de <2835 pg/ml e correspondeu a uma sensibilidade de 80.65%, especificidade de 93.88% e LR: 13.17 (Figura 3).

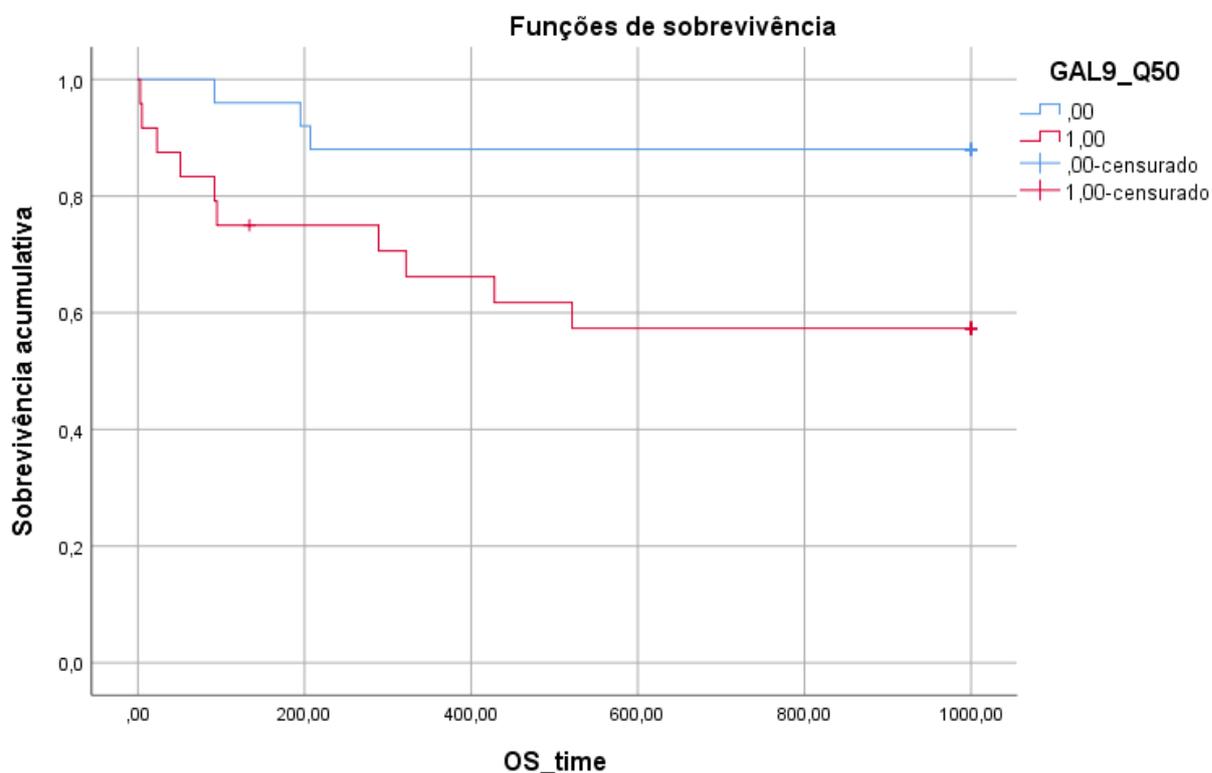
Figura 18. Receiver Operating Characteristic (ROC) para a capacidade de Gal-9 para distinguir pacientes com MM.



Análise da sobrevida global

Em nossa coorte, 13 pacientes vieram a óbito durante o estudo. A análise de sobrevida evidenciou que a expressão de GAL-9 alta em pacientes (>Q50) foi significativamente associada com diminuição da sobrevida global (OS) ($p= 0,016$). A mediana em dias para os pacientes que tinham níveis mais baixos de Gal-9 foi de 653 enquanto os que tinham níveis elevados foi de 899 dias (Figura 4).

Figura 19. Avaliação do tempo de sobrevida global.



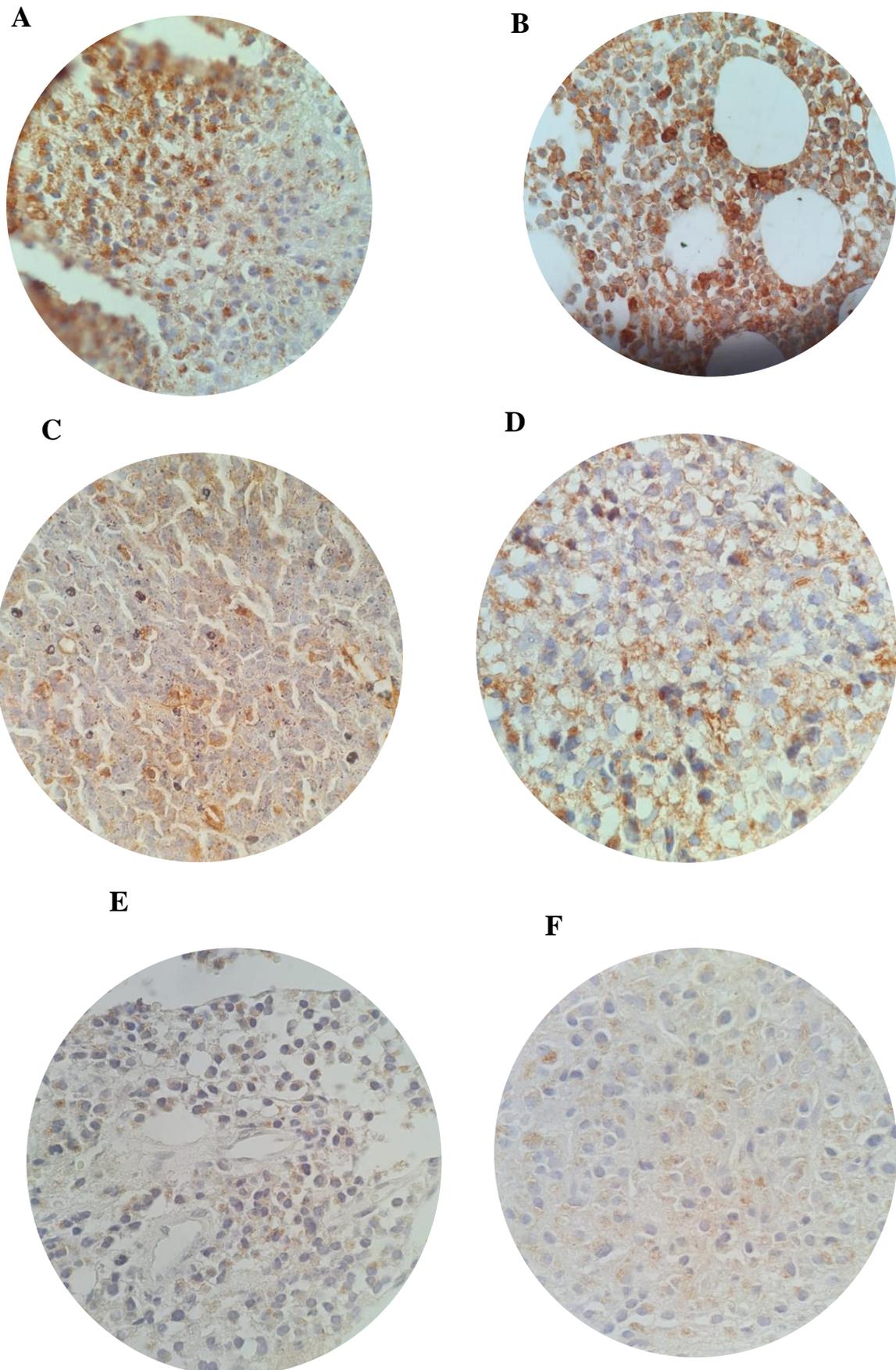
GAL9_Q50	Estimativa	Erro Erro	Média ^a		Estimativa	Erro Erro	Mediana	
			Intervalo de confiança de 95%				Intervalo de confiança de 95%	
			Limite inferior	Limite superior			Limite inferior	Limite superior
,00	899,760	54,408	793,121	1006,399
1,00	653,561	86,266	484,480	822,643
Geral	780,092	53,470	675,292	884,893

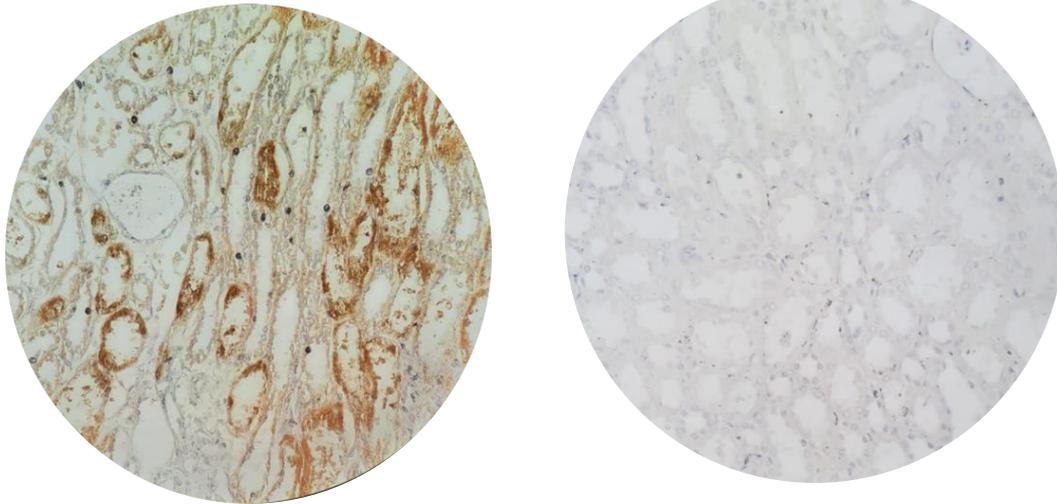
a. A estimacão estará limitada ao maior tempo de sobrevivência se for censurada.

Avaliaco na expressão de Gal-9 em tecido

A expressão de Gal-9 foi realizada em seções de medula óssea ou plasmocitoma de pacientes com mieloma (10) e investigada por imunohistoquímica. A análise dos cortes mostrou que a expressão de Gal-9  heterogênea, independentemente do estágio da doença. Alguns pacientes apresentam forte marcao para Gal-9 (A e B), enquanto outros tem marcao intermediária (C e D) e em outros marcações fracas (E e F) (Figura 5). Tecido renal normal foram usados como controles positivo (G) e negativo (H).

Figura 20. Análises de expressão de Gal-9 em tecido de pacientes com MM.

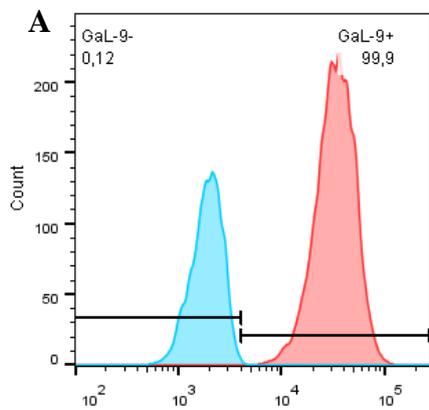




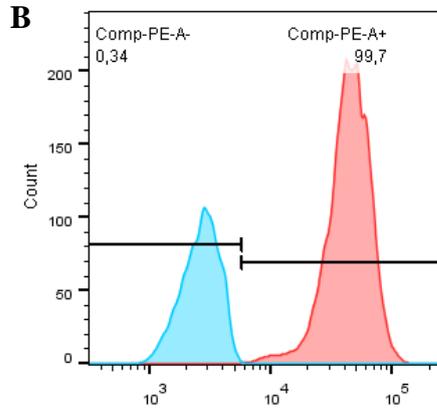
Ensaio *in vitro*

O segundo momento do nosso estudo, consistiu na intervenção *in vitro* em linhagem representativa de MM. Para tal, inicialmente foi feita a análise basal dos níveis de Gal-9 solúvel pela técnica de ELISA nas linhagens MM-1S cocultivada ou não com a linhagem estromal HS-5 em diferentes tempos. Nenhuma condição experimental teve níveis de expressão quantificável segundo o limite do kit, não sendo possível detectar Gal-9 no experimento (dados não mostrados). Diante disso, avaliamos a marcação tanto de superfície quanto intracelular de Gal-9 por citometria de fluxo. A análise da expressão não revelou expressão de Gal-9 na superfície (dados não mostrados) e nem diferença na quantidade de marcação intracelular em nenhuma das condições de estudo (Figura 6). Avaliando a média de fluorescência, parece haver uma maior expressão na linhagem HS-5 cultivada com meio condicionado de MM1-S (F).

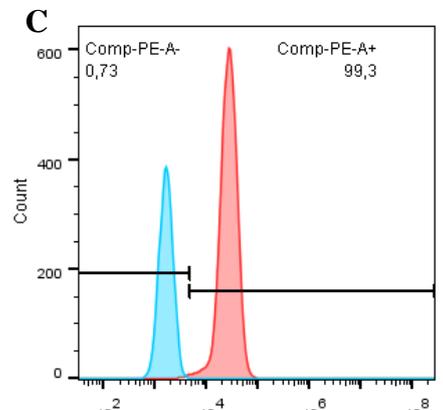
Figura 21. Análises de expressão intracelular de Gal-9 em células estromais cultivadas sozinhas (A) com meio condicionado (B), células de mieloma cultivadas sozinhas (C) com meio condicionado (D) e em cocultivo (E). Os valores da tabela dizem respeito a média de intensidade de fluorescência. (F) Gráfico representativo das médias de fluorescência (MFI) de todas condições experimentais.



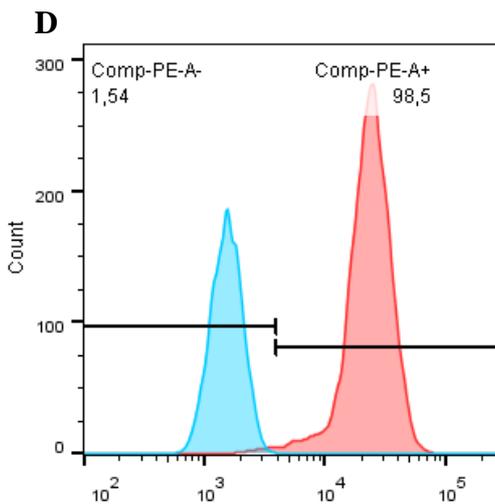
Sample Name	Count	Mean : Comp-PE-A
Intracelular_NM HS5.fcs	3900	1963
Intracelular_HS5.fcs	7811	34738



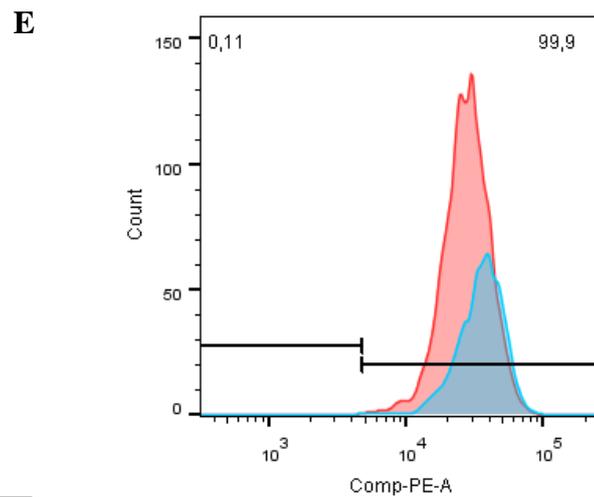
Sample Name	Count	Mean : Comp-PE-A
Intracelular_NM MM1S.fcs	4947	1661
Intracelular_MM1S.fcs	9143	27426



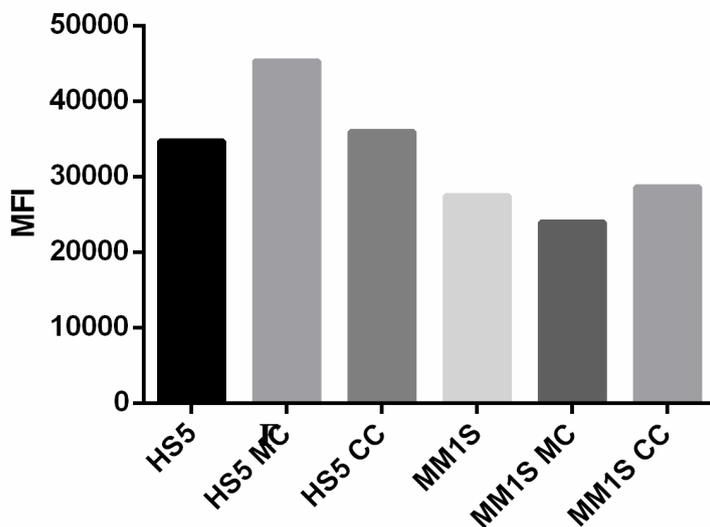
Sample Name	Count	Mean : Comp-PE-A
Intracelular_NM MM1S.fcs	4947	1661
Intracelular_MM1S.fcs	9143	27426



Sample Name	Subset Name	Count	Mean : Comp-PE-A
Intracelular_NM MM1S_MC.fcs	MMS1	4553	1582
Intracelular_MM1S_MC.fcs	MMS1	8374	23985



Sample Name	Count	Mean : Comp-PE-A
HS5 CC	2169	35966
MM1S CC	4691	28657



6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro a avaliar e correlacionar os níveis plasmáticos de galectinas em pacientes brasileiros com mieloma múltiplo. Para realizar este estudo, foi estabelecida uma coorte. O MM é uma doença heterogênea com características clínicas e biológicas distintas. Aliado a isso, nossa diversidade genética, baixo nível socioeconômico e dificuldade de acesso aos serviços de saúde tornam mais complexo o perfil clínico dos pacientes. A caracterização da população estudada é essencial e desafiadora, principalmente quando se trata de uma doença em idosos. Os idosos representam um grupo com escassez de dados clínicos que resulta em monitoramento e gerenciamento ineficientes (WILLAN et al.,2016).

Os pacientes analisados em nossa coorte tinham mediana de idade de 60 anos com predomínio do sexo masculino. Vários estudos publicados com perfis epidemiológicos de pacientes em diferentes lugares ao redor do mundo mostram que o MM afeta idosos com idade média de 70 anos (PALUMBO,2011; KNAUF et al., 2018; TANG et al.,2018). No Brasil, entretanto, a doença parece se manifestar mais precocemente, segundo Hungria e colaboradores em estudo realizado em 2008 (HUNGRIA et al., 2008) com 1.112 pacientes, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 60 anos. Ainda de acordo com o estudo, houve um ligeiro predomínio do sexo masculino, maior incidência de imunoglobulina do tipo IgG e o diagnóstico feito em estágios avançados da doença. Todos esses dados corroboram o que encontramos em nossa coorte (HUNGRIA et al., 2008; TODARO et al., 2011).

Semelhante aos dados publicados por Hungria e colaboradores (2008), em que a maioria dos pacientes se encontrava em estágio avançado no momento do diagnóstico (ISS1: 6,4% 2: 17,1% e 3: 76,5%), em nossa série houve também uma predominância de ISS3. O grande número de pacientes em estágios avançados da doença pode ser explicado, principalmente, pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde e pelo diagnóstico tardio. Em pesquisa realizada em 2017 pela Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE) com 200 pacientes com MM de todo o Brasil, mostrou que 29% deles demoraram mais de 1 ano para receber o diagnóstico, 44% tiveram dificuldade para receber. desse diagnóstico, 20% tinham diagnóstico inconclusivo e 37% tinham vários médicos para finalmente serem diagnosticados (Ministério da Saúde - Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM / SUS).

O sintoma mais comumente relatado em nossos pacientes foi dor óssea presente em todos os pacientes, dos quais mais da metade já apresentava fraturas. De acordo com a literatura, mais de 80% dos pacientes com MM sofrem destruição óssea, o que reduz

muito sua qualidade de vida e tem um sério impacto negativo na sobrevida (VALLET et al.,2018). A regulação da formação óssea está fortemente comprometida em pacientes com mieloma, com inibição da diferenciação dos osteoblastos maduros e alta atividade dos osteoclastos (LIU et al.,2020). Na maioria dos pacientes, isso resulta em doença óssea associada ao mieloma, com impacto direto na qualidade de vida e influência negativa na progressão da doença (PANARONI et al.,2017).

As galectinas participam de vários processos durante a linfopoiese e são capazes de mediar as interações entre as células hematopoéticas e do estroma na medula óssea (PENA et al., 2014). Nossa análise mostrou um aumento nos níveis de galectina 3 no plasma dos pacientes. Galectina 3 (Gal-3) é o membro das galectinas mais comumente estudado na maioria dos cânceres. A primeira associação dos valores séricos de Gal-3 no MM foi feita em 2016 para investigar uma inter-relação entre seus níveis, taxa de sobrevida em um ano e eventos cardiovasculares em indivíduos com mieloma múltiplo tratados com estatinas. O efeito hipolipemiante em usuários de estatina foi associado a um declínio no nível sérico de Gal-3, enquanto no grupo sem estatina não houve resposta semelhante (SAMURA,2016).

No MM a expressão de Gal-3 in vitro parece estar relacionada a maior agressividade, invasão e resistência. O primeiro estudo funcional publicado combinando galectinas e MM data de 2005. Nesse estudo, Chauhan e colegas trataram diferentes linhas de células de MM com um inibidor Gal-3, GCS-100. O tratamento induziu apoptose em todos, incluindo aqueles resistentes à dexametasona, melfalan e doxorrubicina. Nas células purificadas dos pacientes, os resultados foram semelhantes. O GCS-100 foi capaz de inibir o crescimento das células MM, bloquear a migração induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular e induzir a apoptose pela ativação da caspase-8 e caspase-3 seguida pela clivagem proteolítica da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (CHAUHAN et al., 2005). Nossos dados não mostraram associação dos níveis de Gal-3 com os marcadores mais agressivos da doença.

Em nossa análise, não foi observado diferença estatística entre os níveis de Gal-1 e Gal-4 de pacientes e doadores. Esses dados estão de acordo com o estudo de Andersen e colaboradores (2017) [20] em que os níveis séricos de Gal-1 não estavam elevados em pacientes com MM (n = 102) no momento do diagnóstico em comparação com doadores saudáveis. Os níveis de Gal-1 não mostraram associação com angiogênese da medula óssea, parâmetros clínico-patológicos, sobrevida global ou resposta ao tratamento. Recentemente, um estudo publicado mostrou que um baixo nível de expressão da galectina-1 in vitro potencializa a função de reabsorção óssea. Além disso,

a ausência total de Gal-1 no microambiente ósseo permite o desenvolvimento mais rápido de doenças ósseas no MM, apoiando um papel do gal-1 no microambiente da medula óssea (MULLER et al., 2019).

Galectina-4, que tem sido associada ao desenvolvimento e progressão em muitos tipos de câncer. A expressão mais baixa de Gal-4 em células de câncer colorretal (CRC) pode induzir o aumento da proliferação, migração e motilidade celular. A galectina-4 inibiu a tumorigênese das células CRC através da via de sinalização Wnt / β -catenina e da via de sinalização IL-6 / NF- κ B / STAT3 (SATELLI et al., 2011; KIM et al., 2013). No câncer de pulmão e gástrico, a expressão de alto nível de galectina-4 demonstrou ser um preditor independente para metástases e correlacionada com resultados clínicos ruins (HAYASHI et al., 2013; HIPPO et al., 2001). A galectina-4 atua como um supressor de tumor em CRC, câncer pancreático, câncer hepatocelular e carcinoides ileais, enquanto a galectina-4 funciona como um promotor de tumor no câncer de pulmão e gástrico.

O nível de circulação de galectina-4 no soro foi significativamente maior em pacientes com câncer de cólon, hepatocelular e de mama, em particular, aqueles com metástase (KIM et al., 2013; BARROW et al., 2011; BARROW et al., 2013; CAI et al., 2014). Gal-4 promove a adesão de células cancerosas às células endoteliais vasculares por interação com o dissacarídeo Thomsen-Friedenreich (TF) em MUC1 associado ao câncer (BARROW et al., 2011). Além disso, a interação de Gal-4 com o endotélio vascular contribui para o aumento do nível de circulação de algumas citocinas e quimiocinas, incluindo proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF) e IL-6 (CHEN et al., 2014). Vários estudos mostram que a IL-6 desempenha um papel importante na patogênese do MM. As células MM ativam a via de sinalização NF- κ B aderindo diretamente às células do estroma da medula óssea e liberam interleucina IL-6 que pode promover a proliferação e migração de células MM (LIU et al., 2020). Essa interação Gal-4 / IL-6 pode explicar a correlação dos níveis de Gal-4 circulante com estágios mais avançados da doença que encontramos em nossa coorte e que merece mais estudos.

Em nossa coorte, Gal-7 teve seus níveis plasmáticos aumentados em pacientes em comparação com indivíduos saudáveis. Até o momento, não há estudos que relacionem o papel do Gal-7 no contexto do MM, no entanto, alguns estudos indicam que o gal-7 medeia a adesão célula-célula. Menkhorst e colaboradores mostraram que sua expressão no endométrio influenciou a adesão intercelular do epitélio trofoblástico-endometrial in vitro (Menkhorst et al., 2014). Em linfomas, a expressão ectópica de

Gal-7 mostrou uma correlação com o potencial metastático de linhas de células de linfoma transplantadas, outras observações em doenças linfoides humanas sugeriram correlações entre a progressão do tumor e o acúmulo de Gal-7, enquanto nenhuma expressão foi detectada em tecidos normais (KAUR et al., 2016).

Nosso artigo correlaciona os níveis plasmáticos de galectinas 4 e 7 com indicadores clínicos de lesão renal em pacientes com MM. Ambos exibiram uma correlação positiva e estatisticamente significativa com os valores de creatinina e seus níveis aumentados estavam relacionados ao comprometimento da função renal. O envolvimento dos rins no MM e em outras discrasias de células plasmáticas é comum. No momento do diagnóstico, cerca de 50% dos pacientes podem ter envolvimento renal, e isso está associado a maior mortalidade (Vakiti et al., 2020). Dados do United States Renal Data System e European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Registry mostraram que os pacientes com MM contribuíram significativamente para os casos de terapia de substituição renal e a mortalidade geral entre doença renal em estágio terminal com MM foi de 58% quando comparada a 31 % na população em geral (TSAKIRIS et al., 2010; ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU et al., 2007).

Um estudo recente de Prud'homme e colaboradores (PRUD'HOMME et al., 2016) sobre a relação entre galectina e lesão renal aguda (LRA). Foi observado que AKI induz disfunção cardíaca remota, dano, lesão e fibrose por meio da via dependente de Gal-3 em camundongos. Além disso, a LRA foi associada à expressão de Gal-3 e lesão cardíaca na alta da UTI no ambiente clínico. O nível plasmático de Gal-3 mostrou um aumento gradual com a gravidade da LRA na coorte estudada. Portanto, é necessário explorar os mecanismos que induzem a regulação do aumento dos marcadores de lesão renal associados às galectinas 4 e 7 evidenciados em nosso estudo.

A Galectina-9 tem atraído muita atenção por causa de suas múltiplas funções biológicas e fortes efeitos imunomoduladores. Estruturalmente, Gal-9 consiste em dois domínios de reconhecimento a carboidratos conectados por uma sequência de ligante e é capaz de reticular glicoproteínas para formar redes multivalentes de galectina-glicoproteína que regulam múltiplos processos celulares, incluindo morte de células T mediada por imunoglobulina mucina-3 de células T (TIM-3) (YANG et al., 2021).

Gal-9 é essencialmente um supressor do sistema imunológico: promovendo a diferenciação de células T regulatórias (Tregs) e reduzindo células T auxiliares (Th17) e Th1, o que resulta em excessiva supressão de imunidade e inflamação. Em infecções virais, Gal-9 induz apoptose ou supressão de funções efetoras de células T pelo seu

receptor TIM-3. Sendo assim, a Gal-9 promove e inibe a atividade tumoral, dependendo de suas interações com seus ligantes nas células T, células apresentadoras de antígenos ou células tumorais (CHOU et al., 2018).

A expressão de Gal-9 na superfície das células neoplásicas varia de acordo com a entidade, sua expressão em tumores sólidos humanos é mais extensa e melhor estudada. Muitos estudos clínicos esclareceram que a expressão de Gal-9 tem uma estreita associação com metástases e recorrência em tumores sólidos, incluindo melanoma, câncer gástrico, câncer de cólon, hepatocelular, câncer pancreático, câncer de pulmão, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer renal e prostático (KAGESHITA et al., 2002; JIANG et al., 2013; CHOI et al., 2017; WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2012; SIDERAS et al., 2019; GU et al., 2013; KONG et al., 2020; SEIFERT et al., 2020; OHUE et al., 2016; LIU et al., 2017; YASINSKA et al., 2019; XU et al., 2015; ZHOU et al., 2018; WANG et al., 2018 ITOH et al., 2019). Recentemente, foram publicadas duas metanálises mostrando o valor preditivo dos níveis de Gal-9 em tumores sólidos. Em ambos estudos, valores aumentados de Gal-9 predizem resultados clínicos favoráveis que pode ser usado como um biomarcador prognóstico clínico útil, facilitando o tratamento de pacientes (ZHOU et al., 2018; WANG et al., 2018).

Nas oncohematologias, estudos descreveram a participação da Gal-9 na fisiopatologia de diferentes tipos de leucemia, incluindo leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e suas variantes (KURSUNEL E ESENDAGLI, 2017, MOHAMMED et al., 2017). Todos estudos corroboram os resultados aqui encontrados da maior expressão e níveis de Gal-9 e sua associação a parâmetros de maior gravidade. Estudos demonstraram que Tim-3 é expresso sobre a superfície celular de células-tronco de LMA. O papel da via Tim-3/Gal-9 foi documentado na progressão e no desenvolvimento da leucemia mielóide (KURSUNEL E ESENDAGLI, 2017). Em blastos leucêmicos primários, a expressão de receptores de superfície TIM-3 está aumentada, enquanto que a localização em leucócitos isolados de indivíduos saudáveis sua localização é intracelular. Além disso, a ativação de receptores Tim-3 com anticorpo agonístico ou Gal-9 leva à ativação da via mTOR nos blastos LMA primários. A ativação dos receptores Tim-3 também está associada ao aumento da expressão de HIF-1 α , secreção de VEGF e TNF- α (GONÇALVES SILVA et al., 2015).

Kikushige et al. (2015) descreveram o importante papel de TIM-3 e Gal-9 na progressão leucêmica da LMA. Há um aumento significativo de seus níveis séricos em pacientes com LMA em comparação com pessoas saudáveis, pacientes com linfoma não

Hodgkin e pacientes com leucemia linfoblástica aguda do tipo de células B também foram relatados. O bloqueio da ligação da galectina-9 sérica a Tim-3 com a ajuda de um anticorpo neutralizante de galectina-9 (9M1-3) preveniu a auto-renovação e carga leucêmica de células-tronco leucêmicas AML humanas em transplante xenogênico modelo em ratos. Isso sugere que o crescimento de células-tronco leucêmicas é dependente da interação Tim-3/galectina-9. A via de sinalização envolvida nos efeitos em LMA visto no estudo, evidenciou que a ligação de Tim-3 à galectina leva à fosforilação de ERK, AKT com consequente inibição de GSK-3 β , ativação NF- κ B e aumento da translocação de β -catenina do citoplasma para o núcleo.

Outro estudo do mesmo grupo estendeu a relação de Tim-3/Gal-9 na LMA e relatou que Tim-3 é essencial para a secreção de galectina-9 das células LMA. O nocaute específico de Tim-3 em células U-937 não reduziu os níveis intracelulares de Gal-9, porém, a secreção de galectina-9 foi reduzida de maneira significativa. Além disso, o nocaute específico de galectina-9 diminuiu a expressão de Tim-3 em células U-937, sugerindo a interação e feedback positivo existente entre as duas (Gonçalves Silva et al., 2016).

Em síndromes mielodisplásicas (SMD), entidades neoplásicas com alto potencial para progressão para LMA, foi demonstrado que existe um aumento na expressão de Tim-3 na superfície de células blásticas isoladas da medula óssea de pacientes com SMD. Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) obtidas de pacientes com SMD progredindo para LMA juntamente com as linhas de células MDS secretaram galectina-9 em meios de cultura e houve aumento nos níveis de galectina-9 em sobrenadantes cultivados. Além disso, os níveis plasmáticos de galectina-9 foram significativamente mais altos em pacientes com SMD em progressão para LMA (SMD-LMA) em comparação com indivíduos normais e em pacientes com SMD de baixo risco. A taxa de sobrevivência geral, após cinco anos do diagnóstico inicial foi muito menor em pacientes com níveis mais elevados de galectina-9 (≤ 10 ng / ml) em comparação com pacientes com níveis baixos de galectina (> 10 ng / ml) . Isso sugere que a alta galectina-9 pode estar relacionada a um mau prognóstico em pacientes com SMD e SMD-LMA (ASAYAMA et al., 2017). Esses dados estão em consonância ao que observamos em nossa coorte na qual pacientes com níveis altos de Gal-9 apresentaram menor OS.

Em leucemia de células T do adulto foi demonstrado que o aumento nos níveis plasmáticos de Gal-9 nos pacientes está associado a um aumento no desenvolvimento de efeitos colaterais após o tratamento com mogamulizumabe (anticorpo monoclonal

anti-CCR4). Em pacientes tratados com sucesso com mogamulizumabe (remissão completa), houve um aumento nos níveis de Gal-9 (3–5 vezes) junto com erupções cutâneas (efeitos colaterais do tratamento). A biópsia de pele mostrou infiltração por células inflamatórias e aumento na síntese de Gal-9, sugerindo a correlação entre Gal-9 e desenvolvimento de efeitos colaterais inflamatórios na pele. Conseqüentemente, altos níveis de Gal-9 indicam carga tumoral e seus níveis aumentados refletem a ativação imunológica por mogamulizumabe, sugerindo que o aumento de Gal-9 pode refletir efeitos adversos relacionados ao sistema imunológico de produtos biológicos (Mohammed et al., 2017).

Na leucemia linfocítica crônica (LLC) O nível sérico de Gal-9 foi significativamente aumentado ($p < 0,0001$) em pacientes com CLL em comparação com o grupo controle. Além disso, os pacientes com LLC, que exibiram falha do tratamento, exibiram maiores concentrações de Gal-9 ($P = 0,06$) ao final do tratamento, quando comparados com pacientes em remissão completa ou estabilização do doença. Mesmo com a limitação do número pequeno de pacientes, houve correlação entre os níveis de Gal-9 e fatores prognósticos negativos, incluindo del11q, del17p, LDH, β 2microglubulina e resposta ao tratamento. Foi observada também uma associação entre os níveis de Gal-9 e a progressão da LLC ou mortalidade do paciente (WDOWIAK et al., 2019). Em nosso estudo nos níveis de Gal-9 e β 2microglubulina também estiveram diretamente relacionados.

No MM, o uso de galectina-9 recombinante resistente à protease (hGal9) *in vitro*, inibiu a proliferação celular de cinco linhagens celulares de mieloma examinadas, incluindo uma resistente a bortezomibe. hGal9 também induziu morte celular em células de mieloma derivadas de pacientes, alguns com fatores de risco insatisfatórios, como deleção cromossômica de 13q ou translocação t (4; 14) (p16; q32). Finalmente, hGal9 inibiu de forma potente o crescimento de células de mieloma humano xenoenxertadas em camundongos (KOBAYASHI T et al., 2010). Outro estudo conduzido por An e colaboradores (2016) mostrou níveis significativamente mais elevados de Gal-9 em pacientes, em comparação com controles saudáveis. Os autores concluíram que há um papel da Gal-9 secretada por osteoclastos na regulação negativa das células Th1, por meio da interação com seu receptor TIM-3 na superfície das células T.

Recentemente, um estudo traçou os perfis de *checkpoint* imunológico em amostras de BM de pacientes com MM e controles saudáveis usando citometria de massa. Foi identificado anormalidade na composição das células imunes, com um

aumento significativo nas células T CD4, T CD8 e natural killer. Além disso, existem vários pontos de verificação imunológicos críticos, como ligante de morte celular programada 1 (PD-1), Gal-9, TIM-3 e coestimulador de células T induzível (ICOS) / ligante de ICOS, em ambos MM e células efectoras imunológicas e várias células T CD8 ativadas PD-1⁺ sem CD28 foram distinguidas em pacientes com MM (WANG et al., 2020).

Até o presente momento, apenas esses estudos fizeram associação da presença de Gal-9 e seu envolvimento no MM. Como vimos, diferentemente da sua função na maioria dos tumores sólidos, Gal-9 parece ter um papel protumoral em oncohematologias. Em nosso estudo, os níveis aumentados de Gal-9 foram associados a uma menor sobrevida global, com parâmetros de agressividade da doença, em especial com níveis elevados de uréia e presença de dano renal. Yang e colaboradores (2020) sugeriram que o TIM-3 funciona como um regulador chave nos processos inflamatórios renais e serve como um potencial alvo terapêutico para lesão renal. A expressão aumentada de TIM-3 agrava a lesão de podócitos na nefropatia diabética, promovendo a ativação de macrófagos por meio da via NF- κ B/TNF- α . Dada a estreita relação TIM-3/GAL-9 essa é a via provável que pode estar implicada nos resultados que encontramos em nossa coorte e merece maiores estudos.

Gal-9 está presente tanto na superfície quanto no citoplasma das células e exerce sua atividade a depender de sua localização. Em tecidos, assim como os níveis circulantes, a expressão de Gal-9 é variável a depender da entidade clínica. Em nosso estudo os pacientes apresentaram grande variação da marcação por imunohistoquímica. No carcinoma endometrial expressão de Gal-9 foi significativamente diferente entre os diferentes graus históricos, estágios patológicos, graus de infiltração miometrial e metástases em linfonodos. A expressão de Gal-9 em tecidos em um estágio inicial e sem metástases em linfonodos, foi significativamente mais forte do que naqueles no estágio tardio (SUN E DAI, 2020). Em amostras de tecido de pacientes com glioma, Gal-9 foi fortemente regulada positivamente no glioblastoma multiforme em comparação com tecidos cerebrais normais e glioma de grau inferior. Além disso, os dados de *microarray* de tecido exibiram que a expressão de Gal-9 no núcleo do tumor é maior do que na borda e foi correlacionada com a sobrevida mais curta (YUAN et al., 2020).

Em nossa coorte, não foi possível associar expressão de Gal-9 dos tecidos a prognóstico. Porém, é interessante ressaltar que dos 13 pacientes que tiveram o padrão de marcação avaliadas pela imunohistoquímica, dois exibiram alta expressão de Gal-9 no momento do diagnóstico e vieram a óbito no curso do trabalho. É necessário uma

análise mais detalhada sobre esse achado para que possamos correlacionar a expressão de Gal-9 em tecidos de pacientes com MM com uma sobrevivência mais curta.

As galectinas podem desempenhar suas funções a nível intracelular aumentando os sinais oncogênicos e reduzindo a apoptose que promove a transformação e proliferação tumoral. Presente extracelularmente, pode se ligar às glicoproteínas da superfície celular e formar redes de galectina, dependendo dos locais glicosilados. Em nossas análises com linhagem celular MM1-S não foi possível detectar níveis de Gal-9 solúvel secretada em meio condicionado de células estromais ou em cocultivo. Também não vimos diferença nos níveis de Gal-9 intracelular nas mesmas condições experimentais.

Como já foi falado, diferentemente de outras galectinas, Gal-9 tem um receptor específico conhecido como Tim-3, que atua como seu transportador e, portanto, participa da sua secreção. O estudo conduzido por Gonçalves Silva (2017) relatou que a alça autócrina Tim-3-galectina-9 é ativada em células LMA através das vias da proteína quinase C (PKC) / mTOR. Essas vias desencadeiam a tradução de Tim-3 e galectina-9 e induzem altos níveis de secreção de galectina-9, bem como a liberação de Tim-3 solúvel. Em nosso caso, a falta de expressão de Gal-9 bem como a não modulação dos seus níveis intracelular pode ser resultante do modelo da doença. As células do MM são extremamente dependentes do microambiente medular e de todas as células que dele participam (LOMAS, TAHR E GHOBRIAL, 2020). Sendo assim talvez seja necessário um enriquecimento com outras células, fatores de crescimento e citocinas que possam mimetizar o nicho medular no MM e refletir a maior secreção e nível de Gal-9 circulante visto nos pacientes.

Outros fatores devem ser levados em conta e refletem a limitação do nosso estudo. O primeiro deles é a limitação do “n” amostral, além da dificuldade na obtenção das biopsias de todos os pacientes e na realização dos testes *in vitro*. Foram feitos alguns ensaios de imunofluorescência para identificação da(s) célula(s) responsável pela expressão de Gal-9, porém, o tecido apresentou forte característica de autofluorescência. Segundo Axelrod e colaboradores isso se dá graças as propriedades endógenas das células imunes e os componentes da matriz da medula óssea que geram uma coloração tipicamente falsa, sendo necessário bloqueio apropriado e otimização de protocolo antes da adição de qualquer anticorpo (AXELROD, PIENTA e VALKENBURG, 2018). As conclusões sobre a possível modulação na intensidade de fluorescência vista na análise do MFI merece maior atenção. Novos experimentos precisam ser realizados para observar se o padrão se confirma.

A escassez de dados na literatura encontrados até o presente momento sobre o perfil de expressão, níveis e participação da galectina 9 no MM torna o estudo particularmente interessante e desafiador. Resultados opostos ou contraditórios podem ser vistos principalmente em tumores sólidos e entidades hematológicas, dificultando comparação dos nossos dados. Ainda assim, os resultados deste estudo mostram possíveis novos alvos terapêuticos para tratamento do MM e o valor prognóstico de Gal-9 em pacientes com MM.

7 CONCLUSÃO

- Os níveis de plasmáticos das galectinas 3,7 e 9 no plasma de pacientes no momento do diagnóstico são maiores em pacientes em comparação a indivíduos saudáveis;
- Níveis aumentados de Gal-1, Gal-4, Gal-7 e Gal-9 foram correlacionados e associados com parâmetros hematológicos e renais de gravidade da doença e estágios mais avançados ;
- Altos níveis de Gal-9 em pacientes estão associados com menor sobrevida global;
- A marcação tecidual de Gal-9 é heterogênea e pode estar relacionada a pior prognóstico no MM;
- A linhagem celular MM1-S não exibe níveis quantificáveis de Gal-9 solúvel nem em sua superfície celular. Não há diferenças significativas na marcação intracelular em seus níveis na presença de meio condicionado ou cocultivo de células estromais.

8 REFERÊNCIAS

- ABDI, J; CHEN, G; CHANG, H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. *Oncotarget*. 4:2186–2207. 2013.
- ADVEDISSIAN, T et al. E-cadherin dynamics is regulated by galectin-7 at epithelial cell surface. *Sci. Rep*. 7:17086. 2017.
- AN, G et al. Osteoclasts promote immune suppressive microenvironment in multiple myeloma: Therapeutic implication. *Blood*. 2016.
- ANDERSEN, M.N et al. Serum galectin-1 in patients with multiple myeloma: Associations with survival, angiogenesis, and biomarkers of macrophage activation. *Onco Targets Ther*. 10, 1977–1982. 2017.
- ANDERSEN, T.L et al. Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: a new type of cancer-host partnership? *J Pathol*. 211:10–17. 2007.
- ANDERSON, D.E. Tim-3 as a therapeutic target in human inflammatory diseases. *Expert Opin. Ther. Targets*. 11, 1005–1009. 2007.
- ANDERSON, K.C; CARRASCO, R.D. Pathogenesis of myeloma. *Annu Rev Pathol*. 2011;6:249–274.
- ASAYAMA T, Tamura H, Ishibashi M, Kuribayashi-Hamada Y, Onodera-Kondo A, Okuyama N, Yamada A, Shimizu M, Moriya K, Takahashi H, Inokuchi K. Functional expression of Tim-3 on blasts and clinical impact of its ligand galectin-9 in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017 Oct 4;8(51):88904-88917.
- AZAB AK, et al. Hypoxia promotes dissemination of multiple myeloma through acquisition of epithelial to mesenchymal transition-like features. *Blood* 119:5782–5794. 2012.
- AXELROD HD, PIENTA KJ, VALKENBURG KC. Optimization of Immunofluorescent Detection of Bone Marrow Disseminated Tumor Cells. *Biol Proced Online*. 2018 Jul 1;20:13.
- BAFICO A et al. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/ Arrow. *Nat Cell Biol*. 3:683–686. 2001.
- BALAN, V; NANGIA-MAKKER, P; RAZ, A. Galectins as cancer biomarkers, *Cancers (Basel)* 2 592–610.2010.
- BARILLE, S et al. Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. *Blood*. 86: 3151-3159.1995.
- BENJAMIN, J.S et al. RANKL Expression, Function, and Therapeutic Targeting in Multiple Myeloma and Chronic Lymphocytic Leukemia. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2280 Published January. 2013
- BERGSAGEL, P.L et al. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood*.121(6):884-92,

2013.

BIANCHI G; ANDERSON, C.K. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *Ca cancer j clin.*64:423–444. 2014

BIANCHI, G et al. Cell Trafficking in Multiple Myeloma. *Open J Hematol.*3(Suppl 1). 2012.

BIRD, J.M et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma 2011. *Br J Haematol.* 154(1):32-75. 2011.

BIRGEGARD, G; GASCÓN, P; LUDWIG, H. Evaluation of anaemia in patients with multiple myeloma and lymphoma: findings of the European Cancer Anaemia Survey. *Eur J Haematol.* 77:378-86. 2006.

BODY, J.J, et al. A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res.*12:1221–1228. 2006.

BOLZONI, M et al. Myeloma cells inhibit non-canonical Wnt co-receptor ROR2 expression in human bone marrow osteoprogenitor cells: Effect of Wnt5a/ROR2 pathway activation on the osteogenic differentiation impairment induced by myeloma cells. *Leukemia.* 27, 451–463. 2013.

BRIGLE K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Semin Oncol Nurs.* 2017 Aug;33(3):225-236. doi: 10.1016/j.soncn.2017.05.012. Epub 2017 Jul 5. PMID: 28688533.

CADA Z et al. Immunohistochemical fingerprinting of the network of seven adhesion/growth-regulatory lectins in human skin and detection of distinct tumour-associated alterations. *Folia Biol. (Praha)* 55:145–152. 2009.

CALVANI, N et al. Functional osteoclast-like transformation of cultured human myeloma cell lines. *Br J Haematol.* 130:926–938. 2005.

CAVO, M et al. GIMEMA (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) Italian Myeloma Network. Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide- dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 120(1):9–19. 2012.

CEDENO-LAURENT F et al. Galectin-1 inhibits the viability, proliferation, and Th1 cytokine production of nonmalignant T cells in patients with leukemic cutaneous T-cell lymphoma. *Blood.*119(15):3534-3538. 2012.

CHAUHAN, D et al. A novel carbohydrate-based therapeutic GCS-100 overcomes bortezomib resistance and enhances dexamethasone-induced apoptosis in multiple myeloma cells. *Cancer Res.* 65, 8350–8358. 2005.

CHAN S.W et al. Changed expression of E-cadherin and galectin-9 in oral squamous cell carcinomas but lack of potential as prognostic markers. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 15:2145– 2152. 2014.

CHENG CL et al. Higher bone marrow LGALS3 expression is an independent unfavorable prognostic factor for overall survival in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.*

121(16):3172-3180. 2013.

CHESEBROUGH M, et al. Drug response in a genetically engineered mouse model of multiple myeloma is predictive of clinical efficacy. *Blood*. 120:376–385. 2012.

CHILD, J et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*.348(19):1875–83.2003.

CHOI, S.J et al. Macrophage inflammatory protein 1-alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood*. 96:671–675. 2000.

CHOI SI, Seo KW, Kook MC, Kim CG, Kim YW, Cho SJ: Prognostic value of tumoral expression of galectin-9 in gastric cancer. *Turk J Gastroenterol* 2017;28:166-170.

CHOU FC, Chen HY, Kuo CC, Sytwu HK. Role of Galectins in Tumors and in Clinical Immunotherapy. *Int J Mol Sci*. 2018 Feb 1;19(2):430. doi: 10.3390/ijms19020430. PMID: 29389859; PMCID: PMC5855652.

CHRISTIANSEN, M.N et al. Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics*. 14:525–546. 2014.

Chronic Leukemia Myeloma Task Force, National Cancer Institute: Proposed guidelines for protocol studies: II. Plasma cell myeloma. *Cancer Chemother Rep* 4:145-158, 1973

COLLINS, S.M et al. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunol Immunother*. 62(12):1841–1849. 2013.

COOK, G et al. National Cancer Research Institute Haemato-oncology Clinical Studies Group. High-dose chemotherapy plus autologous stem-cell transplantation as consolidation therapy in patients with relapsed multiple myeloma after previous autologous stemcell transplantation (NCRI Myeloma X Relapse [Intensive trial]): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 15(8):874–885. 2014.

COSTA F, DALLA PALMA B, GIULIANI N. CD38 Expression by Myeloma Cells and Its Role in the Context of Bone Marrow Microenvironment: Modulation by Therapeutic Agents. *Cells*. 2019 Dec 13;8(12):1632

CORRÊA NETTO NF. Epidemiologia do mieloma múltiplo e distúrbios relacionados no Brasil. 29 de março de 2019. Disponível em: <https://bit.ly/36XOwWf>. [2020 nov 15].

COWAN, A.J et al. Global Burden of Multiple Myeloma: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *JAMA Oncol*. 2018.

CROCI D.O, et al. Nurse-like cells control the activity of chronic lymphocytic leukemia B cells via galectin-1. *Leukemia*. 27(6):1413-1416. 2013.

CROCKETT, J.C et al. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci*. 124:991–998. 2011.

CUMMINGS, RD et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY)2009.

- DANET, G.H et al. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J. Clin. Invest.* 112, 126–135. 2003.
- DE BRUYNE, E et al. Endothelial cell-driven regulation of CD9 or motility-related protein-1 expression in multiple myeloma cells within the murine 5T33MM model and myeloma patients. *Leukemia.*20, 1870–1879. 2006.
- DE WEERS M et al. Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol.* 186(3):1840–1848. 2011.
- DEMERS M, MAGNALDO T, ST-PIERRE Y. A novel function for galectin-7: promoting tumorigenesis by up-regulating MMP-9 gene expression. *Cancer Res.* 65(12):5205-5210. 2005.
- DEMERS M, et al. Galectin-7 in lymphoma: Elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res.* 67:2824–2829. 2007.
- DHODAPKAR, P. et al. Dendritic cells mediate the induction of polyfunctional human IL17- producing cells (Th17-1 cells) enriched in the bone marrow of patients with myeloma. *Blood.* 1;112(7):2878-85. 2008.
- DI LELLA, S et al. When galectins recognize glycans: from biochemistry to physiology and back again. *Biochemistry.* 50(37):7842-7857. 2011.
- DIMOPOULOS, A.M et al. POLLUX Investigators. Daratumumab, lenalidomide and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 375(14):1319–1331. 2016.
- DIMOPOULOS, M et al. Multiple Myeloma (010) Study Investigators. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med.* 361(5):544. 2009.
- DIMOPOULOS, M.A et al. ENDEAVOR Investigators. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol.* 17(1):27–38. 2016.
- DIMOPOULOS, M.A et al. Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia* 22:1485-93. 2008.
- DRAKE, R.R: Chapter 1 - Glycosylation and Cancer: Moving Glycomics to the Forefront; in Research RRD and LEBBT-A in C (ed): Glycosylation and Cancer. Academic Press, 2015, pp 1–10.
- DURIE, B.G et al. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J.* 4:379-2003.
- DURIE, B.G.M; SALMON, S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer.* 36:842- 854, 1975.
- EDWARDS, C.M et al. Increasing Wnt signaling in the bone marrow microenvironment inhibits the development of myeloma bone disease and reduces tumor burden in bone in vivo. *Blood.* 111:2833–2842. 2008.

- EL LEITHY A.A et al. Expression profiling of cancer-related galectins in acute myeloid leukemia. *Tumour Biol.* 2015;36(10):7929-7939.
- ELANTAK, L et al. Structural basis for galectin-1-dependent pre-B cell receptor (pre-BCR) activation. *J. Biol. Chem.* 287, 44703–44713. 2012.
- ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU V, et al. Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations, and prognostic significance. *Leuk Lymphoma.* 48:337-41. 2007.
- ELY, S.A; KNOWLES, D.M. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol.* 160: 1293-1299. 2002.
- Essentials of Glycobiology (Chapter 27). Vol. pp. 417-429 (ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Edition); 2017.
- ESTEVE, F.R; ROODMAN, G.D. Pathophysiology of myeloma bone disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20(4):613–624. 2007.
- FARRUGIA, A.N et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer Res.* 63:5438–5445. 2003.
- FRIEDEL, M et al. Galectin-8 enhances adhesion of multiple myeloma cells to vascular endothelium and is an adverse prognostic factor. *Glycobiology.*26, 1048–1058. 2016.
- FULCINITI M, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood.*114:371–379. 2009.
- FUSTER, M.M; ESKO, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets, *Nat. Rev. Cancer.* 5 526–542. 2005.
- GANZ, T; NEMETH, E. Hepcidin and disorders of iron metabolism. *Ann Rev Med.* 62: 347-60. 2011.
- GAO N et al. Clinical significance of galectin-3 in patients with adult acute myeloid leukemia: a retrospective cohort study with long-term follow-up and formulation of risk scoring system. *Leuk Lymphoma.* 58(6): 1394-1402. 2017.
- GEHLKEN, C et al. Galectin-3 in heart failure: an update of the last 3 years. *Heart Fail. Clin.* 14, 75-92. 2018.
- GENDRONNEAU, G et al. Overexpression of galectin-7 in mouse epidermis leads to loss of cell junctions and defective skin repair. *PLoS ONE.* 10:e0119031. 2015.
- GIESEKE, F et al. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood.* 116(19):3770-3779. 2010.
- GIORDANO, M; CROCI, D.O; RABINOVICH, G.A. Galectins in hematological malignancies. *Curr. Opin. Hematol.* 20 327–335. 2013.
- GIULIANI, N et al. Human myeloma cells stimulate the receptor activator of nuclear factor- kappa B ligand (RANKL) in T lymphocytes: a potential role in multiple myeloma bone disease. *Blood.* 100; 13pp. 4615-4621.2002.
- GIULIANI, N et al. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone

marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood*.106, 2472– 2483. 2005.

GIULIANI, N; COLLA, S; RIZZOLI, V. New insight in the mechanism of osteoclast activation and formation in multiple myeloma: focus on the receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL). *Exp Hematol*. 32:685–691.2004.

GIULIANI, N; RIZZOLI, V; ROODMAN, G.D. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood*. 108, 3992–3996. 2006.

GLAVEY, S.V et al. Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia*. 31, 2426–2434. 2017.

GLAVEY, Siobhan. Multiple myeloma: The role of glycosylation in disease development and progression. Tese de conclusão de doutorado da School of Medicine National University of Ireland, Galway, 2017-09-09.

GOLDSCHMIDT H, Ashcroft J, Szabo Z, Garderet L. Navigating the treatment landscape in multiple myeloma: which combinations to use and when?. *Ann Hematol*. 2019;98(1):1-18. doi:10.1007/s00277-018-3546-8

GONÇALVES SILVA, I et al. The Tim-3-galectin-9 secretory pathway is involved in the immune escape of human acute myeloid leukemia cells. *EBioMedicine*. 22:44-57. 2017.

GONÇALVES SILVA I, Gibbs BF, Bardelli M, Varani L, Sumbayev VV. Differential expression and biochemical activity of the immune receptor Tim-3 in healthy and malignant human myeloid cells. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):33823-33.

GONÇALVES SILVA I, Rüegg L, Gibbs BF, Bardelli M, Fruehwirth A, Varani L, Berger SM, Fasler-Kan E, Sumbayev VV. The immune receptor Tim-3 acts as a trafficker in a Tim-3/galectin-9 autocrine loop in human myeloid leukemia cells. *Oncoimmunology*. 2016 Jun 29;5(7):e1195535.

GONÇALVES SILVA I, Yasinska IM, Sakhnevych SS, Fiedler W, Wellbrock J, Bardelli M, Varani L, Hussain R, Siligardi G, Ceccone G, Berger SM, Ushkaryov YA, Gibbs BF, Fasler-Kan E, Sumbayev VV. The Tim-3-galectin-9 Secretory Pathway is Involved in the Immune Escape of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *EBioMedicine*. 2017 Aug;22:44-57. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.018. Epub 2017 Jul 19. PMID: 28750861; PMCID: PMC5552242.

GU CJ, Wu H, Sheng CY, Ni QC: [Expression and prognostic value of galectin-9 in hepatocellular carcinoma patients]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2013;93:2025-2028.

GRANDIN, E.W et al. Patterns of cardiac toxicity associated with irreversible proteasome inhibition in the treatment of multiple myeloma. *J Card Fail*. 21(2):138–144. 2015.

GREENSTEINA S et al. Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: A model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid- sensitive and -resistant MM cells. *Experimental Hematology*.) 271–282 0301-472X/03.2003.

- GUNN, W.G et al. A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells*. 24:986–991.2006.
- HAN, J.H et al. Macrophage inflammatory protein-1alpha is an osteoclastogenic factor in myeloma that is independent of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand. *Blood*. 97:3349–3353. 2001.
- HAUSELMANN, I; BORSIG L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Frontiers in oncology*. 4:28. 2014.
- HEIDER, U et al. Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 9:1436–1440. 2003.
- HIDESHIMA, T et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(24):8567–8572. 2005.
- HIDESHIMA, T et al. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*. 20:4519–4527. 2001.
- HORENSTEIN, A.L et al. NAD(+)-metabolizing ectoenzymes in remodeling tumor-host interactions: the human myeloma model. *Cells*. 4(3):520–537. 2015.
- HOYER KK et al. An antiapoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 164(3): 893-902. 2004.
- HOYER KK et al. An antiapoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. *Am J Pathol*. 164(3): 893-902. 2004.
- HU J, et al. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood*.116(9):1524–1527. 2010.
- Hu J, et al. Targeting the multiple myeloma hypoxic niche with TH-302, a hypoxia-activated prodrug. *Blood*.116:1524–1527. 159. 2010.
- HUNGRIA, V.T.M et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica*.93(5):791-2, 2008.
- HUNGRIA, V.T.M. Mieloma múltiplo no Brasil: aspectos clínicos, demográficos e validação do Sistema de Estadiamento Internacional (ISS) em pacientes brasileiros. *Rev bras hematol hemoter*. 29(Suppl. 1):10-3, 2007.
- International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma By imwg On July 28, 2016 · In Diagnosis, Staging & Monitoring, IMWG Publications.
- International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 121:749-57, 2003.

- ITO, T et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 327:1345–1350. 2010.
- ITOH, Aiko, Yasuhiro Nonaka, Takashi Ogawa, Takanori Nakamura, Nozomu Nishi, Galectin-9 induces atypical ubiquitination leading to cell death in PC-3 prostate cancer cells, *Glycobiology*, Volume 29, Issue 1, January 2019, Pages 22–35, <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy099>
- JIANG J et al. Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS ONE*.8:e81799. 2013.
- JIANG J, Jin MS, Kong F, Cao D, Ma HX, Jia Z, Wang YP, Suo J, Cao X: Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer. *PLoS One* 2013;8:e81799.
- JOHANNSEN, T; LEPENIES, B. Glycan-based cell targeting to modulate immune responses. *Trends Biotechnol*. 35 334–346. 2017.
- JOSHUA DE, BRYANT C, DIX C, GIBSON J, HO J. Biology and therapy of multiple myeloma. *Med J Aust*. 2019 May;210(8):375-380
- KURSUNEL MA, ESENDAGLI G. A Co-Inhibitory Alliance in Myeloid Leukemia: TIM-3/Galectin-9 Complex as a New Target for Checkpoint Blockade Therapy. *EBioMedicine*. 2017 Sep;23:6-7. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.08.002. Epub 2017 Aug 4. PMID: 28801238; PMCID: PMC5605328.
- KATZ, B.Z. Adhesion molecules--The lifelines of multiple myeloma cells. *Semin Cancer Biol*. 20:186–195. 2010.
- KAGESHITA T et al. Hirashima M. Possible role of galectin-9 in cell aggregation and apoptosis of human melanoma cell lines and its clinical significance. *Int. J. Cancer*. 99:809– 816. 2002.
- KAWANO Y, et al. Hypoxia reduces CD138 expression and induces an immature and stem cell-like transcriptional program in myeloma cells. *Int J Oncol*. 43:1809–1816. 2013.
- KHAN, M.L, et al. A comparison of lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/bortezomib/ dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 156(3):326–333. 2012.
- KAUR M et al. Roles of Galectin-7 in Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 17:455–461. 2016.
- KIENZLE G, VON KEMPIS J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol*. 2000 Jan;12(1):73-82.
- KIKUSHIGE Y, Miyamoto T, Yuda J, Jabbarzadeh-Tabrizi S, Shima T, Takayanagi S, Niuro H, Yurino A, Miyawaki K, Takenaka K, Iwasaki H, Akashi K. A TIM-3/Gal-9 Autocrine Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell Stem Cell*. 2015 Sep 3;17(3):341-52.

KNAUF, W. et al. Survival of non-transplant patients with multiple myeloma in routine care differs from that in clinical trials—data from the prospective German Tumour Registry Lymphatic Neoplasms. *Ann Hematol* 2018.

KOBAYASHI T et al. Galectin-9 exhibits anti-myeloma activity through JNK and p38 MAP kinase pathways. *Leukemia*. 24(4):843-850. 2010.

KONG F, Jin M, Cao D, Jia Z, Liu Y, Jiang J. Galectin-3 not Galectin-9 as a candidate prognosis marker for hepatocellular carcinoma. *PeerJ*. 2020 Sep 16;8:e9949. doi: 10.7717/peerj.9949. PMID: 32995093; PMCID: PMC7501799.

KRÖNKE, J et al. Lenalidomide Causes Selective Degradation of IKZF1 and IKZF3 in Multiple Myeloma Cells. *Science*. 343:301–305. 2014.

KUEHL, W.M; BERGSAGEL, P.L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J. Clin. Investig.* 122, 3456–3463. 2012.

KUMAR, S et al. Randomized, multi-center, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*. 119(19):4375–4382. 2012.

KUMAR, S.K et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*.28: 1122–08. 2013.

KUMAR, S.K et al. Mayo Phase 2 Consortium. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood*. 125(3):443–448. 2015.

KURODA J et al. Targeting activating transcription factor 3 by Galectin-9 induces apoptosis and overcomes various types of treatment resistance in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cancer Res*. Jul; 8(7):994-1001. 2010.

KYLE, R.A, RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 351:1860-73. 2004. KYLE, R; RAJKUMAR, S. Multiple myeloma. *Blood*. 111(6):2962–72. 2008.

KYLE R.A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*.2003;78:21-33. Sep; 2(9): 87.2014.

LACY, M.Q et al. Pomalidomide, bortezomib and dexamethasone (PVD) for patients with relapsed lenalidomide refractory multiple myeloma (MM). *Blood*. 124:304. 2014.

LADERACH D.J et al. A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res*. 73:86–96. 2013.

LARSEN, J.T et al. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia*. 27:941-946. 2013.

LAUTA, V.M. Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine*. 16:79–86. 2001.

LEE, J.W et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood*.103:2308–2315. 2004.

- LENTZSCH, S et al. Combination of bendamustine, lenalidomide, and dexamethasone (BLD) in patients with relapsed or refractory multiple myeloma is feasible and highly effective: results of phase 1/2 open-label, dose escalation study. *Blood*. 119(20): 4608–4613. 2012.
- LEVESQUE, J.P et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells*. 25, 1954–1965. 2007.
- LI, B. et al. Effect of hypoxia on the growth and apoptosis of the human multiple myeloma cell lines RPMI8226. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 35, 664–666. 2014.
- LI, B.Z et al. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 alpha in RPMI8226 myeloma cells results in reduced tumor growth in nude mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 29, 247–251. 2008.
- LI, P et al. Hematopoietic-derived galectin-3 causes cellular and systemic insulin resistance. *Cell* 167, 973-984.e12. 2016.
- LIU, F.T et al. Galectins in regulation of apoptosis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 705 431–442. 2011.
- LIU, F.T; RABINOVICH, G.A. Galectins as modulators of tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5 29–41. 2005.
- LIU Y, Liu Z, Fu Q, Wang Z, Fu H, Liu W, Wang Y, Xu J: Galectin-9 as a prognostic and predictive biomarker in bladder urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 2017;10.1016/j.urolonc.2017.02.008
- LOKHORST, H.M et al. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *The New England journal of medicine*. 373:1207–1219. 2015.
- LOMAS OC, TAHRI S, GHOBRIAL IM. The microenvironment in myeloma. *Curr Opin Oncol*. 2020 Mar;32(2):170-175. doi: 10.1097/CCO.0000000000000615. PMID: 31895122.
- LONIAL, S et al. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2016;387(10027):1551– 1560.
- LONIAL, S et al. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 373(7):621-31. 2015.
- LONIAL, S et al. Single-agent daratumumab in heavily pretreated patients with Multiple Myeloma: An Open-Label, International, Multicentre Phase 2 trial (Sirius). *Lancet*. (15)01120-4. 69. 2016.
- LU G et al. The Myeloma Drug Lenalidomide Promotes the Cereblon-Dependent Destruction of Ikaros Proteins. *Science*. 343:305–309. 2014.
- LUCENA, M.C et al: Epithelial Mesenchymal Transition Induces Aberrant Glycosylation through Hexosamine Biosynthetic Pathway Activation. *J Biol Chem* 291:12917–12929. 2016.

- LUDWIG H, et al. Bendamustine-bortezomib-dexamethasone is an active and well-tolerated regimen in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 123(7):985–991. 2014.
- LUO M et al. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism 308 G/A is not significantly associated with esophageal cancer risk: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2016;7(48):79901-79913.
- MACAULEY, M.S; CROCKER, P.R; PAULSON, J.C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat. Rev. Immunol*. 14 653–666. 2014.
- MAES, K et al. In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenic protein 2. *Blood*. 116(18): 3635- 44. 2010.
- MARTH, J.D; GREWAL, P.K. Mammalian glycosylation in immunity. *Nat. Rev. Immunol*.874–887.2008.
- MARTIN SK et al.The emerging role of hypoxia, HIF-1 and HIF-2 in multiple myeloma. *Leukemia*. 25:1533–1542. 2011.
- MATARRESE P et al. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)- mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J Biol Chem*. 280(8):6969-6985. 2005.
- MATEOS, M.V et al. Sequential vs alternating administration of VMP and Rd in elderly patients with newly diagnosed MM. *Blood*. 127(4):420–425. 2016.
- MAYORAL M.A, et al. Identification of galectin-3 and mucin-type *O*-glycans in breast cancer and its metastasis to brain. *Cancer Investig*. 26:615–623. 2008.
- MCCARTHY, P.L, HAHN, T. Strategies for induction, autologous hematopoietic stem cell transplantation, consolidation, and maintenance for transplantation-eligible multiple myeloma patients. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013:496-503. 2013.
- MELTON, L.J 3rd et al. Fracture risk with multiple myeloma: a population-based study. *J Bone Miner Res*. 20: 487–493. 2005.
- MENKHORST E.M et al. Galectin-7 acts as an adhesion molecule during implantation and increased expression is associated with miscarriage. *Placenta*. 2014;35:195–201. doi: 10.1016/j.placenta.2014.01.004.
- MIKHAEL, J.R et al. Phase Ib/II trial of CYKLONE (cyclophosphamide, carfilzomib, thalidomide and dexamethasone) for newly diagnosed myeloma. *Br J Haematol*. 169(2):219– 227. 2015.
- MIRANDOLA, L et al. Galectin-3C inhibits tumor growth and increases the anticancer activity of bortezomib in a murine model of human multiple myeloma. *PLoS ONE*. 6, e21811. 2011.
- MOHAMMED TO, Chagan-Yasutan H, Ashino Y, Nakayama W, Takahashi Y, Shimomura T, Fujimoto T, Watanabe Y, Niki T, Suzushima H, Hattori T. Galectin-9 as a Predictive Marker for the Onset of Immune-Related Adverse Effects Associated with Anti-CCR4 MoAb Therapy in Patients with Adult T Cell Leukemia. *Tohoku J Exp Med*. 2017 Mar;241(3):201-208. doi: 10.1620/tjem.241.201. PMID: 28321034.

- MOHTY, M et al. Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 49(7):865-72. 2014.
- MOISAN S, et al. Upregulation of galectin-7 in murine lymphoma cells is associated with progression toward an aggressive phenotype. *Leukemia.* 17:751–759. 2003.
- MONNEAU, Y; ARENZANA-SEISDEDOS, F; LORTAT-JACOB, H: The sweet spot: how GAGs help chemokines guide migrating cells. *J Leukoc Biol.* 99:1–19. 2016.
- MOREAU, P et al. Bortezomib plus dexamethasone versus reduced-dose bortezomib, thalidomide plus dexamethasone as induction treatment before autologous stem cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 118(22):5752–5758. quiz 5982. 2011.
- MOREAU, P et al. TOURMALINE-MM1 Study Group. Oral ixazomib, lenalidomide, and dexamethasone for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 374(17):1621–1634. 2016.
- MORGAN, G.J et al. NCRI Haematological Oncology Study Group. Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone (CTD) as initial therapy for patients with multiple myeloma unsuitable for autologous transplantation. *Blood.* 118(5):1231–1238. 2011.
- MORGAN, M.R; HUMPHRIES M.J; BASS, M.D. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:957–969. 2007.
- MUNKLEY, J; ELLIOTT, D.J: Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* 7:35478– 35489. 2016.
- NAGAE, M; YAMAGUCHI, Y. Sugar recognition and protein-protein interaction of mammalian lectins conferring diverse functions. *Curr Opin Struct Biol.* 2015;34:108-115.
- OBERG, C.T; LEFFLER, H; NILSSON, U.J. Inhibition of galectins with small molecules. *Chimia (Aarau).* 65 18–23.2011.
- Observatório de Oncologia. Os Desafios do Mieloma Múltiplo no Brasil. Disponível em:
<<https://observatoriodeoncologia.com.br/os-desafios-do-mieloma-multiplo-no-brasil/>> acesso em 07 de agosto as 17:45.
- OHUE Y, Kurose K, Nozawa R, Isobe M, Nishio Y, Tanaka T, Doki Y, Hori T, Fukuoka J, Oka M, Nakayama E: Survival of Lung Adenocarcinoma Patients Predicted from Expression of PD-L1, Galectin-9, and XAGE1 (GAGED2a) on Tumor Cells and Tumor-Infiltrating T Cells. *Cancer Immunol Res* 2016;4:1049-1060.
- OUYANG J et al. Galectin-1 serum levels reflect tumor burden and adverse clinical features in classical Hodgkin lymphoma. *Blood.* 121(17):3431-3433. 2013.
- PALUMBO, A et al. International Myeloma Working Group consensus statement for the management, treatment, and supportive care of patients with myeloma not eligible for standard autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol.* 32(6):587-600. , 2014.

- PALUMBO, A, et al. CASTOR Investigators. Daratumumab, bortezomib and dexamethasone for multiple myeloma: CASTOR study. *N Engl J Med.* 375(8):754–766. 2016.
- PALUMBO, A; ANDERSON, K. Multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 364, 1046–1060. 2011.
- PANARONI C, Yee AJ, Raje NS. Myeloma and bone disease. *Curr Osteoporos Rep.* 2017;15(5):483-498.
- PARMAR, K et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 5431–5436. 2007.
- PENA, C et al. Galectins as therapeutic targets for hematological malignancies: a hopeful sweetness. *Ann Transl Med.* 2014.
- PINEDA-ROMAN M et al. VTD combination therapy with bortezomib-thalidomide- dexamethasone is highly effective in advanced and refractory multiple myeloma. *Leukemia.*22(7):1419–1427. 2008.
- PINHO, S.S; REIS, C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 15(9):540-55. 2015.
- PLESNER T et al. Phase 1/2 study of daratumumab, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Blood.* 128(14):1821–1828. 2016.
- POZZI, S et al. Survival of multiple myeloma patients in the era of novel therapies confirms the improvement in patients younger than 75 years: a population-based analysis. *Br J Haematol.* 163: 40–46. 2013.
- PREESHAGUL, I.R; VAN BESIEN, K; MARK, T.M. *Curr Hematol Malig. Controversies in Multiple Myeloma: to Transplant or Not?.* Rep 9: 360. 2014.
- QIAN J, et al. Active vaccination with Dickkopf-1 induces protective and therapeutic antitumor immunity in murine multiple myeloma. *Blood.* 119(1):161-169. 2012.
- QIAO, Z et al. Downregulation of O-linked N-acetylglucosamine transferase by RNA interference decreases MMP9 expression in human esophageal cancer cells. *Oncol Lett* 11:3317–3323. 2016.
- RABINOVICH, G.A.; VIDAL, M. Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr. Opin. Hematol.* 18, 443–451. 2011.
- RABINOVICH, G.A; CROCI, D.O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. *Immunity.*322–335. 36 2012.
- RABINOVICH, GA; TOSCANO, M.A. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 9(5):338-352. 2009.
- RAJAN, A.M; KUMAR, S. New investigational drugs with single-agent activity in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 6(7):e451. 2016.

- RAJKUMAR, S.V et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.*15(12):e538-48, 2014.
- RAJKUMAR, S.V; LARSON, D; KYLE, R.A. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 365:474-475. 8. 2011.
- REECE, D.E et al. Phase I-II trial of oral cyclophosphamide, prednisone and lenalidomide for the treatment of patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Br J Haematol.* 168(1):46–54. 2015.
- REEDER, C.B et al. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial. *Leukemia.* 23(7):1337–1341. 2009.
- REILY C, STEWART TJ, RENFROW MB, NOVAK J. Glycosylation in health and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019 Jun;15(6):346-366.
- Report of the Medical Research Council's Working Party for Therapeutic Trials in Leukemia: Report on the first myelomatosis trial: Part I. Analysis of presenting features of prognostic importance. *Br J Haematol* 24:123-139, 1973.
- RICHARDSON P.G, et al. Multicenter, phase I, dose-escalation trial of lenalidomide plus bortezomib for relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol.*27(34):5713–5719. 2009.
- RICHARDSON, P.G et al. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.*116(5):679–686. 2010.
- RICHARDSON, P.G et al. Phase 1 study of marizomib in relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: NPI-0052-101 Part 1. *Blood.* 127(22):2693– 2700. 2016.
- ROODMAN, G.D. Pathogenesis of myeloma bone disease. *Leukemia.* 23, 435–441. 2009.
- ROODMAN, G.D. Targeting the bone microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Metab.* 28:244–250. 2010.
- ROSEBECK S et al. Synergistic myeloma cell death via novel intracellular activation of caspase-10-dependent apoptosis by carfilzomib and selinexor. *Mol Cancer Ther.* 15(1):60–71. 2016.
- RUVOLO PP. Galectin 3 as a guardian of the tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta.* 1863(3):427-437. 2016.
- SAAD F, Lipton A, Cook R, Chen YM, Smith M, Coleman R. Pathologic fractures correlate with reduced survival in patients with malignant bone disease. *Cancer.* 2007;110(8):1860-1867.
- SAMURA B. Galectin-3 as a predictor of statin treatment efficacy in patients with multiple myeloma. *Georgian med news.* jun;(255):56-61.2016.
- SAN MIGUEL, J et al. Pomalidomide plus low-dose dexamethasone versus high-dose dexamethasone alone for patients with relapsed and refractory multiple

myeloma (MM-003): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 14(11):1055–1066. 2013.

SAN-MIGUEL, J.F et al. Overall survival of patients with relapsed multiple myeloma treated with panobinostat or placebo plus bortezomib and dexamethasone (the PANORAMA 1 trial): a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2016.

SEIFERT AM, Reiche C, Heiduk M, Tannert A, Meinecke AC, Baier S, von Renesse J, Kahlert C, Distler M, Welsch T, Reissfelder C, Aust DE, Miller G, Weitz J, Seifert L. Detection of pancreatic ductal adenocarcinoma with galectin-9 serum levels. *Oncogene.* 2020 Apr;39(15):3102-3113. doi: 10.1038/s41388-020-1186-7. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32055023; PMCID: PMC7142017.18

SEIFERT M, Scholtysik R, Kuppers R. Origin and pathogenesis of B cell lymphomas. *Methods Mol Biol.* 971:1-25, 2013.

SIDERAS K, de Man RA, Harrington SM, Polak WG, Zhou G, Schutz HM, Pedroza-Gonzalez A, Biermann K, Mancham S, Hansen BE, Bart Takkenberg R, van Vuuren AJ, Pan Q, Ijzermans JNM, Sleijfer S, Sprengers D, Dong H, Kwekkeboom J, Bruno MJ. Circulating levels of PD-L1 and Galectin-9 are associated with patient survival in surgically treated Hepatocellular Carcinoma independent of their intra-tumoral expression levels. *Sci Rep.* 2019 Jul 23;9(1):10677. doi: 10.1038/s41598-019-47235-z. PMID: 31337865; PMCID: PMC6650499.

SUN XF, DAI SY. The Significance of Galectin-1 and Galectin-9 Expression in Endometrial Carcinoma. *Gynecol Obstet Invest.* 2020;85(1):34-40. doi: 10.1159/000502787. Epub 2019 Sep 5. PMID: 31487707.

SCHULMAN KL, Kohles J. Economic burden of metastatic bone disease in the U.S. *Cancer.* 2007;109(11):2334-2342.

SEGARRA, M et al. Dual function of focal adhesion kinase in regulating integrin-induced MMP-2 and MMP-9 release by human T lymphoid cells. *Faseb J.* 19(13):1875–1877. 2005.

SHARMA, S et al, Involvement of hepcidin in anemia of multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 14: 3262-7. 3. 2008.

SHETA, R, et al. A metabolic labeling approach for glycoproteomic analysis reveals altered glycoprotein expression upon GALNT3 knockdown in ovarian cancer cells. *J Proteomics.* 145:91–102. 2016.

SHIPMAN, C.M; CROUCHER, P.I. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res.* 63:912–916. 2003.

SIEGEL, D.S et al. A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 120(14):2817–2825. 2012.

SIEGEL, R.L et al. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64:9-29. 2014.

SIEGEL, R.L et al. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 66:7–30.2016.

- SIEGEL, R.L; MILLER, K.D; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* Jan;68(1):7-30. 2018.
- SILSIRIVANIT A. Glycosylation markers in cancer. *Adv Clin Chem.* 2019;89:189-213. doi: 10.1016/bs.acc.2018.12.005. Epub 2019 Jan 17
- SONNEVELD, P et al. Phase 2 study of carfilzomib, thalidomide, and dexamethasone as induction/consolidation therapy for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 125(3):449– 456. 2015.
- SPAAN I et al. Wnt signaling in multiple myeloma: a central player in disease with therapeutic potential. *J Hematol Oncol.* May 18;11(1):67. 2018.
- STAROSSOM, S.C et al. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity.* 37, 249–263. 2012.
- STEWART, A.K et al. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 372(2):142-52. 2015.
- STEWART, A.K et al. Melphalan, prednisone and thalidomide versus melphalan, prednisone and lenalidomide (ECOG: E1A06) in untreated multiple myeloma. *Blood.* 126(11):1294– 1301. 2015.
- STORTI P et al. Galectin-1 suppression delineates a new strategy to inhibit myeloma-induced angiogenesis and tumoral growth in vivo. *Leukemia.* 30(12):2351-2363. 2016.
- STREETLY M.J et al. GCS-100, a novel galectin-3 antagonist, modulates MCL-1, NOXA, and cell cycle to induce myeloma cell death. *Blood.* 2010;115(19):3939-3948.
- SUZUKI O, ABE M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol.* 44(5):1433-1442. 2014.
- SUZUKI O, ABE M. Galectin-1-mediated cell adhesion, invasion and cell death in human anaplastic large cell lymphoma: regulatory roles of cell surface glycans. *Int J Oncol.* 44(5):1433-1442. 2014.
- SWERDLOW, S.H et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2008.
- TAGHILOO S et al. Upregulation of Galectin-9 and PD-L1 immune checkpoints molecules in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(8):2269- 2274.
- TALMADGE, J.E; FIDLER, I.J. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res.* 70(14):5649-69. 2010.
- TANG CH et al. Epidemiology of multiple myeloma in Taiwan, a population based study. *Cancer Epidemiol.* 2018 Aug;55:136-141. doi: 10.1016/j.canep.2018.06.003. Epub 2018 Jun 26. 2018

- TERRIS B et al. Characterization of gene expression profiles in intraductal papillary- mucinous tumors of the pancreas. *Am. J. Pathol.* 160:1745–1754. 2002.
- TIAN E, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 349:2483–2494. 2003.
- TSAI, C.M. et al. Galectin-1 and galectin-8 have redundant roles in promoting plasma cell formation. *J. Immunol.* 187, 1643–1652. 2011.
- VACCA A, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase–2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood.*93, 3064–3073. 1999.
- VALASTYAN, S; WEINBERG, R.A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 147(2):275-92. 2011.
- VALKENBURG KC, et al. A simple selection-free method for detecting disseminated tumor cells (DTCs) in murine bone marrow. *Oncotarget.* 7:69794–803. 2016.
- VARKI, A; KANNAGI R; TOOLE, B.P. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A,
- VARKI, R.D et al. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015.
- VASTA, G.R. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Advances in experimental medicine and biology.* 946:21-36. 2012.
- WANG Y, Sun J, Ma C, Gao W, Song B, Xue H, Chen W, Chen X, Zhang Y, Shao Q,
- WANG Q, Zhao L, Liu J, Wang X, Wang H, Zhang Y, Yang M, Qu X: Reduced Expression of Galectin-9 Contributes to a Poor Outcome in ColonCancer by Inhibiting NK Cell Chemotaxis Partially through the Rho/ROCK1 Signaling Pathway. *PLoS One*2016;11:e0152599.
- WANG K, Chen Z, Wu R, Yin J, Fan M, Xu X: Prognostic Role of High Gal-9 Expression in Solid Tumors: a Meta-Analysis. *Cell Physiol Biochem* 2018; 45: 993-1002.
- WANG J, Zheng Y, Tu C, Zhang H, Vanderkerken K, Menu E, Liu J. Identification of the immune checkpoint signature of multiple myeloma using mass cytometry-based single-cell analysis. *Clin Transl Immunology.* 2020 Apr 29;9(5):e01132. doi: 10.1002/cti2.1132. PMID: 32355560; PMCID: PMC7190397.
- WDOWIAK K, Gallego-Colon E, Francuz T, Czajka-Francuz P, Ruiz-Agamez N, Kubeczko M, Grochoła I, Wybraniec MT, Chudek J, Wojnar J. Increased serum levels of Galectin-9 in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett.* 2019 Jan;17(1):1019-1029. doi: 10.3892/ol.2018.9656. Epub 2018 Nov 1. PMID: 30655861; PMCID: PMC6313089.
- WEBER, D.M et al. Multiple Myeloma (009) Study Investigators. Lenalidomide plus

dexamethasone for relapsed multiple myeloma in North America. *N Engl J Med.*357(21):2133–2142. 2007.

WELLS, V; MALLUCCI, L. “Identification of an autocrine negative growth factor: mouse β -galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator”. *Cell*.

WIEDERSCHAIN, G. Y. *Glycobiology: progress, problems, and perspectives. Biochemistry (Mosc).* v. 78, n. 7, p. 679-96, Jul 2013.

WILLAN JOHN et al. Multiple myeloma in the very elderly patient: challenges and solutions. *Clin Interv Aging.* 11: 423–435.. 2016.

WU, J et al. Characterization of site-specific glycosylation of secreted proteins associated with multi-drug resistance of gastric cancer. *Oncotarget.*7:25315–25327. 2016.

XU L, Liu W, Fu Q, Liu H, Zhang W, Xu J: Galectin-9 predicts postoperative recurrence and survival of patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2015;36:5791-5799.

YANG, R., Sun, L., Li, CF. et al. Galectin-9 interacts with PD-1 and TIM-3 to regulate T cell death and is a target for cancer immunotherapy. *Nat Commun* 12, 832 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21099-2>

YANG H, Xie T, Li D, Du X, Wang T, Li C, Song X, Xu L, Yi F, Liang X, Gao L, Yang X, Ma C. Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF- κ B/TNF- α pathway. *Mol Metab.* 2019 May;23:24-36. doi: 10.1016/j.molmet.2019.02.007. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30862474; PMCID: PMC6479760.

YANG, R.Y; RABINOVICH, G.A; LIU, F.T. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert. Rev. Mol. Med.* 10 e17. 2008.

YANG J. et al. Role of downregulation of galectin-9 in the tumorigenesis of gastric cancer. *Int. J. Oncol.* 45:1313–1320. 2014.

YASINSKA IM, Sakhnevych SS, Pavlova L, Teo Hansen Selnø A, Teuscher Abeleira AM, Benlaouer O, Gonçalves Silva I, Mosimann M, Varani L, Bardelli M, Hussain R, Siligardi G, Cholewa D, Berger SM, Gibbs BF, Ushkaryov YA, Fasler-Kan E, Klenova E, Sumbayev VV. The Tim-3-Galectin-9 Pathway and Its Regulatory Mechanisms in Human Breast Cancer. *Front Immunol.* 2019 Jul 11;10:1594. doi: 10.3389/fimmu.2019.01594. PMID: 31354733; PMCID: PMC6637653.

YUAN F, Ming H, Wang Y, Yang Y, Yi L, Li T, Ma H, Tong L, Zhang L, Liu P, Li J, Lin Y, Yu S, Ren B, Yang X. Molecular and clinical characterization of Galectin-9 in glioma through 1,027 samples. *J Cell Physiol.* 2020 May;235(5):4326-4334. doi: 10.1002/jcp.29309. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31609000; PMCID: PMC7028024.

YACCOBY S et al. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood.* 109:2106–2111. 119. 2007.

YACCOBY, S. Advances in the understanding of myeloma bone disease and tumour

growth. *Br J Haematol.* 149:311-21. 2010.

YAMAMOTO-SUGITANI M et al. Galectin-3 (Gal-3) induced by leukemia microenvironment promotes drug resistance and bone marrow lodgment in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108(42):17468-17473. 2011.

YUI, J.C et al. Proteasome inhibitor associated thrombotic microangiopathy. *Am J Hematol.* 91(9):E348–E352. 2016.

ZHANG ZY, Dong JH, Chen YW, Wang XQ, Li CH, Wang J, Wang GQ, Li HL, Wang XD: Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012;13:2503-2509.

ZHOU X, Sun L, Jing D, Xu G, Zhang J, Lin L, Zhao J, Yao Z, Lin H. Galectin-9 Expression Predicts Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol.* 2018 Apr 26;9:452. doi: 10.3389/fphys.2018.00452. PMID: 29765332; PMCID: PMC5939667.

ZAGOURI, F et al. Emerging antibodies for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 21(2):225–237. 2016. 2016.

ZARBOCK, A et al. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood.* 118 6743–6751. 2011.

ZHANG Z.Y et al. Galectin-9 acts as a prognostic factor with antimetastatic potential in hepatocellular carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2012;13:2503–2509.

ZHOU Q et al. Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD81 T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 117(17):4501- 4510. 2011.

ZHOU, X et al. Galectin-9 Expression Predicts Favorable Clinical Outcome in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Physiol.* 9: 452. 2018.

ZHU, C et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1245–1252. 2005.

ANEXO A- FORMULARIO DE PESQUISA PARA COLETA DE DADOS CLÍNICOS

FICHA CLÍNICA DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

Nome completo: _____

Idade ao diagnóstico: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Sexo: ____ [Legenda: 1=masculino 2= feminino]

Faixa etária: _____ [Legenda: 1=20 a 30; 2= 31-40; 3=41-50; 4=51-60; 5=61-70; 6=71-80; 7=acima de 81 anos]

Hospital de origem: _____ [Legenda: 1-HCP; 2=HEMOPE; 3=HUOC; 4= IMIP; 5= outros]

Raça: _____ [Legenda: 1=branca; 2=negra; 3=parda; 4= asiático; 5=indígena]

Tempo do início dos sintomas até a primeira consulta com especialista: _____ (em meses)

Data de entrada: ____/____/____ data do diagnóstico: ____/____/____

Início do tratamento: ____/____/____ fim do tratamento: ____/____/____

Estadiamento Durie-Salmon: _____ ISS: _____

Protocolo de tratamento utilizado: 1ª linha: _____ 2ª linha: _____ 3ª linha: _____

Legenda: 1= MPT ; 2= CTD; 3= CYBORD; 4=M/Dexa/Tal; 5= DEXA ISOLADA; 6=PAD; 7= OUTROS

Data da resposta : ____/____/____

Resposta (IMWG) : _____ [Legenda: 1=resposta completa 2= VGPR – Resposta parcial muito boa 3= resposta parcial 4= doença estável 5= doença progressiva]

Manifestações clínicas ao diagnóstico

	SIM	NÃO
-Alteração da função renal		
-Hipercalcemia		
-Anemia		
-Trombocitemia		
-Leucopenia		
-Dor óssea		
-Infecções de repetição		
-Fratura patológica		
-Plasmocitoma		
-Fraqueza		
-Febre		
-Perda de peso		
-Sangramento		
-Outras		

Escala de lesões ósseas ao raio X: _____ [legenda: 1= osso normal; 2= osteopenia/osteoporose; 3= lesões osteolíticas ; 4= fraturas patológicas]

Ressonância OU tomografias: _____ [legenda: 1= positivo – presença de lesões líticas 2= ausência]

Ecocardiograma: _____ [legenda: 1= amiloidose sim 2= amiloidose não]

Insuficiência renal dialítica: _____ [legenda: 1= sim 2= não]

Exames laboratoriais

Exames	pré tratamento Data: ___/___/___	Pós tratamento: reavaliação Data: ___/___/___
Glicose		
Ureia (g/dl)		
Creatinina (g/dl)		
Cálcio (g/dl)		
Proteínas totais		
Albumina (g/dl)		
Globulina		
Desidrogenase láctica (DHL)		
VHS		
Eletroforese proteínas séricas		
Fração albumina (g/dl)		
Fração alfa 1-globulina (g/dl)		
Fração alfa 2- globulina (g/dl)		
Fração beta-globulina (g/dl)		
Fração gama- globulina (g/dl)		
IgG (g/dl)		
IgM (g/dl)		
IgA (g/dl)		
Kappa		
Lambda		
Beta 2 microglobulina (mg/L)		
Imunofixação sérica		
TP (tempo de protrombina)/INR		
TTPa (tempo de tromboplastina		
fibrinogênio		
Hemoglobina (g/dl)		
Hematócrito (%)		
Leucócitos /ml		
Segmentados (%) e absoluto		
Linfócitos (%) e absoluto		
Monócitos (%) e absoluto		
Eosinófilos (%) e absoluto		
Plaquetas (unid/mm ³)		
Número de plasmócitos no mielograma		
Bence Jones na urina (g/24hs)		
Imunofixação urinária		

ANEXO B – SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER-SPCC**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Título da Pesquisa: Galectinas no mieloma múltiplo: Avaliação da sua utilização como biomarcador e alvo terapêutico

Pesquisador: LIDIANE VASCONCELOS DO NASCIMENTO CARVALHO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 67445717.3.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.177.317

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo retrospectivo e prospectivo, exploratório e translacional.

Objetivo da Pesquisa:

Geral

Avaliar os níveis de expressão de galectinas no Mieloma múltiplo e sua utilização como possível biomarcador clínico e alvo terapêutico.

Específicos

- o Investigar a expressão de galectinas presentes em pacientes portadores de mieloma múltiplo;
- o Associar os níveis de expressão das galectinas com os parâmetros clínicos e laboratoriais e indicadores de resposta à terapia dos pacientes;
- o Realizar intervenção na expressão das galectinas e suas consequências funcionais;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RESPOSTA

A pesquisa oferece pequeno risco ao paciente durante a punção para coleta de material biológico podendo o voluntário adquirir infecções locais ou sistêmicas além de hematoma local decorrente da coleta inadequada ou da ausência dos devidos cuidados antes e durante o procedimento. É provável que os resultados advindos desse estudo não tragam nenhum benefício direto ao tratamento desses pacientes, uma vez que se trata de estudo experimental e não haverá qualquer intervenção terapêutica.

A pesquisa não oferece riscos à sociedade. A descoberta de marcadores de diagnóstico e prognóstico poderá oferecer benefícios para populações futuras na escolha da melhor terapia. Os benefícios incluem a possível descoberta de novos marcadores envolvidos no desenvolvimento do MM que poderão ser usados no futuro. Mesmo com todo o cuidado empregado na confidencialidade das informações dos sujeitos da pesquisa, o projeto possui risco mínimo e involuntário do vazamento dessas informações.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A descoberta de marcadores de diagnóstico e prognóstico poderá oferecer benefícios para populações futuras na escolha da melhor terapia. Os benefícios incluem a possível descoberta de novos marcadores envolvidos no desenvolvimento do MM que poderão ser usados no futuro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TODOS PRESENTES E ADEQUADOS

Recomendações:

SEM RECOMENDAÇÕES

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDENCIAS

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO APÓS A REUNIÃO

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos também que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via “Notificação”, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado

APÊNDICE A. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO- CONTROLES

Título: Galectinas no mieloma múltiplo: Avaliação da sua utilização como biomarcador e alvo terapêutico

1) Introdução

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa, o qual será realizado em parceria com outras instituições. Antes de você decidir se deseja ou não participar, é importante que você entenda por que o estudo está sendo realizado e o que ele envolverá se você concordar em participar. Por favor, leia atentamente as informações a seguir e sinta-se a vontade em perguntar.

Quais os objetivos deste estudo?

Os dados coletados nesta pesquisa referentes às entrevistas ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal e na Instituição Hospital do Cancer de Pernambuco (HCP), sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientador, no endereço abaixo informado por período de no mínimo 5 anos.

As amostras de sangue serão analisadas em conjunto com a dos pacientes e não haverá informação que o identifique e apenas os pesquisadores participantes do estudo terão acesso aos seus dados.

1) Riscos e benefícios dos procedimentos para as coletas dos exames

Serão coletados 10 ml de sangue (2 tubos) no momento da aceitação da participação no estudo. Estas coletas são seguras e apresentam baixos riscos, somente dor leve no momento da punção. Caso ocorram sangramentos no local da coleta, será orientado que o senhor(a) comprima com o dedo o local da coleta por 5 minutos que o sangramento cederá, podendo ainda ser feito compressa com gelo no local. Além disto, caso haja a formação de um pequeno hematoma, não é necessária nenhuma medida específica pois o mesmo desaparecerá dentro de no máximo 7 dias.

2) Direitos do Participante

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se assim preferir, sem penalização ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação.

3) Confidencialidade

Apenas a equipe do estudo terá acesso aos seus dados. Seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

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 Cruz Cabugá, 1597 – Santo Amaro, Recife-PE, CEP: 50.040-000, Tel.: (81) 32178197 – e-mail: cep@hcp.org.br**). Horário de funcionamento – segunda a sexta-feira das 8-16 horas. Para qualquer dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se a vontade para entrar em contato com a pesquisadora responsável pela condução do estudo.

Assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, CPF: _____,

abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar deste estudo como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritivos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

Ao assinar este termo de consentimento, não estarei abrindo mão dos meus direitos legais.

Receberei uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Nome Completo do Controle Voluntário da Pesquisa

Assinatura do Paciente de Pesquisa

____/____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo de Consentimento

____/____/_____
Data

APÊNDICE B. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTE
Título: Galectinas no mieloma múltiplo: Avaliação da sua utilização como biomarcador e alvo terapêutico

1) Introdução

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa, o qual será realizado em parceria com outras instituições. Antes de você decidir se deseja ou não participar, é importante que você entenda por que o estudo está sendo realizado e o que ele envolverá se você concordar em participar. Por favor, leia atentamente as informações a seguir e sinta-se a vontade em perguntar.

2) Quais os objetivos deste estudo

O projeto possui três objetivos principais:

- 1) Investigar a expressão de moléculas presentes em amostras de sangue e da medula óssea em pacientes portadores de mieloma múltiplo;
- 2) Revisão de biópsias de medula óssea e realização de imunohistoquímica e revisão morfológica por um patologista com experiência em patologia hematológica, para avaliar células e moléculas que tentam definir o comportamento do mieloma múltiplo;
- 3) Correlacionar os achados com os aspectos clínicos, laboratoriais e indicadores de resposta à terapia, obtidos através de um questionário médico com informações que serão pesquisadas e retiradas do seu prontuário.

Os dados coletados nesta pesquisa referentes às entrevistas ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal e na Instituição Hospital do Cancer de Pernambuco (HCP), sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientador, no endereço abaixo informado por período de no mínimo 5 anos.

As amostras de biópsias, lâminas e blocos de parafina (sobras do material utilizado para o diagnóstico) serão enviadas para o Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas/UFPE, para avaliação das moléculas. O excedente será devolvido para ser arquivado no setor de Patologia do HCP.

Não haverá informação que o identifique e apenas os médicos participantes do estudo terão acesso aos seus dados. Os exames laboratoriais que serão anotados pela pesquisa, serão consultados no seu prontuário médico e são os mesmos já realizados de rotina pelo seu médico.

3) Riscos e benefícios dos procedimentos para as coletas dos exames

Serão coletados 10 ml de sangue (2 tubos) no momento da aceitação da participação no estudo e mais 5 ml de amostra de medula óssea, pelo médico que já estiver realizando o seu exame mielograma. Sempre

que possível, coletaremos as amostras de sangue no mesmo momento de coleta de exames laboratoriais de rotina pelo laboratório da instituição.

Estas coletas são seguras e apresentam baixos riscos, somente dor leve no momento da punção. Caso ocorram sangramentos no local da coleta, será orientado que o senhor(a) comprima com o dedo o local da coleta por 5 minutos que o sangramento cederá, podendo ainda ser feito compressa com gelo no local. Além disto, caso haja a formação de um pequeno hematoma, não é necessária nenhuma medida específica, pois o mesmo desaparecerá dentro de no máximo 7 dias.

O exame de mielograma, também é um exame seguro e já faz parte de seus exames obrigatórios para diagnóstico e seguimento do mieloma múltiplo. A biópsia de medula óssea, será realizada conforme protocolo da instituição e será sempre coletada por um médico hematologista. De todos é o procedimento de maior risco, podendo causar dor no momento da coleta, sangramento leve e raramente, infecções. Qualquer anormalidade deverá ser comunicada imediatamente ao médico assistente que o acompanhe.

É importante frisar que todos os testes realizados já fazem parte da rotina de investigação e seguimento de sua doença e apenas coletaremos uma quantidade um pouco maior para o estudo. É provável que as informações advindas do estudo, não tragam um benefício direto ao seu tratamento, uma vez que se trata de estudo experimental e não haverá qualquer intervenção terapêutica pelo estudo.

4) Direitos do Participante

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se o assim preferir, sem penalização ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação. Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal.

5) Confidencialidade

Apenas a equipe do estudo terá acesso aos seus dados. Seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

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 Cruz Cabugá, 1597 – Santo Amaro, Recife-PE, CEP: 50.040-000, Tel.: (81) 32178197 – e-mail: cep@hcp.org.br**).
Horário de funcionamento – segunda a sexta-feira das 8-16 horas.

Para qualquer dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se a vontade para entrar em contato com a responsável pela condução do estudo.

Assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar deste estudo como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento).

Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritivos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

Ao assinar este termo de consentimento, não estarei abrindo mão dos meus direitos legais. Receberei uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome Completo do Paciente de Pesquisa

Assinatura do Paciente de Pesquisa

____/____/_____
 Data

 Nome Representante Legal e relação do Representante Legal com o paciente

 Assinatura do Representante Legal

____/____/_____
 Data

 Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo de Consentimento

____/____/_____
 Data

Impressão Digital
 (opcional)

APENDICE C. ARTIGO EVALUATION OF IL-33 E IL-34 EM PLASMA DE PACIENTES COM MM.

JIR-2020-0100-ver9-Carvalho_1P

Type: letter

JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH
Volume 40, Number 11, 2020
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/jir.2020.0100

LETTER TO THE EDITOR

Evaluation of IL-33 and IL-34 Plasma Levels in a Cohort of Multiple Myeloma Patients in Northeast Brazil

Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho,¹ Reijane Alves Assis,²
Maira Galdino da Rocha Pitta,¹ and Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo¹

To the Editor:

MULTIPLE MYELOMA (MM) is the second most hematological clonal neoplasm in the world, characterized by accumulation of plasma cells in the bone marrow (BM), leading to angiogenesis, osteolysis, immunosuppression, and anemia (Wang and others 2016). MM patients present several deficits of humoral immunity, immunoparesis, and alterations in the activity and secretion of cytokines, the latter being central mediators between the inflammatory tumor microenvironment cells. Interleukin-33 (IL-33) is a member of the IL-1 family that is expressed consistently by endothelial and epithelial cells. Most of the current studies on the multiple roles in cancers focus on tumor microenvironment, tumorigenesis, and tumor-associated inflammatory responses. Interleukin-34 (IL-34) is a hematopoietic cytokine that acts as a key regulator for the survival, proliferation, and differentiation of myeloid lineage cells, including monocytes, macrophages, and osteoclasts (Chen and others 2013). This study analyzed the plasma expression levels of both in 46 patients with MM compared with healthy individuals and their possible association with clinical, laboratory, and disease severity data.

After obtaining written consent, samples were collected from 46 patients with confirmed diagnoses of MM from the hematology service of the Hospital de Câncer de Pernambuco (Recife, Brazil). In addition, 31 individuals paired by sex and age were also included as controls. The concentration of IL-33 and IL-34 in the plasma was made by the sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique using the R&D systems kit, following the manufacturer's instructions. Absorbance reading was performed using the Human Reader HS plate reader. The analysis was performed using GraphPad Prism software and the concentrations are expressed in pg/mL. The minimum detection limits for IL-33 and IL-34 were 23.43 and 31.25 pg/mL, respectively. None of the patients received any antineoplastic therapy before sample collection.

In our cohort of patients, there was a predominance of males (54.3%; 25/47). The median age of the patients was

61.5 years. The interval in months between the appearance of any symptom and the diagnosis ranged from 1 to 36 months, with a median of 7 months. The most frequently reported symptom was bone pain, followed by weakness (84.4%). Pathological fractures were already present in 57.8% of the patients. The report of repeated infections was present in 22.7% of the cases and 43.2% reported weight loss.

Of the 46 study group samples analyzed, only 8 (17.4%) had detectable levels of IL-33 [23.43 (23.43–1500) pg/mL], whereas in the control samples 10 (32.2%) were positive [23.43 (23.43–1500) pg/mL]. For IL-34 [31.25 (31.25–3125) pg/mL], 5 samples were positive in the MM group (10.8%) and 4 in the control group (12.9%) [31.25 (31.25–679.50) pg/mL]. There was no statistically significant difference between the groups for any of the cytokines tested ($P=0.1362$ and $P=0.5942$), Fig. 1. In addition, no relationship was found between expression levels of IL-33 and IL-34 with tumor load, and clinical and laboratory parameters.

To date, our study has been the only one to relate the plasma levels of the IL-33 and IL-34 proteins in a Brazilian cohort of MM. IL-34 is a newly discovered cytokine that acts as a colony-1 stimulatory factor-1 receptor (CSF-1) ligand and can replace CSF-1 by osteoclast differentiation. In the recent study conducted by Baghdadi and others (2017; 2019), was described as an osteoclastogenic cytokine that accelerates osteolytic disease in MM, being expressed in the murine cell line. Its expression was increased by stimulation with proinflammatory cytokines or by BM stromal cells. In addition, IL-34 derived from MM cells promoted the formation of osteoclasts from mouse BM cells *in vitro*. This expression, however, may be strictly microenvironmental and may not be reflected at the plasma level in patients. The IL-33 cytokine directs Th2-type responses, its reduced plasma levels in patients may explain the reduction in the T response observed in MM [6]. In the study conducted by Musolino and others, a significant difference was found between IL-33 in patients with MM and monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), which may indicate that, during the transition from a benign condition, such as MGUS, to MM, the deficiency in cytokine secretion

¹Research Center for Therapeutic Innovation (NUPIT-SG), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Hematology Service of the Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife, Brazil.

2

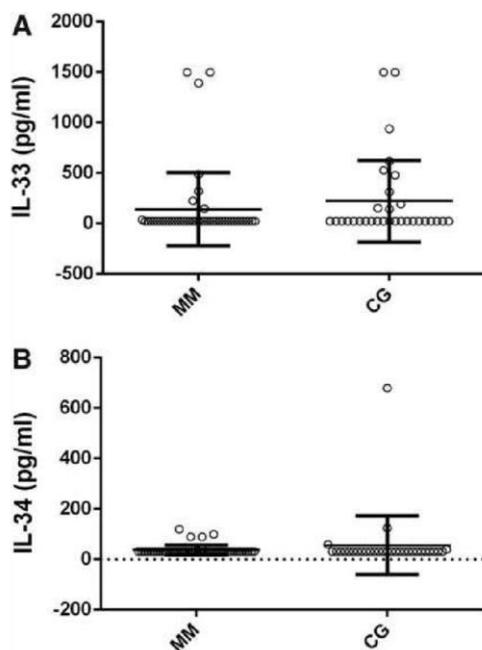


FIG. 1. Plasma levels of (A) IL-33 and (B) IL-34 from patients diagnosed with MM compared with healthy controls ($P=0.1362$ and $P=0.5942$). MM indicates plasma from patients with MM and CG indicates plasma from healthy controls. IL, interleukin; MM, multiple myeloma.

progressively worsens, leading to a greater immunological imbalance and may participate in the beginning of the disease (Musolino and others 2013). It is important to emphasize that our study used samples of patients without any previous therapy, whereas the referred study used samples of patients with only 7 days without treatment. This study may contribute to a better understanding of the immune changes present in patients with MM as well as suggesting ways to direct the treatment based on the immune characteristics of their microenvironment.

LETTER TO THE EDITOR

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Funding Information

This study was supported by CNPq and FACEPE.

References

- Baghdadi M, Ishikawa K, Nakanishi S, Murata T, Umeyama Y, Kobayashi T, Kameda Y, Endo H, Wada H, Bogen B, Yamamoto S, Yamaguchi K, Kasahara I, Iwasaki H, Takahata M, Ibata M, Takahashi S, Goto H, Teshima T, Seino KI. 2019. A role for IL-34 in osteolytic disease of multiple myeloma. *Blood Adv* 3(4):541–551.
- Baghdadi M, Endo H, Tanaka Y, Wada H, Seino KI. 2017. Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications. *Cytokine* 99:139–147.
- Chen Z, Buki K, Vääräniemi J, Gu G, Väänänen K. 2013. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. *PLoS One* 6(4): e18689.
- Musolino C, Allegra A, Profita M, Alonci A, Saitta S, Russo S, Bonanno A, Innao V, Gangemi S. 2013. Reduced IL-33 plasma levels in multiple myeloma patients are associated with more advanced stage of disease. *Br J Haematol* 160(5): 709–710.
- Wang J, Faict S, Maes K, De Bruyne E, Van Valckenborgh E, Schots R, Vanderkerken K, Menu E. 2016. Extracellular vesicle cross-talk in the bone marrow microenvironment: implications in multiple myeloma. *Oncotarget* 7(25):38927–38945.

Address correspondence to:

Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo
 Cidade Universitária
 UFPE Cidade Universitária
 Av. Prof. Moraes Rego, s/n
 Recife 50670-901
 Pernambuco
 Brazil

E-mail: moacyr.rego@gmail.com

Received 18 June 2020/Accepted 6 October 2020

APENDICE D ESTRATÉGIA DE GATE

