

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica
Faculdade de Medicina

PRISCILLA ALVES MASCARENHAS SEGGES

**ANÁLISE DO *STATUS* GENÔMICO DOS GENES *TRAF3*,
BIRC2, *BIRC3* E *CYLD* NO MIELOMA MÚLTIPLO**

Rio de Janeiro
Junho 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PRISCILLA ALVES MASCARENHAS SEGGES

**ANÁLISE DO *STATUS* GENÔMICO DOS GENES *TRAF3*,
BIRC2, *BIRC3* E *CYLD* NO MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Orientadores: Dr. Angelo Maiolino
Dra. Ilana Zalcborg

Rio de Janeiro
Junho 2010

Segges, Priscilla

Análise do status genômico dos genes TRAF3, BIRC2, BIRC3 e CYLD no Mieloma Múltiplo/ Priscilla Alves M Segges - Rio de Janeiro:UFRJ / Faculdade de Medicina, 2010.

x, 112 f. : il. ; 31 cm.

Orientadores: Angelo Maiolino e Ilana Zalcborg

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, 2010.

Referências bibliográficas: f. 82-91

1. Mieloma múltiplo – genética 2. Mieloma múltiplo – hematologia.3. Via NF-kB. 4. TRAF3. 5. FISH. 6. Clínica Médica – *Tese. I. Maiolino, Angelo. II. Zalcborg, Renault Universidade Federal do Rio de Janeiro. Faculdade de Medicina, Programa de Pós-graduação em Clínica Médica. III. Título.*

PRISCILLA ALVES MASCARENHAS SEGGES

**ANÁLISE DO *STATUS* GENÔMICO DOS GENES *TRAF3*,
BIRC2, *BIRC3* E *CYLD* NO MIELOMA MÚLTIPLO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Médica.

Aprovada em de de 2010.

Dra. Márcio Nucci (Presidente)

Dr. Cláudio Gustavo Stefanoff

Dra. Vânia Tietsche de Moraes Hungria

A minha avó Celmia

(em memória)

Agradecimentos:

A Janssen-Cilag Farmacêutica, ao GEMOH, e a FAPERJ pelo financiamento concedido.

Ao Inca pela bolsa cedida.

Ao CEMO pela oportunidade de aprendizado.

À minha orientadora Ilana Zalcborg por me abrir as portas do seu laboratório e confiar no meu trabalho. Pela qualidade profissional e por me conduzir com calma e sabedoria nas diferentes etapas desse trabalho. E por compreender meus momentos de aluna, permitindo que o tempo fluísse e o amadurecimento chegasse, respeitosamente.

Ao meu orientador Angelo Maiolino, pela orientação, oportunidade, confiança e estímulos. Por ser sempre solícito as minhas solicitações e ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiram durante o processo de reflexão.

A Dra. Rocio Hassan sou grata pela amizade e orientação, pela ajuda nos momentos mais críticos, por me ensinar a não desistir e por sempre me incentivar na busca do conhecimento, sendo exemplo de competência, determinação e disciplina. Obrigada por ter acreditado em mim e contribuído para o meu crescimento. Agradeço também pela leitura crítica desse trabalho.

Ao Dr. Esteban Braggio por me “apresentar” o Mieloma, por ser sempre solícito aos meus inúmeros emails, pelo carinho, apoio e ensinamento durante minha estadia na Mayo.

A Dra. Virgínia Pires, pela amizade, pela paciência em me ouvir sempre, pelos inúmeros conselhos e por nunca ter se importado de nossas conversas na copa virarem sempre divãs.

Ao Dr. Gustavo Stefanoff pelo “sim” há 4 anos atrás, por todas as “ajudinhas” e por tornar o cotidiano mais leve graças ao seu entusiasmo, alto astral e boa vontade.

A Dra. Eliana Abdelhay e a equipe do Laboratório de Células Tronco pelo apoio fornecido sempre.

Ao Dr. Rafael Fonseca e ao Scott VanWier por terem gentilmente cedidos os BACs e Fosmídeos utilizados nesse trabalho, pela oportunidade de treinamento e pela ajuda na montagem da técnica usada na confecção das sondas caseiras.

Ao Dr. Martin Bonamino pela oportunidade de utilizar as instalações do Laboratório de Medicina Experimental na realização de parte deste trabalho e aos alunos da Medex (em especial ao Leonardo e a Bianca) por todas as “ajudinhas e galhos quebrados”.

Ao Roberto Magalhães e ao Daniel Mercante pela interação e suporte clínico ao longo do trabalho.

A Sônia Rodrigues por todo o auxílio burocrático ao longo desse trabalho.

A Teresa Gouda, secretária da pós-graduação, por todo o apoio.

A Fernanda e a Telminha pela amizade e pelas oportunas manifestações de encorajamento.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular do CEMO: Carolina, Mário, Vanessa, Yuri, Vitor, Laíde, Marina Lipkin, Luciana, Maria, Elsa. Todos colaboraram de diversas formas durante a realização deste trabalho.

Ao trio: Daniela, Andre e Stephany pela amizade, apoio, incentivo e até pelos papos furados que ajudaram muito nas árduas horas de bancada.

Ao meu companheiro Tiago, por tudo. Por compartilhar de todas as minhas idéias e nunca duvidar das minhas escolhas. Por ter percorrido esta jornada ao meu lado sempre disposto a me ajudar e pelo seu apoio que me conforta e me deixa mais forte para superar meus desafios.

Ao Vladimir pelo ombro amigo e o carinho sempre de pai.

A minha irmã Lauren, por estar sempre presente e compreender minha ausência, principalmente num momento tão especial que é a maternidade.

A minha mãe pela dedicação, amor e compreensão da minha ausência. Por apoiar as minhas escolhas e estar ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e aplaudindo nos momentos de glória.

Ao meu avô, João Henrique, fonte de inspiração, apoio e ensino diário. Pelo seu apoio incondicional na minha jornada e por acreditar nos meus sonhos junto comigo.

Aos pacientes que participaram deste trabalho, pois sem eles nenhuma dessas páginas estaria completa.

Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.
Apenas dê o primeiro passo.
(Martin Luther King)

RESUMO

O Mieloma Múltiplo (MM) é caracterizado pela presença de múltiplas alterações genéticas. Estudos recentes sugerem que alterações na via NF- κ B e particularmente no gene *TRAF3*, representam alvos potencialmente importantes para intervenção terapêutica no MM. Embora exista um conhecimento considerável das principais anormalidades cito - moleculares na doença, os dados a respeito das alterações na via NF- κ B são escassos e pouco elucidados.

Neste trabalho foram analisadas as alterações citogenéticas nos genes *TRAF3*, *BIRC2/3* e *CYLD* por-FISH em 60 pacientes com MM ao diagnóstico. Além disso, foi identificada a região mais comumente deletada no gene *TRAF3* (MDR) através da análise de um banco de dados de aCGH previamente publicado na literatura, contendo 238 pacientes.

Em nosso estudo identificamos uma associação estatisticamente significativa entre t(4;14) e a presença de deleções monoalélicas em *TRAF3*. Além disso, duas MDRs foram identificadas em *TRAF3*. MDR1 que compreende uma região com 37,6 Kb, comum aos eventos de deleção monoalélicas e bialélicas, enquanto MCD2 compreende uma região com 15,5 Kb, detectada apenas na análise de eventos bialélicos. A estratégia de FISH utilizada quando comparada ao aCGH mostrou baixa sensibilidade em detectar deleções bialélicas no gene *TRAF3*.

Este é o segundo trabalho a investigar o status de *TRAF3* em pacientes com MM. Nossos resultados mostraram a baixa sensibilidade do FISH em detectar alterações em *TRAF3* e contribuem no desenvolvimento de uma estratégia de detecção de deleções no gene *TRAF3* mais eficiente, que pode vir a ser utilizada futuramente, na investigação do status de *TRAF3* em pacientes com MM ao diagnóstico.

ABSTRACT

Multiple myeloma (MM) is characterized by the presence of several genetic abnormalities. Recently studies have suggested that abnormalities in NF- κ B pathways, and particularly TRAF3, seem to be potentially important targets for therapeutic intervention in MM. Although abundant data are available on the cytogenetic alterations associated with the disease, abnormalities pathways in NF- κ B are still poorly understood.

The purpose of this study is twofold: to investigate the cytogenetic alterations in *TRAF3*, *BIRC2/3* and *CYLD* genes and identify the most commonly deleted regions (MDR) in *TRAF3*. We studied 68 newly diagnosed MM patients with clg-FISH for screening cytogenetic abnormalities and the MDR was identified in a dataset analyzed by aCGH, previously published in literature, in 238 patients include.

We demonstrated an association between t(4;14) and monoallelic deletions in TRAF3 events. Moreover, two most MDRs were identified in a dataset analyzed by array-based comparative genomic hybridization. MDR1 comprises a 37.6 kb region, which included all biallelic/monoallelic deletion events, while MDR2 comprises a 15.5 Kb region, and included only biallelic deletions. Sensitivity of FISH for detection of biallelic deletion was poor, when compared with the aCGH.

Ours is the second study of *TRAF3* status in MM patients and shows that FISH approach exhibits a low sensitivity to detect biallelic deletions in *TRAF3* gene setting the basis for developing a more efficient FISH strategy that could be useful in future for investigation of *TRAF3* status in MM patients at diagnosis.

ÍNDICE

	Página
Introdução	18
Revisão da Literatura	23
Objetivos	40
Pacientes e Métodos	41
Resultados	54
Discussão	72
Conclusões	81
Referências Bibliográficas	82

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	18
2. Revisão Bibliográfica	23
2.1 Genética e Citogenética do Mieloma Múltiplo.....	23
2.1.2 Alterações cromossômicas com valor prognóstico.....	23
2.1.3 Alterações genéticas estabelecidas ao diagnóstico.....	29
2.2 Alterações na via NF-kB no Mieloma Múltiplo	31
2.2.1 A via NF-kB.....	32
2.2.2 A ativação constitutiva da via NF-kB no MM	35
2.2.3 O gene TRAF3.....	37
2.2.4 Os genes BIRC2 e BIRC3.....	38
2.2.5 O gene CYLD	39
3 Objetivos.....	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 Pacientes e Métodos	41
4.1 Pacientes	41
4.2 Métodos	42
4.2.1 Processamento de amostras.....	42
4.2.2 Separação de células mononucleares	43
4.2.3 Preparação de lâminas por citocentrifugação	43
4.2.4 Hibridização in situ fluorescente (FISH)	43
4.2.5 Preparação de sondas não comerciais	47
4.2.5.1 Extração de BACs e Fosmídeos em larga escala (MaxiPrep)	49
4.2.5.2 Marcação do DNA e preparação das sondas não comerciais.....	48
4.2.6 Avaliação da especificidade das sondas.....	50
4.2.7 Obtenção de Metáfases normais.....	50

4.2.8 Estabelecimento de limiar (cut-off) para análise.....	51
4.2.9 Análise	51
4.2.9.1 Microscopia	52
4.2.10 Análise da região mais comumente deletada no gene TRAF3.....	52
4.2.11 Análise Estatística.....	53
5 Resultados.....	54
5.1 Análise de anormalidades cromossômicas.....	55
5.1.1 Cálculo do valor cut-off	55
5.1.2 Translocações da região 14q32	56
5.1.3 t(4;14)(p16;q32)	57
5.1.4 Deleção da região 13q14.....	58
5.1.5 Deleção da região 17p53.....	58
5.1.6 Deleção no gene TRAF3.....	59
5.1.7 Deleções no genes BIRC2/3 e CYLD.....	61
5.2 Associação entre as diferentes alterações genéticas	64
5.3 Variação genômica intraclonal.....	65
5.4 Análise da região mais comumente deletada (MCDR) do gene TRAF3	67
6 Discussão	72
7 Conclusões.....	81
8 Referências Bibliográficas.....	82
Anexo I. TRAF3 deletions in Multiple Myeloma: considerations about detection.....	92
Anexo II. Protocolo clínico de tratamento.....	103
Anexo III. Aprovação do comitê de ética.....	112

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Esquema das alterações genéticas e sua relação com a progressão da doença	24
Figura 2. Esquema proposto para ativação da via NF-kB no MM	33
Figura 3. Fluxograma do processamento de amostras e posteriores	42
Figura 4. Desenho esquemático das regiões gênicas 14q32, 11q22, 16q12 e 14q24 contendo os genes de interesse e a localização das sondas de FISH utilizadas.....	47
Figura 5. Análise por clg-FISH da translocação 14q32 em pacientes com MM	57
Figura 6. Análise por clg-FISH da t(4;14)(p16;q32) em pacientes com MM.....	58
Figura 7. Análise por clg-FISH da deleção da região 13q14 em pacientes com MM ..	58
Figura 8. Análise por clg-FISH da deleção da região 17p53 em pacientes com MM ..	59
Figura 9. Estratégia de análise por clg-FISH da deleção de <i>TRAF3</i> em pacientes com MM.....	60
Figura 10. Análise por clg-FISH da deleção no gene <i>TRAF3</i> em pacientes com MM	61
Figura 11. Análise da especificidade da sonda <i>BIRC2/3</i> e <i>CYLD</i> em metáfases normais.....	62
Figura 12. Análise por clg-FISH da deleção nos genes <i>BIRC2/3</i> e <i>CYLD</i> em pacientes com MM.....	63
Figura 13. Análise por clg-FISH da deleção nos genes <i>BIRC2/3</i> e <i>CYLD</i> em pacientes com MM	63
Figura 14. Variação intraclonal detectada por clg-FISH em pacientes com MM	66
Figura 15. Variação intraclonal detectada por clg-FISH em pacientes com MM	66
Figura 16. Desenho esquemático das regiões deletadas em <i>TRAF3</i> e da localização das sondas de aCGH e FISH. A seta indica a direção de transcrição do gene	70

ÍNDICE DE TABELAS

Página

Tabela 1. Classificação genética biológica do MM.....	26
Tabela 2. Painel de marcadores por FISH com implicação clínica	28
Tabela 3. Sondas utilizadas na detecção das alterações cromossômicas para ativação da via NF-kB no MM	45
Tabela 4. Análise descritiva das características clínicas dos pacientes ao diagnóstico. M: Masculino, F: Feminino, ISS: International Staging System	55
Tabela 5. Valores <i>cut-off</i> calculados para as diferentes sondas utilizadas neste estudo	56
Tabela 6. Frequência de deleções genômicas em <i>TRAF3</i> no estudo do MMRC e porcentagem de células alteradas.....	67
Tabela 7. Esquema da região mais comumente deletada em <i>TRAF3</i> (MDR) com base nos eventos de deleção recorrentes em pacientes.....	68

LISTA DE ABREVIÇÕES

aCHG	hibridização genômica comparativa em alta resolução
BAC	cromossomo artificial bacteriano
<i>BAFF</i>	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily 3</i>
<i>BCL3</i>	<i>B cell leukemia/lymphoma</i>
<i>BIRC2</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein</i>
<i>BIRC3</i>	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein</i>
<i>CD40</i>	<i>CD40 antigen</i>
<i>CD40L</i>	<i>CD40 ligand</i>
clAP1	BIR repeat-containing protein
clAP2	BIR repeat-containing protein II
clg-FISH	hibridização <i>in situ</i> comparativa combinada com detecção das células plasmáticas por meio de anticorpos fluorescentes anti cadeia leve
<i>cREL</i>	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B cells inhibitor
<i>CYLD</i>	<i>cylindromatosis (turban tumor syndrome)</i>
Cot1	human cot1 DNA
DCEP	dexametasona, ciclofosfamida, etoposide, cisplatina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
GEP	perfil de expressão genômica
GMSI	gamopatia monoclonal de significado indeterminado
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IGH	cadeia pesada da imunoglobulina
IGL	cadeia leve da imunoglobulina

IKB	IKB protein
IkB α	IkB protein alpha
IkB β	IkB protein beta
IKK	kinase complex protein
IKK α	IKK protein alpha
IKK β	IKK protein beta
IKK γ	IKK protein gamma
IMWG	Internacional Myeloma Working Group
ISS	International staging system
LB	meio Luria-Bertani
LCP	linhagem de células plasmáticas
<i>LTBR</i>	<i>Lymphotoxin B receptor</i>
M	Molar
MDR	região mais comumente deletada
MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
MM	Mieloma Múltiplo
mM	Mili Molar
MMRC	Multiple Myeloma Research Consortium
<i>MMSET</i>	<i>Multiple Myeloma SET domain genes</i>
NF-KB	Nuclear factor Kappa B
NFKB1	Nuclear factor Kappa B subunit 1
NFKB2	Nuclear factor Kappa B subunit 2
<i>NFKBIA</i>	Nuclear factor of Kappa light chain gene enhancer in B cells inhibitor alpha
ng	Nanograma
<i>NIK</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>

P100	NFKB p52 precursor protein
105	NFKB p50 precursor protein
P50	NFKB p50 protein
P52	NFKB p52 protein
<i>P53</i>	<i>Tumor protein p53</i>
PBS	tampão fosfato salino
PC	células plasmáticas
<i>RANK</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11 A</i>
<i>RANKL</i>	<i>Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11</i>
<i>RAS</i>	<i>Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RelA	NFKB REL superfamily member A
ReLB	NFKB REL superfamily member A
RNA	acido ribonucléico
Rpm	rotações por minuto
SPIN	Lâminas preparadas por cito centrifugação
<i>TACI</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily member 13</i>
TACTH	transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas
<i>TNF</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>
Toll Like	Toll Like receptor superfamily
<i>TRAF3</i>	<i>TNF receptor-associated factor 3</i>
<i>TRAF6</i>	<i>TNF receptor-associated factor 6</i>
TWEAK	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 12
µl	Microlitros
VAD	Vincristina, doxorubicina, dexametasona

1 INTRODUÇÃO

O Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia de células B, caracterizada por uma proliferação clonal de células plasmáticas na medula óssea (Hallek *et al.*, 1998), conduzindo a citopenias, reabsorção óssea e, em muitos casos, a produção uma proteína monoclonal característica. (Kyle *et al.*, 2004). O MM é uma doença muito heterogênea com sobrevida variável de poucas semanas após o diagnóstico até mesmo 10 anos (Fonseca *et al.*, 2009). A razão desta heterogeneidade pode ser explicada em parte pela interação entre fatores do hospedeiro e características intrínsecas da biologia da doença. Além disso, é cada vez mais evidente que as características genéticas das células neoplásicas sustentem a grande heterogeneidade clínica do MM.

Conhecimentos sobre a biologia do MM permitiram a identificação de características intrínsecas do clone maligno capazes de estabelecer diferentes subgrupos genéticos da doença. Visando estratificar os pacientes em diferentes subgrupos de risco, Fonseca e colaboradores (2003a) propuseram uma primeira classificação molecular baseadas em diferenças citogenéticas: um primeiro grupo constituído por casos com hiperploídia, associado a um melhor prognóstico; um segundo grupo constituído na maioria por casos com hipodiploídia, associada à translocações no locus da cadeia pesada da Imunoglobulina (IgH) na região 14q32, em particular a t(4;14)(p16;q32), a t(14;16)(q32;q23), a deleção no cromossomo 13 (Δ 13q14), e a deleção na região 17p13, associados a um prognóstico desfavorável. Esta classificação composta por marcadores citogenéticos associados a resposta clínica nos pacientes com MM foi validada por diversos grupos (Fonseca *et al.*,

2003b; Fonseca *et al.*, 2004; Bergsagel *et al.*, 2005; Magrangeas *et al.* 2005; Zhan *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2007).

De modo recente, o advento dos conhecimentos da citogenética molecular em núcleo interfásico associados aos da genômica molecular tem revelado uma grande hetero-complexidade da doença e frente a estes avanços da oncogenômica, o MM já não é interpretado como uma doença única, mas como um conjunto de subtipos definidos por aberrações genéticas e citogênicas específicos (Debes-Marun *et al.*, 2003, Fonseca *et. al.*, 2009; San- Miguel, *et al.*, 2010).

Nesse sentido, foi proposta uma recente classificação para o MM, pelo IMWG (Internacional Myeloma Working Group), em 3 níveis: uma classificação genética biológica, composto por subgrupos com implicações clínicas e/ou prognósticas definidos primordialmente por uma anomalia genética preliminar associada a diversas outras alterações genéticas associadas à progressão e a evolução do clone; uma classificação prognóstica, que incorpora principalmente os fatores capazes de classificar e discriminar a resposta clínica; uma classificação preditiva, que incluiria fatores preditivos capazes de auxiliar com exatidão o benefício clínico de uma intervenção específica e permitam a seleção e a eliminação das terapias para os subgrupos de pacientes.

Dentre os eventos pertencentes à classificação genética biologia do MM, além das alterações citogenéticas descritas anteriormente, outros eventos, também genéticos, que resultam na perda do controle da proliferação e morte celular tem sido descritos no MM, em particular a ativação da via NF-kB. Em contraste ao conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do MM adquiridos nos últimos anos, os mecanismos envolvidos na ativação da via NF-kB

permanecem pouco elucidados (Carrasco *et al.*, 2006 San-Miguel *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm ressaltado o papel crucial da via de sinalização NF- κ B na patogênese do vários tipos de neoplasias, em particular do MM (Tai *et al.*, 2006; Braggio *et al.*, 2009; Moreaux *et al.*, 2009). Os fatores de transcrição conhecidos como NF- κ B formam complexos homo ou heterodiméricos formados por cinco membros da família Rel: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RELA (p65), RELB, e c-REL (Xiao *et al.*, 2001; Hayden *et al.*, 2008). Duas vias de sinalização do NF κ B são conhecidas: a canônica e a não canônica, que resultam, respectivamente, na translocação de p50/RELA e p52/RELB para o núcleo e conseqüentemente na ativação dos genes alvo. Mecanismos operantes na inativação de reguladores negativos destas vias, por mutação com perda de função ou deleção ou em contraste pela super expressão dos reguladores positivos estão envolvidos na ativação constitutiva da via.

Mais especificamente, a desregulação da expressão das proteínas regulatórias da via NF- κ B pode promover a progressão do ciclo celular, a inibição da apoptose, a resistência a drogas e a produção de citosinas e quimiocinas com aumento da proliferação (Basseres *et al.*, 2006; Gosh *et al.*, 2008). Embora o papel da ativação da via NF- κ B e a regulação dessas proteínas na patogênese da doença ainda não estejam completamente elucidados, na prática, o bloqueio desta via de sinalização representa uma estratégia terapêutica nova e promissora para o MM (Hideshima *et al.*, 2009).

Dois trabalhos recentes (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.*, 2007) baseados na análise do perfil de expressão gênica (GEP) e hibridização genômica comparativa por array de alta resolução (aCGH) identificaram 11 genes alterados por mutações.

Os reguladores negativos *TRAF3*, *TRAF2*, *BIRC2*, *BIRC3*, e *CYLD* inativados por deleções bialelicas e os reguladores positivos *CD40*, *LTBR*, *NFKB1*, *RANK*, *NFKB2*, e *TACI* com ação aumentada pela presença de mutação positiva para ganho de função. Os autores demonstraram uma associação entre estas alterações genéticas e a ativação constitutiva da via NFkB em 20% dos pacientes com MM.

O gene *TRAF3* (Fator receptor-associado 3 do fator de necrose tumoral (TNF)), regulador da via não canônica de NF-kB, foi o gene que quando modificado mais afetou a via NFkB tendo sido recentemente identificado como supressor de tumor no MM (Keats *et al.*, 2007; Gilmore *et al.*, 2007, Demchenko *et al.*, 2010). Além disso, foi relatada uma forte correlação entre os níveis de expressão de *TRAF3* e a resposta clínica ao bortezomibe, um inibidor de proteossoma capaz de regular a via NF-kB (Keats *et al.*, 2007).

Visto que a via NF-kB e particularmente o gene *TRAF3* representam alvos potencialmente importantes para intervenção terapêutica no MM, investigamos o *status* genômico deste gene e sua possível associação com outras alterações citogenéticas e variáveis clínicas, em uma coorte de pacientes com MM ao diagnóstico (Keats *et al.*, 2007). Deste modo, os reguladores negativos *BIRC2/3* e *CYLD*, da via NF-kB, foram avaliados neste trabalho.

Além da análise do *status* genômico de *TRAF3* nos pacientes, uma avaliação da região mais comumente deletada do gene foi realizada através de uma análise de um banco de dados de array CGH do MMRC (Multiple Myeloma Research Consortium). A identificação da região mais comumente deletada de *TRAF3*, até o momento desconhecida, visa contribuir no desenvolvimento e/ou aprimoramento das estratégias de detecção das alterações no gene, com alta sensibilidade e

especificidade, possibilitando no futuro, a inclusão junto à análise citogenética dos pacientes recém diagnosticados.

Atualmente é amplamente aceita a idéia de que o MM já não pode ser considerado uma entidade única, devido a sua heterogeneidade e a identificação de relevantes fatores prognósticos, que contribuíram na identificação de diferentes subtipos da doença. Esse conceito junto à descoberta recente de drogas novas, com novos mecanismos de ação, pode conduzir a terapêutica do MM a tratamentos individualizados baseado nas características individuais de cada paciente.

Nesse sentido, o conhecimento acurado das alterações citogenéticas e genômicas na via NF-kB envolvidas no MM e sua associação com características de apresentação clínica e biológica poderá nos fornecer potenciais marcadores biológicos a serem utilizados no diagnóstico, prognóstico e/ou progressão da doença, assim como importantes informações em relação à potencial escolha das estratégias terapêuticas baseadas no perfil de cada paciente.

1 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Genética e Citogenética do Mieloma Múltiplo

As células neoplásicas do MM apresentam uma complexa combinação de alterações genéticas e citogenéticas (Dewald *et al.*, 1985; Tabernero *et al.*, 1996; Zandecki *et al.*, 1996). Em razão desta heterogeneidade, diversos estudos foram realizados com o intuito caracterizar estas alterações, melhor compreender a biologia da doença e elucidar seus mecanismos patogênicos.

Nesse sentido, a avaliação citogenética, incluindo a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em núcleo interfásico de células plasmáticas (PCs) isoladas ou em combinação com imunofluorescência para detecção da cadeia leve – restrita as PCs (cIg-FISH), teve grande importância. Diversos estudos visando à caracterização molecular dos pacientes têm demonstrado que quase todos os casos de MM possuem citogenética anormal (Bersagel *et al.*, 1996; Fonseca *et al.*, 2004;; Dispenzieri *et al.*, 2007; Kyle *et al.*, 2008; Kyle *et al.*, 2009).

A avaliação citogenética em pacientes com MM permitiu a identificação de características intrínsecas do clone maligno capazes de estabelecer diferentes subgrupos genéticos da doença. (Hallek *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2004; Bergsagel *et al.*, 2005, Durie *et al.*, 2006; San Miguel *et al.*, 2008b). Nesse sentido, Fonseca e colaboradores (2003a) propuseram uma primeira classificação genética do MM em dois grupos principais: um primeiro grupo constituído por casos com hiperploídia (grande número de cromossomos com trissomias e baixa prevalência de translocações no locus da IgH) e um segundo grupo constituído na maioria por casos com hipodiploidia (alta prevalência de translocações no locus da IgH e deleções no cromossomo 13 e região 17p13). O grupo hiperdiploide foi associado a

um melhor prognóstico enquanto que o hipodiploide a um prognóstico desfavorável. Esta dicotomia foi validada em diversos estudos, tendo sido observada em pacientes por cariotipagem, clg-FISH e outras ferramentas genômicas (Fonseca *et al.*, 2003b; Fonseca *et al.*, 2004; Bergsagel *et al.*, 2005; Avet-Loiseau *et al* 2005; Zhan *et al.*, 2006; Gutiérrez *et al.*, 2007).

No entendimento atual da patogênese da doença do ponto de vista cito - molecular, são descritas duas vias principais no desenvolvimento das células tumorais: a) a dos tumores com cariótipo não-hiperdiploides, nos quais as translocações envolvendo o gene da cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH) representam o evento inicial para a transformação maligna; e b) a dos tumores com cariótipo hiperdiploide, nos quais outro mecanismo estaria operante como evento inicial, mais associada à instabilidade genômica responsável da geração de hiperdiploidia (Smadja *et al.*, 2001; Debes-Marun *et al.*, 2003, Kuehl *et. al*, 2002; Fonseca *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2004; Fonseca *et al*, 2009).

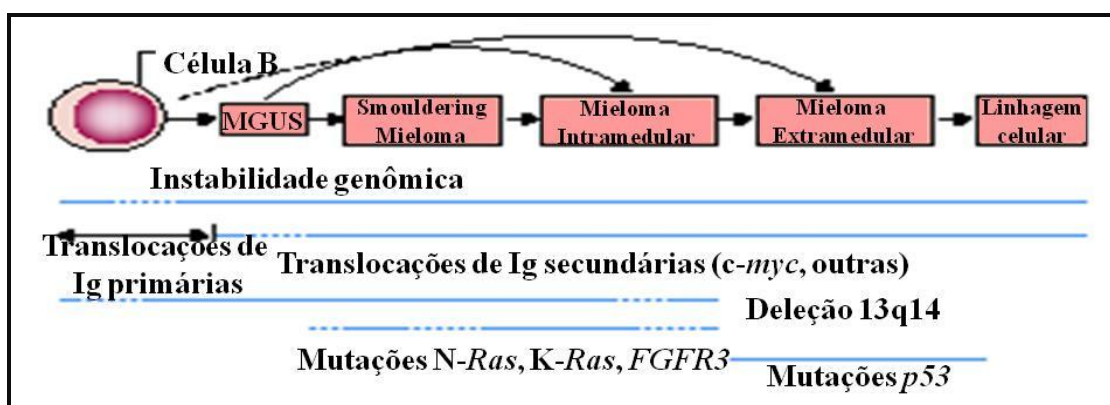


Figura 1. Esquema das alterações genéticas e sua relação com progressão da doença. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2003a.

Além dos eventos genéticos primários descritos anteriormente, é sabido que o desenvolvimento do clone maligno é conseqüência de múltiplos processos que

culminam em diversas alterações genéticas. No MM, ainda não está claro quais etapas específicas são associadas à progressão da doença e quais etapas são associadas aos diferentes subgrupos citogenéticos. Algumas das alterações genéticas que parecem refletir a progressão do MM incluem: deleção da região 17p13 (Fonseca *et al.*, 2009), anomalias no cromossomo 1 (deleções e amplificações) (Avet-Loiseau *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2010) e translocações envolvendo o oncogene *MYC* (Anguiano *et al.*, 2009; Fonseca *et al.*, 2009; Podar *et al.*, 2010). O aumento na prevalência destas alterações nos estádios extramedulares da doença sugere que estas poderiam ter um efeito proliferativo ou na sobrevivência celular, promovendo a independência do estroma e assim, a progressão da doença a uma fase extramedular.

O advento dos conhecimentos da citogenética molecular associados aos da genômica molecular têm revelado uma grande complexidade da doença, levando a visão de que o MM não já mais pode ser interpretado como uma doença única, mas como um conjunto de subtipos definidos por aberrações genéticas e citogenéticas específicos (Debes-Marun *et al.*, 2003, Fonseca *et al.*, 2009; San Miguel, *et al.*, 2010). Diante desta heterogeneidade genética, foi proposto recentemente pelo IMWG (Internacional Myeloma Working Group) uma classificação para o MM em 3 níveis: uma classificação genética biológica, uma classificação prognóstica e uma classificação preditiva.

A classificação genética biológica compreende subgrupos de doença definidos primordialmente por uma anomalia genética acompanhada a diversas outras alterações, em geral associadas à progressão e a evolução do clone. Embora os subgrupos possuam algum tipo de implicações clínicas e/ou prognósticas definidas,

a presença desta associação não é uma condição para definição de subgrupo (tabela 1).

Tabela 1. Classificação genética biológica do MM.

Nível	Evento (anomalia genética)	Valor prognóstico
Eventos genéticos primários	Hiperdiploidia vs. Não-hiperdiploidia	Sem maiores implicações clínicas, mas em geral, a hiperdiploidia demonstra melhor resposta clínica
	t(11;14)(q13;32)	Neutro
	t(4;14)(p16;q32)	Menor sobrevida
	t(14;16) (q32;q23)	Menor sobrevida e agressividade tumoral
Eventos genéticos secundários	Δ 13q14 ou monossomia (FISH)	Proliferação clonal
	Δ 13q14 ou monossomia (citogenética convencional)	Menor sobrevida; maior índice proliferativo, progressão da doença
	Δ 17p13	Menor sobrevida; progressão da doença, agressividade tumoral
	1q (mutações)	Adverso; agressividade tumoral
	NF-kB (ativação da via por mutações em diversos reguladores)	Proliferação clonal; boa resposta clínica (bortezomibe)
	RAS (mutação)	Adverso; progressão da doença
	12p (deleções)	Menor sobrevida
	p16 (mutação) e p18 (inativação)	Adverso; evento patogênico
Mirna	Evento patogênico	
16q (mutações)	Evento patogênico	

*Referência Fonseca *et al.*, 2009.

A classificação prognóstica incorpora principalmente os fatores capazes de classificar e discriminar a resposta clínica. Inclui fatores considerados determinantes no prognóstico, em geral características de apresentação clínico - patológicas relacionadas à agressividade da doença, tais como: b2-micro globulina elevada, hipercalcêmica, aumento de lactato desidrogenase (LDH), ocorrência de doença extramedular, entre outras. A t(4;14)(p16;q32), associada a uma manifestação mais agressiva da doença, em pacientes tratados com quimioterapia convencional ou de altas doses, é capaz de distinguir pacientes com uma menor sobrevida.

A classificação preditiva inclui fatores capazes de auxiliar na definição do benefício clínico de uma intervenção específica e permitem a seleção e a eliminação das terapias para os subgrupos de pacientes. Como exemplo, ainda em fase de estudo I, o inibidor do fator 3 de crescimento de fibroblasto (FGFR3), TKI258, mostrou benefícios para o grupo de pacientes com a t(4;14) (Trudel *et al.*, 2005).

2.1.2 Alterações cromossômicas com valor prognóstico no MM

A utilização de uma classificação genético-molecular visa à elucidação de fatores prognósticos a serem utilizados para a estratificação dos pacientes em subgrupos diferenciados e que possam a ser utilizados para a escolha da melhor opção terapêutica e do momento de introduzir a terapia escolhida. Nesta classificação prognóstica, a citogenética tem se tornado um dos mais importantes fatores prognósticos no MM, a exemplo de outras neoplasias hematológicas (Zhan, *et al.*, 2006; San-Miguel *et al.*, 2009).

Frente à grande heterogeneidade genética do MM, é muito importante compreender que diferentes estágios clonais podem ser encontrados em pacientes recém diagnósticos, ou seja, a relação entre evolução clonal das células plasmáticas

e o tempo de diagnóstico não é igual em todos os pacientes (Fonseca *et al.*, 2009). Nesse contexto, a abordagem citogenética molecular objetiva prever a evolução clínica de um paciente com MM ao diagnóstico, com base em diversos marcadores biológicos já conhecidos e identificados como eventos primários ou relacionados à evolução clonal e progressão da doença (tabela 1).

Atualmente, a avaliação das alterações com valor prognóstico definido no MM é realizada de acordo com um painel mínimo por clg-FISH (tabela 2). A proposta deste painel é identificar o subgrupo “MM de alto risco” composto por aqueles pacientes com pelo menos uma das seguintes alterações: a t(4;14), t(14;16) ou a deleção da região 17p13. Casos com deleção da região 13q14 detectada por citogenética convencional também são inclusos no grupo de “alto risco”.

Tabela 2. Painel de marcadores por FISH com implicação clínica. Adaptado de Fonseca *et al.*, 2009.

Teste	Anomalia genética	Frequência de teste
Painel mínimo (marcadores essenciais)	t(4;14) (p16;q32)	Única
	t(14;16) (q32;q23)	Única
Painel secundário	Δ 17p53	periódica*
	Hiperploidia	Única
Outros	Δ 13q14	periódica*
	Outras translocações t(11;14), t(6;14), t(8;14)	Única

*é recomendado que haja a avaliação periódica durante desenvolvimento da doença por serem marcadores relacionados à progressão da doença.

2.1.3 Alterações genéticas estabelecidas ao diagnóstico

t(4;14)(p16.3;q32)

A *t(4;14)(p16.3;q32)* é uma alteração citogenética críptica, identificada em aproximadamente 20% dos casos com MM e 25% das linhagens celulares (Chesi *et al.*, 1997, 1998a; Richelda *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 2001; Moreau *et al.*, 2002), sendo detectada apenas por FISH ou PCR após transcrição reversa. A *t(4;14)* é recíproca em 70% dos casos com MM e sua consequência é o aumento de expressão dos genes *FGFR3* e *MMSET*. No entanto, em aproximadamente 25% dos casos com MM a *t(4;14)* é desbalanceada com perda derivativa do cromossomo 14 e consequentemente perda da expressão de *FGFR3*.

Diversos grupos demonstraram a que presença da *t(4;14)* é um fator prognóstico desfavorável independente da modalidade de tratamento (Moreau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2003a; Keats *et al.*, 2003, 2006; Moreau *et al.*, 2007; Schilling *et al.*, 2008). Mais recentemente, o valor prognóstico da *t(4;14)* foi questionado, em série dos pacientes tratados com bortezomibe (San-Miguel *et al.*, 2008b). Neste estudo, realizado com pacientes tratados com bortezomibe, melfalano e prednisona, a translocação não discriminou resposta entre pacientes recentemente diagnosticados. Contudo, a perda de valor prognóstico da *t(4;14)* nos pacientes tratados com bortezomibe não foi ainda confirmado.

t(14;16)(q32;q23)

A *t(14;16)(q32;q23)*, associada ao aumento da expressão do gene *MAF*, é detectada entre 5% a 7% dos pacientes com MM e em aproximadamente 25% das

linhagens celulares (Avet-Loisseau *et al.*, 2002; Fonseca *et al.*, 2003a; Avet-Loisseau *et al.*, 2007). A presença da t(14;16) foi associada a prognóstico altamente desfavorável e doença mais agressiva (Fonseca *et al.*, 2003a; Gutierrez *et al.*, 2007; San Miguel *et al.*, 2009) mesmo com o uso do bortezomibe ou a lenalidomida (Palumbo *et al.*, 2009).

Deleção 17p13

A inativação de p53 por mutação ou por deleção da região 17p13 é um fator citogenético molecular com valor prognóstico importante, sendo associado aos últimos estádios da doença (Drach *et al.*, 1998; Schultheis *et al.*, 1999). As alterações estão presentes em 5% dos pacientes ao diagnóstico, entre 20% e 40% em MM avançado ou LCP e em 60% de linhagens celulares (Mazars *et al.*, 1992; Corradini *et al.*, 1994). Está associada a formas mais agressivas da doença, a alta prevalência de MM extramedular, a hipercalcêmica e possui prognóstico desfavorável em pacientes tratados com quimioterapia convencional, de altas doses ou TACTH (Fonseca *et al.*, 2003a; Gertz *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2009).

Deleção 13q14

A deleção da região 13q14, locus do gene Rb (retinoblastoma), possui uma prevalência de 40% a 50% no MM (Dao *et al.*, 1994; Drach *et al.*, 2000; Fonseca *et al.*, 2003a; Podar *et al.*, 2009). A princípio foi considerado um fator prognóstico desfavorável independente do tipo de tratamento ou ainda pelo método de detecção utilizado (citogenética convencional ou FISH) (Desikan *et al.*, 2000; Zojer *et al.*, 2000; Facon *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2002b; Shaughnessy *et al.* 2003). Porém,

nos últimos anos, foi identificado que o valor prognóstico desfavorável está atribuído a sinergia com a t(4;14) (Avet-Loiseau *et al.*, 2007; Gutierrez *et al.*, 2007), e na ausência da mesma, a $\Delta 13q14$ não confere valor prognóstico aos pacientes não-hiperdiploides. Todavia, é importante ressaltar que o efeito desfavorável atribuído a $\Delta 13q14$ permanece nos casos detectados por citogenética (Seong *et al.*, 1998; Zojer *et al.*, 2000; Facon *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2002b; Shaughnessy *et al.*, 2003, Dewald *et al.*, 2005) uma vez que os efeitos aditivos no prognóstico pela detecção em metáfases anormais indicam uma maior carga tumoral e um clone em fase proliferativa, relacionados com um estágio mais avançado da doença.

2.2 Alterações na via NF- κ B no Mieloma Múltiplo

Estudos recentes têm ressaltado o papel crucial da via NF- κ B na patogênese do MM e sugerido que a ativação da via seria um importante mecanismo para a manutenção e proliferação das células neoplásicas (Demchenko *et al.*, 2010; Piva *et al.*, 2010).

O padrão atual de tratamento do MM inclui altas doses de quimioterapia seguidas ou não de transplante de células hematopoiéticas (Hungria *et al.*, 2008). Novos agentes de ampla, porém, indefinida especificidade molecular, tais como o bortezomibe e o análogo da talidomida lenalidomida (Barlogie *et al.*, 2004; Mitsiades *et al.*, 2004; Roccaro *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006; McConkey *et al.*, 2008) promovem uma maior sobrevida embora associados a altas taxas de toxicidade (Markovina *et al.*, 2008; Hideshima *et al.*, 2009).

Um maior conhecimento dos mecanismos envolvidos na patogênese do MM pode contribuir no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Dada a

potencialidade da via NF-kB no desenvolvimento dessas estratégias (Chng *et al.*, 2007), estudos que visem compreender os mecanismos intrínsecos das alterações moleculares na via são fundamentais.

2.2.1 A via NF-kB

A família de fatores de transcrição conhecidos como NF-KB compreende reguladores muito importantes da progressão do ciclo celular, apoptose, resposta inflamatória, resistência múltipla a drogas, entre outros (Ponnappan *et al.*, 1998; Zandi *et al.*, 1997; Karin *et al.*, 1998; Hideshima *et al.*, 2002; Sankar *et al.*, 200).

O fator nuclear de transcrição kappa-B (NF-kappa-B) compreende uma família de fatores de transcrição homo ou heterodiméricos localizados no citoplasma de todas as células e que translocam para o núcleo uma vez ativado. Uma vez no núcleo, estes fatores de transcrição possuem a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B (kB) (Baldwin *et al.*, 2006; Whiteside *et al.*, 1997).

A regulação transcricional de NF-kB nos genes alvo é mediada por um conjunto de homo ou heterodímeros, formados por cinco membros da família *Rel*: *NFKB1* (p50 e seu precursor p105), *NFKB2* (p52 e seu precursor p100), *RelA* (p65), *RelB*, e c-Rel. Estas proteínas têm em comum um domínio homólogo Rel (Rel homology domain) que promove ligação ao DNA, dimerização e interação com fatores de inibição específicos, chamados IκB. Os dímeros de NF-kB estão inativos no citoplasma devido à interação com os inibidores IκB (IκBα, IκBβ ou IκBε). Em contraste, para que os dímeros se tornem ativos, é necessária a ativação da quinase

IKK responsável por promover a fosforilação de I κ B e sua posterior degradação no proteossoma. O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com conseqüente ligação nos genes que apresentam a seqüência regulatória GGGACTTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo.,

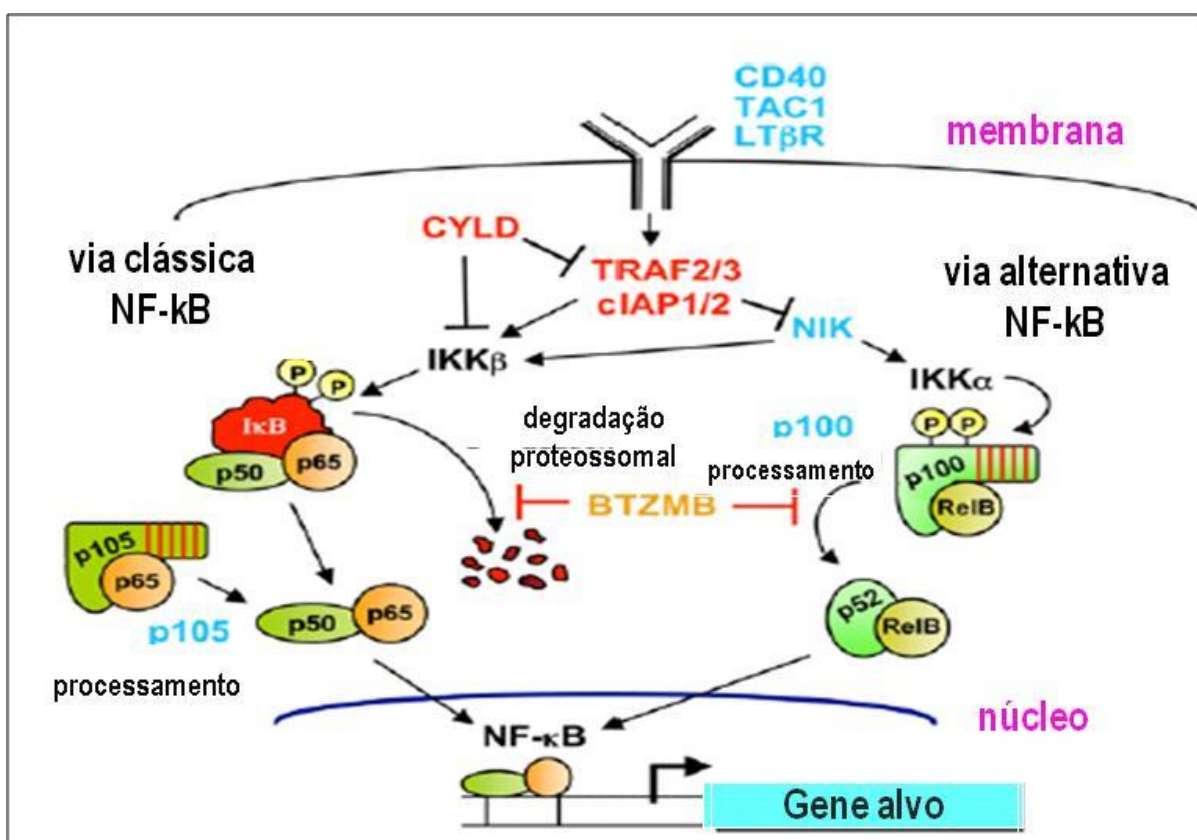


Figura 2. Esquema proposto para ativação da via NF- κ B no MM. Os dímeros precusores estão representados em verde e os heterodímeros ativos em amarelo. Em vermelho os reguladores negativos da via e em azul os reguladores positivos. BTZMB (bortezomibe) indica o nível na qual a droga é capaz de atuar. As setas representam o fluxo de ativação. Adaptado de Gilmore *et al.*, 2007.

Dois vias gerais de ativação são conhecidas: clássica (ou canônica) e alternativa (ou não canônica). Na via clássica, a unidade IKK β ativada do complexo de quinases IKK α -IKK β -IKK γ promove a fosforilação das subunidades inibitórias I κ B α , I κ B β ou I κ B γ e posteriormente a sua degradação proteossomal. Como

resultado, há o acúmulo dos heterodímeros *RelA*, *c-Rel* e *p50* no núcleo. Os dímeros *RelA:p50* são predominantemente regulados por *IkB α* . Uma grande variedade de estímulos, incluindo sinalização extracelular através de receptores TNF ou Toll-like receptores, considerados reguladores positivos da ativação, ativam a via canônica (Ito *et al.*, 2004). A ativação da via canônica de NF- κ B é imprescindível na resposta imune e na proliferação celular (Karin *et al.*, 2005).

Na via alternativa, NIK (NF κ B - quinase induzida) ativa IKK α . Uma vez que IKK α é ativado, há o processamento de *p100* em *p52* (NF κ B2) através de uma remoção proteossomal do domínio inibitório C-terminal *IkB δ* . Assim, o dímero ativo *p52* é gerado e conseqüentemente, há um acúmulo do heterodímero *p52/RelB* no núcleo. A via alternativa, de grande importância no desenvolvimento e maturação dos linfócitos, pode ser ativada em resposta a um conjunto pequeno de membros da família TNF tais como: CD40L (ligante), LT $\alpha\beta$, BAFF (fator de ativação de células B), RANKL (ligante ativador do receptor do NF- κ B) e TWEAK (indutor fraco de apoptose relacionado a TNF) (Brown *et al.*, 2010; Vallabhapurapu *et al.*, 2009). Essas proteínas atuam como reguladores positivos da via.

Em contraste a ativação mediada por receptores da via clássica, que ocorre em poucos minutos e não requer a síntese de novas proteínas, a ativação da via alternativa ocorre em horas e necessita da síntese de novas proteínas (Zarnegar *et al.*, 2008). Além disso, na ativação da via alternativa NIK é imprescindível (Matsuhima *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2001).

Ambas as via possuem sua ativação regulada negativamente por proteínas, os reguladores negativos, que atuam em diferentes etapas da via. Os principais reguladores negativos da via são *TRAF3*, *TRAF2*, *clap1*, *clap2* e *CYLD*. *TRAF3*, uma ubiquitina ligase, pode inibir a sinalização tanto na via clássica como na via

alternativa, através dos membros da superfamília de receptores TNF (TNFR). Este efeito de *TRAF3* pode em parte ser mediado pela degradação de NIK. A ubiquitina ligase cIAP, da superfamília de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) também pode atenuar os sinais da via NF- κ B via os membros da família TNFR. Já o supressor de tumor *CYLD* pode inibir a via NF- κ B através da deubiquitinização de IKK, de *TRAF2*, de *TRAF6* e de *BCL3* (Kovalenko *et al.*, 2003; Gilmore *et al.*, 2007).

2.2.2 A ativação constitutiva da via NF- κ B no MM

Alterações nas vias de sinalização mediadas pelo NF- κ B são responsáveis pela proliferação celular e inibição da apoptose em vários tipos de tumores (Liao *et al.*, 2004; Karin *et al.*, 2005; Courtois *et al.*, 2006; Zanegar *et al.*, 2008; Puvvada *et al.*, 2010). A inativação dos reguladores negativos por mutações ou a super expressão dos reguladores positivos estão envolvidos na ativação constitutiva da via.

Recentemente, uma grande variedade de anormalidades genéticas que resultam na ativação constitutiva da via foi observada em células CD138+ de pacientes com MM (Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007; Gilmore *et al.*, 2007). Os autores baseados na análise do perfil de expressão gênica (GEP) e hibridização genômica comparativa por array de alta resolução (aCGH) identificaram 11 genes alterados por mutações. Os reguladores negativos *TRAF3*, *TRAF2*, *BIRC2*, *BIRC3*, *NIK* e *CYLD* inativados por diversos tipos de alterações genéticas, entre elas mutações somáticas, deleções em homo ou heterozigose ou silenciamento epigenético. Por sua vez, os reguladores positivos *CD40*, *LTBR*, *NFKB1*, *RANK*, *NFKB2* e *TACI* foram afetados por alterações levando a um ganho de função. No

total, foi identificado que essas alterações ocasionaram a ativação constitutiva da via em 20% dos pacientes com MM e em 40% das linhagens celulares de MM.

Um dos principais mecanismos propostos para a ativação da via NF- κ B foi a estabilização constitutiva de *NIK*, ocasionada pela inativação dos reguladores negativos. Os mecanismos que possibilitariam essa estabilização constitutiva seriam a amplificação ou translocação do gene *NIK* ou ainda mutações em *TRAF3* e perda de expressão de ambos os genes, *BIRC2* e *BIRC3* (que codificam respectivamente *clAP1* e *clAP2*). O silenciamento dos reguladores negativos possibilita a *NIK* se estabilizar no citoplasma e fosforilar continuamente os inibidores I κ B, com consequente ativação constitutiva da via.

Keats *et al.* (2007) propuseram a existência de um complexo regulatório citoplasmático de *NIK*, que regularia a degradação co-translacional de *NIK* através de *TRAF3*, *TRAF2*, *clAP1* e *clAP2*. Neste mecanismo hipotético, na ausência de estímulo, *TRAF3* recrutaria *NIK* no citoplasma e o conduziria ao complexo contendo *TRAF2*, *clAP1* e *clAP2*, mediadores para degradação proteossomal. Nas células normais, havendo o acoplamento de *NIK* com o receptor (I κ B), esses reguladores seriam seqüestrados para a membrana plasmática possibilitando a estabilização de *NIK*. Recentemente, dois estudos reafirmaram este mecanismo de estabilização de *NIK*, decorrente da degradação proteossomal de *NIK* por este complexo regulatório composto por *TRAF3*, *TRAF2*, *clAP1* e *clAP2* (Zarnegar *et al.*, 2008; Varfolomeev *et al.*, 2008).

Inicialmente houve uma discrepância quanto a principal via de ativação, canônica ou não canônica, na patogênese do MM e, qual seria o papel das mutações nestas vias. Annunziata *et al.*, (2007), atribuíram as alterações moleculares nos reguladores *TRAF3*, *clAP1*, *clAP2*, *NIK* e *CYLD* a via canônica, na

qual a maioria das drogas convencionais é capaz de atuar enquanto Keats *et al.*, (2007), associaram as alterações encontradas a via não canônica. Todavia, utilizando um NF-κB índice, calculado a partir genes alvos da via e medindo os níveis de proteínas nucleares através da atividade de bandeamento de NF-κB em um painel de 50 linhagens de MM com diversas mutações já descritas, um estudo demonstrou que a única alteração capaz de ativar exclusivamente a via alternativa foi NFKB2. Mutações em *CYLD* ativaram principalmente a via clássica enquanto que a maior parte das mutações, que resultam no aumento dos níveis de *NIK* (*TRAF3*, *TRAF2*, *cIAP1* e *cIAP2*) ativaram mais comumente a via alternativa e, em um grau menor, a via clássica (Demchenko *et al.*, 2010). Neste mesmo estudo, usando ensaios de transfecção para ativar seletivamente a via clássica ou alternativa, os autores observaram mudanças virtualmente iguais na ativação de ambas as via.

De acordo, a ativação das duas vias, clássica e alternativa, são fenômenos subjacentes a patogênese do MM. Estes dados suportam que o bloqueio da via de sinalização pode representar uma nova estratégia terapêutica para o MM.

2.2.3 O gene *TRAF3*

O gene *TRAF3* (*Fator 3 associado ao receptor de TNF*) está localizado no cromossomo 14, mas precisamente na banda 14q32.3 e codifica a proteína TRAF3, uma ubiquitina ligase putativa, que pode inibir ambas as vias de NF-κB, através dos membros da super família de receptores TNF. Possui um papel importante na sinalização da via, pois, participa do processo de degradação de NIK (Liao *et al.*, 2004; Xiao and Sun, 2000).

Recentemente foi identificado como supressor de tumor no MM e encontrado inativado em aproximadamente 12,3% dos pacientes com MM (Keats *et al.*, 2007;

Gilmore *et al.*, 2007). Dentre as principais causas de inativação do gene estão: deleções bialélicas, mutações somáticas homozigóticas nos exons 4,9,10 ou 11 conduzindo a um códon de terminação e silenciamento epigenético. Além disso, deleções e mutações em heterozigose foram identificadas em pacientes e linhagens celulares de MM com níveis muito baixos de transcrição gênica (Annunziata *et al.*, 2007).

A inativação de TRAF3 foi correlacionada a com uma resposta pobre a dexametasona e a uma boa resposta clínica ao bortezomibe (Keats *et al.*, 2007). Assim, foi sugerido que o status genômico de TRAF3 pudesse, no futuro, ser usado na estratificação de pacientes para o tratamento com novas drogas inibidoras de proteossoma.

2.2.4 Os genes *BIRC2* e *BIRC3*

Os genes *BIRC2* e *BIRC3* estão localizados no cromossomo 11, mas precisamente na banda 11q22.2, dispostos em tândem, e codificam respectivamente as proteínas cIAP1 e cIAP2. Essas proteínas são caracterizadas pela presença de um ou mais domínios BIR (Baculoviral Inhibitory Repeat) na região amino-terminal, e dois domínios na região carboxi-terminal, denominados “RING” e “CARD”. Possuem como funções biológicas o bloqueio da apoptose, a ativação da via NF- κ B e a modulação da sinalização TNF α . (Mosley *et al.*, 2006).

Mutações em *TRAF3* foram identificadas como a mais frequente causa de ativação da via NF- κ B (Keats *et al.*, 2007; Zarnegar *et al.*, 2008). Entretanto, nos casos em que *TRAF3* encontrava-se funcional foi observado mutações com consequente inativação de *BIRC2* e *BIRC3*. (Keats *et al.*, 2007). Além disso, foi descrito em pacientes e em linhagens celulares de MM com expressão de assinatura

gênica de NF- κ B acima da média, uma baixa expressão dos genes *BIRC2* e *BIRC3* (Annunziata *et al.*, 2007). Os níveis da proteína *NIK* nas linhagens celulares de MM que possuíam mutações inativando *clAP1/2* ou *TRAF2* foram maiores do que nas células com mutações inativando *TRAF3*. Estudos envolvendo *shRNA* demonstraram que a inativação de *clAP1/2* são suficientes para aumentar os níveis de p52 no núcleo (Demchenko *et al.*, 2010) mas, que este processo requer a inativação de ambas as proteínas. Estas evidências juntas sugerem que a inativação de *clAP1* e/ou *clAP2* poderia modular a via NF- κ B no MM.

2.2.5 O gene *CYLD*

O supressor de tumor *CYLD*, localizado no cromossomo 16, banda 16q12.1, pode inibir a via NF- κ B em diferentes níveis regulatórios, pois, codifica uma enzima deubiquitinizante capaz de remover a motivos de ubiquitina presentes nas moléculas ativas de *TRAF2*, *TRAF6*, *BCL3* e da subunidade *IKK γ* (Brummelkamp *et al.*, 2003; Kovalenko *et al.*, 2003; Regamey *et al.*, 2003; Massoumi *et al.*, 2006).

A deleção bialélica de *CYLD* foi identificada como um evento recorrente em pacientes e linhagens de MM com alta atividade da via NF- κ B detectada (Carrasco *et al.*, 2006; Keats *et al.*, 2007). Níveis de expressão gênica abaixo da média, ocasionados por deleções monoalélicas, também foram observados em pacientes com assinatura genômica de NF- κ B acima da média (Annunziata *et al.*, 2007). Entre estes casos, foi detectada uma única mutação nonsense em heterozigose, porém, a prevalência dessa mutação foi de apenas 1,6%. Embora deleções em *CYLD* tenham sido associadas a ativação da via NF- κ B, a prevalência dessas alterações em pacientes com MM não foi bem delineada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Analisar o *status* genômico dos genes *TRAF3*, *BIRC2*, *BIRC3* e *CYLD* no Mieloma Múltiplo em um grupo de pacientes ao diagnóstico.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a natureza e frequência das alterações citogenéticas $\Delta 13q14$, $\Delta 17p53$ e as translocações para a região 14q32 em particular a t(4;14).
- Investigar uma possível associação entre alterações genéticas nos genes *TRAF3*, *BIRC2*, *BIRC3* e *CYLD* e as alterações citogenéticas.
- Identificar a região mais comumente deletada no gene *TRAF3*.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Neste estudo foram analisados 60 pacientes com MM sem tratamento prévio. Os pacientes foram diagnosticados no período de 2003 a 2008 em seis centros: Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (N=53), Serviço de Hematologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA) (N=1), Serviço de Hematologia Hospital Universitário Pedro Ernesto (N=2), Serviço de Hematologia do Hospital Antônio Pedro (N=1), Serviço de Hematologia do Hospital Santa Rita de Cássia (Vitória- ES) (N=1) e Serviço de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade de Juiz de Fora (Juiz de Fora - MG) (N=2).

O diagnóstico da doença foi realizado segundo recomendações internacionais (IMWG, 2003). As informações clínicas foram registradas logo após ter sido realizado o diagnóstico da neoplasia e incorporadas em uma ficha padrão, assim como informações relacionadas com o tratamento e acompanhamento (anexo 2).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA (processo 40/04) (Anexo 3), e realizado de acordo com as normas de Helsinki.

4.2 Métodos

4.2.1 Processamento de amostras

Foram colhidos 15 - 20 ml de aspirado de medula óssea dos pacientes ao diagnóstico. Na figura 3 é apresentado um fluxograma, em que se encontram sumarizadas as etapas de obtenção do material e processos posteriores.

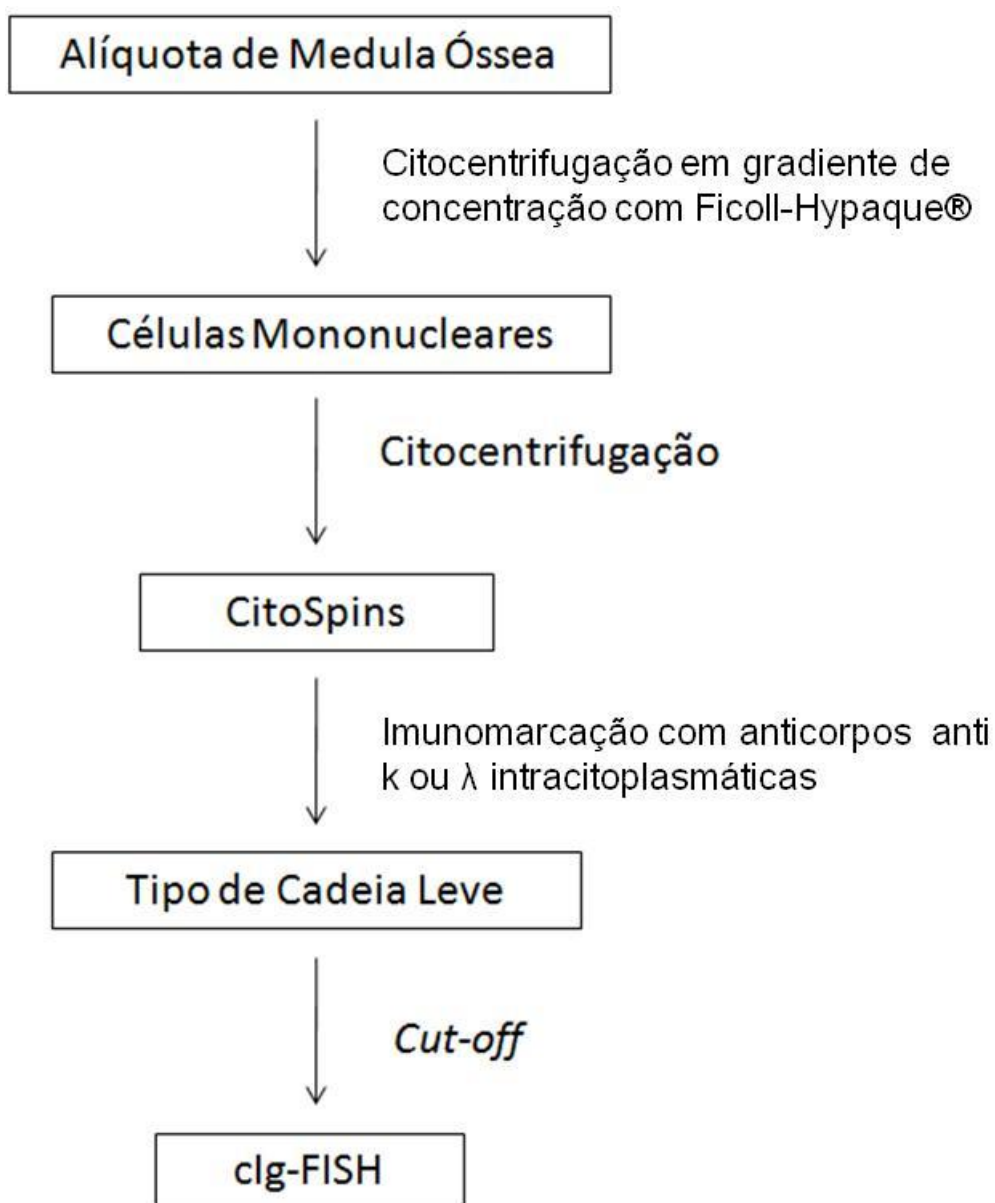


Figura 3. Fluxograma do processamento de amostra e etapas posteriores.

4.2.2 Separação de células mononucleares

A fração de células mononucleares das amostras de medula óssea foi separada após centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque® (Sigma), segundo as recomendações do fabricante.

4.2.3 Preparação de lâminas por citocentrifugação

No intuito de preservar a morfologia celular para a realização das técnicas de clg-FISH, as células foram processadas pela técnica de citopreparação.. Para cada amostra, foram realizadas 10–20 citopreparações. Alíquotas de 10^5 células mononucleares foram citocentrifugadas em uma citocentrífuga (Thermo Shandon® 3) a 400 r.p.m. durante 5 minutos. As lâminas foram fixadas em etanol 95% e mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 24 horas e posteriormente preservadas a -20°C até o seu uso.

4.2.4 Hibridização in situ fluorescente (FISH)

Com o objetivo de que a análise das alterações citogenéticas fosse realizada exclusivamente nas células plasmáticas, foi utilizado um método combinado, que inclui a detecção das células plasmáticas por meio de anticorpos fluorescentes anti-cadeia leve κ ou λ intracitoplasmáticas, seguido pela hibridização com sondas marcadas com fluorescência (FISH), o que permite identificar os plasmócitos e realizar a análise exclusivamente nessa população.

Preparação das lâminas

As lâminas obtidas por citocentrifugação foram retiradas do acondicionamento a -20°C e imediatamente fixadas por imersão em etanol 95% durante 5 minutos. Uma vez secas, procedeu-se à identificação do tipo de cadeia leve das imunoglobulinas (κ ou λ) intracitoplasmática presente nas células plasmáticas de cada paciente. Duas lâminas de cada paciente foram incubadas com uma solução 10% de anticorpo (diluído em meio RPMI1640) durante 20 minutos na escuridão: uma delas com anticorpo anti-kappa (Anti-goat Humam IgG - Vector Labs) e outra com anticorpo anti-lambda (Anti-goat Humam IgG - Vector Labs) conjugado com 7-amino-4-metilcoumarin-3-ácido acético (AMCA - Vector Labs). Após este procedimento, as lâminas foram lavadas duas vezes em uma solução de Tween20 0,3% durante 2 minutos (diluída em PBS 1X - Tampão Fosfato Salina). Para amplificar a intensidade da marcação fluorescente, as lâminas foram incubadas com 10% de um anti-anticorpo anti região constante das imunoglobulinas [(Anti-goat IgG (H+L)], também conjugado com AMCA (diluído em meio RPMI 1640). Após 20 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em Tween20 por 2 minutos e imediatamente incubadas em solução 2XSSC (0,3 M Cloreto de Sódio, 0,3 M Citrato de Sódio, pH 7,0) por 2 minutos. Posteriormente as lâminas foram “envelhecidas” em solução de 2XSSC a 37°C durante 30 minutos. Após este processo, as lâminas foram desidratadas em uma série de banhos com etanol a 70%, 85% e 100% durante 1 minuto cada um, e secadas a temperatura ambiente.

Sondas utilizadas

Para a detecção de alterações cromossômicas estruturais foram utilizadas dois tipos de sonda: sondas derivadas de bibliotecas genômicas (não comerciais) e sondas comerciais. As sondas utilizadas são descritas na tabela 3.

Tabela 3. Sondas utilizadas na detecção das alterações cromossômicas.

Gene	Sonda	Tipo	Procedência
Rb	LSI D13S319 spectrum orange	Comercial	Abbott
IgH	LSI IgH dual color break apart rearrangement	Comercial	Abbott
FGFR3	LSI IgH/FGFR3 dual color break apart rearrangement	Comercial	Abbott
p53	LSI p53 spectrum orange	Comercial	Abbott
Gen11	CEP11 spectrum aqua	Comercial	Abbott
CEP16	CEP 16 spectrum red	Comercial	Abbott
TRAF3	CTD 3235K2 (BAC)*	não comercial	Clínica Mayo
TRAF3	G248P81572G6 (Fosmídeo)*	não comercial	Clínica Mayo
BIRC2/3	G248P83130C11 (Fosmídeo)*	não comercial	Clínica Mayo
CYLD	RP11-327F22 (Fosmídeo)*	não comercial	Clínica Mayo
NFKBIA	CTD-3214F11 (BAC)*	não comercial	Clínica Mayo

* cedidas gentilmente por Rafael Fonseca (Mayo Clinic – AZ, EUA)

Sondas comerciais

As sondas de DNA comerciais foram preparadas segundo recomendações do fabricante (Abbot®). Um microlitro (μ l) da sonda foi diluído em 2 μ l de água MiliQ e 7 μ l de tampão de hibridização (Vysis®) e adicionado a cada lâmina.

Sondas não-comerciais

Escolhemos analisar as alterações moleculares nos genes *BIRC2/BIRC3*, *CYLD*, *NFKBIA* e *TRAF3* pela técnica do clg-FISH em núcleo interfásico. Na ausência de sondas comerciais, para esta análise foram confeccionadas sondas não comerciais. Os fragmentos de DNA empregados como sondas foram obtidos a partir de vetores recombinantes BACs (cromossomo artificial bacteriano) e fosmídeos (bibliotecas genômicas) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Rafael Fonseca (Mayo Clinic – AZ, EUA).

A escolha dos vetores para o estudo das regiões de interesse nos genes *BIRC2/BIRC3* e *CYLD* foi feita com base nos dados da literatura (Keats *et al.*, 2007). Para análise dos genes *BIRC2* e *BIRC3* foi selecionado um único fosmídeo contendo um fragmento capaz de cobrir a região que contém ambos os genes organizados em tândem e por haver sinergismo entre as deleções encontradas neles.

O vetor escolhido para análise do gene *CYLD* foi um fosmídeo contendo um segmento de DNA localizado na região na qual as deleções foram descritas.

Para o gene *TRAF3*, a seleção de sondas foi feita de acordo com o publicado pelo primeiro estudo a analisar *TRAF3* por FISH (Keats *et al.*, 2007). Com o intuito de comparar os resultados obtidos foram selecionados um BAC e um fosmídeo, indicados na figura 4 e tabela 3.

O gene *NFKBIA* foi escolhido pela sua localização na região cromossômica subcentromérica 14q13.2, fato que permitiu o uso desta sonda para controle de número de cópias do cromossomo 14, na ausência de uma sonda centromérica eficiente para este cromossomo. Para análise de *NFKBIA* foi escolhido um BAC capaz de cobrir toda a região gênica.

A preparação e manipulação de sondas não comerciais serão descritas na seção 4.2.6.

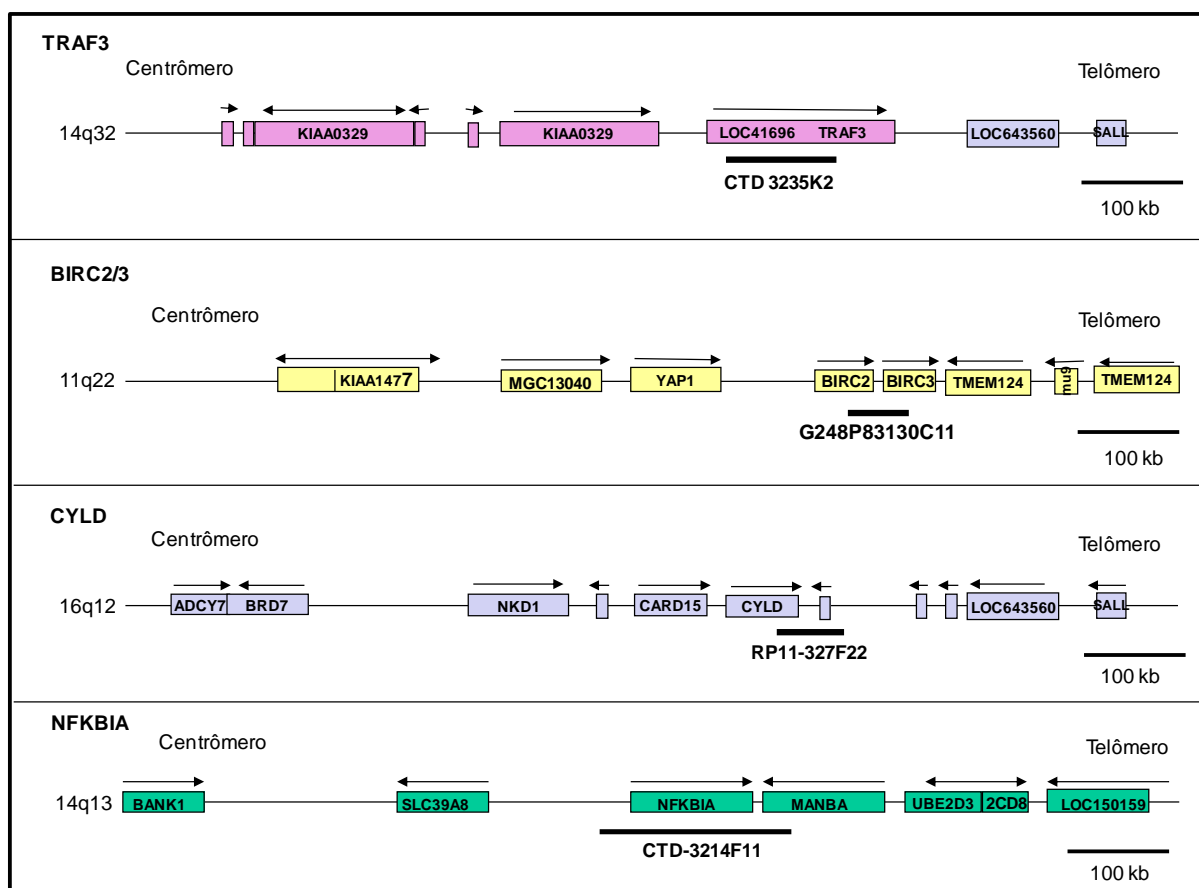


Figura 4: Desenho esquemático das regiões gênicas 14q32, 11q22, 16q12 e 14q13 contendo os genes de interesse e a localização das sondas de FISH utilizadas. As caixas representam as localizações de cada gene e as setas a direção de transcrição gênica. As barras indicam a posição de cada sonda de FISH. A barra à direita representa a escala de magnificação, em Kb.

Hibridização

As sondas (1 μ l na concentração de 10 ng/ μ l) foram aplicadas nas lâminas previamente preparadas, e posteriormente cobertas com lamínulas. As lâminas com a sonda foram incubadas a 73°C por 10 minutos para desnaturação dos cromossomos e das sondas, e posteriormente, a 37°C por 12-16 horas para permitir a hibridização DNA - sonda. Após este período, as lamínulas foram retiradas e as lâminas lavadas em solução de 0,4XSSC a 73°C por 3 minutos. As preparações

foram lavadas em Tween20 0,3% por 2 minutos e secadas a temperatura ambiente. Após este processo, foi aplicado um contraste (Antifade – Vector Labs) para aumentar a intensidade dos sinais fluorescentes. Uma nova lamínula foi colocada e então a lâmina foi observada no microscópio de fluorescência.

4.2.5 Preparação de sondas não comerciais

Na ausência de sondas comerciais foram confeccionadas sondas não comerciais para a análise de algumas alterações. Os fragmentos de DNA empregados como sondas foram obtidos a partir de vetores recombinantes, recebidos já clonados em bactérias.

4.2.5.1 Extração de BACs e Fosmídeos em Grande Escala (Maxiprep)

A extração dos BACs e Fosmídeos foi realizada com o Plasmid Maxi Kit (Qiagen®). Uma colônia de bactérias foi isolada e inoculada em 5 ml de meio LB líquido, contendo 20 ug/ml de cloranfenicol. Após incubação durante a noite a 37°C, 1,5 ml da cultura foi transferido e inoculado em 500 ml de meio LB líquido contendo 20 ug/ml de cloranfenicol. Após incubação durante a noite a 37°C, a cultura foi transferida para tubos de polipropileno. Centrifugou-se a 600 rpm durante 20 minutos a 4°C (Sorvall®GSA) e o sobrenadante foi descartado. As bactérias foram reconstituídas em 10 ml da solução P1 (50 mM glicose; 25 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM EDTA pH 8,0; 100 µg/ml de RNase A), sob agitação com auxílio de um vortex. Em seguida, foram adicionados 10 ml da solução P2 (0,2 N NaOH e 1% SDS). Os tubos foram agitados por inversão suave e incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Ao lisado foi adicionando 10 ml de acetato de potássio 3M (pH 5,5) e, novamente, os tubos foram agitados por inversão suave após a adição da

solução. As preparações foram centrifugadas a 1100 rpm durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e transferido para novo tubo. Foram colocados 0,7 volumes de isopropanol (Merck®) e as preparações foram mantidas em temperatura ambiente durante 10 minutos e, em seguida, centrifugadas a 1100 rpm durante 30 minutos a 4°C. O precipitado foi reconstituído em 5 ml de tampão QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS pH 7,0; 15% isopropanol; 0,15% Triton X-100) e adicionado a coluna de purificação Qiagen Tip-100 previamente equilibrada com tampão QBT. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens com 15 ml de tampão QF (1,25 M NaCl; 50mM Tris-HCl pH 8,5; 15% isopropanol) e feita a eluição com 5 ml de tampão QF aquecido a 65°C. Para precipitar o DNA, foi adicionado 0,7 volumes de isopropanol, centrifugado a 14000 rpm durante 30 minutos a 4°C e descartado o sobrenadante. O DNA precipitado foi lavado com álcool etílico gelado 70% e novamente centrifugado durante 5 minutos a 4°C. Depois de seco, o DNA foi reconstituído em 300 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA, pH 8.0).

4.2.5.2 Marcação do DNA e preparação das sondas não comerciais

O DNA extraído (1 ug) foi marcado com o conjunto de “Nick Translation” (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, 50 µl de DNA proveniente desta reação foram purificados em uma coluna Centri-Sep (Princeton Separations®). Posteriormente, foram adicionados 10 µl de DNA Cot-1 (Invitrogen), 2,5 µl de DNA fita simples (Sigma), 40 µl de água MiliQ, 12,5 µl de acetato de sódio 3M e 300 µl de etanol 100%. Após incubação a -80°C, durante 30 minutos, a preparação foi centrifugada a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado foi reconstituído em 25,8 µl

água MiliQ e 60,2 µl de tampão para hibridização (Vysis). A sonda foi armazenada no freezer a -20°C até o uso. Para a utilização na técnica de clg-FISH, 10 µl da sonda previamente preparada foi precipitada pela adição de 2 µl de Cot-1Dna, 1µl de DNA fita simples, 4 µl de água MiliQ, 2 µl de tampão Acetato e 50 µl de etanol 100%. Após incubação de 30 minutos a -80°C, a preparação foi centrifugada a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. e o sobrenadante foi descartado. Depois de seco, o pellet foi ressuspenso em 10 µl de tampão para hibridização e incubado por 10 minutos a 45°C em um Thermomixer (Thermomixer compact - Eppendorf®).

4.2.6 Avaliação da especificidade das sondas

Para confirmar a especificidade das sondas não comerciais (localização sub-cromossômica), um experimento de clg-FISH foi realizado como descrito acima, utilizando 30 µg de sonda marcada e análise de 20 metáfases de doadores sadios.

4.2.7 Obtenção de metáfases normais

O sangue foi cultivado em meio RPMI1640 (GIBCO) com L-glutamina, suplementado com fitohemaglutinina, estreptomina, penicilina e soro bovino fetal, em estufa a 37°C e após 72 horas foi adicionado 0,1 mL de colchicina a 0,0016%, sendo as células bloqueadas na fase de metáfase da divisão celular. Após meia hora, foi realizada centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi então incubado por 10 minutos em banho-maria. Adicionaram-se algumas gotas de solução Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético) para bloquear a ação da solução hipotônica e após homogeneização, foi realizada centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e iniciou-se então a fase de

fixação do material com adição de 5 mL de solução Carnoy. O material foi homogeneizado e deixado por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido. Esse procedimento foi repetido mais duas vezes. As lâminas foram preparadas com duas a três gotas da suspensão celular e secas à temperatura ambiente.

4.2.8 Estabelecimento de limiar (cut-off) para análise

No intuito de estabelecer um limiar para positividade e eliminar os resultados falsos positivos, foram realizados experimentos para estabelecer os valores de *cut-off* para cada sonda. A técnica de cIg-FISH foi realizada em 5 doadores de medula óssea sadios e a porcentagem de falsos positivos foi calculada. O valor *cut-off* foi obtido a partir da somatória da média aritmética das células com resultado falso positivo mais três vezes o desvio padrão (DP) observado. Este valor foi calculado independentemente para cada sonda utilizada. O controle interno utilizado para confirmar o sucesso da hibridização foi dado pela análise das células não plasmáticas.

4.2.9 Análise microscópica

Foram contabilizadas 100 células não plasmáticas e o sucesso da hibridização foi confirmado quando >90% das células apresentaram o padrão de hibridização normal. Na análise, foram contadas 100 células plasmáticas por paciente. Os casos foram considerados positivos para a alteração quando a porcentagem de células alteradas foi superior ao valor *cut-off*.

4.2.9.1 Microscopia

As lâminas foram examinadas em um microscópio de fluorescência Olympus X-60 (Olympus®), com sistema de filtros (filter wheel) (FITC e Texas Red) e câmera fotográfica CCD monocromática (Photometrics) acoplado a um sistema de captação de imagem Power Macintosh 63 com software Quips (Vysis).

4.2.10 Análise da região mais comumente deletada no gene *TRAF3*

No intuito de estabelecer a região mais comumente deletada (MDR) no gene *TRAF3*, analisamos uma coleção de dados de hibridização genômica comparativa por array de alta resolução (aCGH) do MMRC (Multiple Myeloma Research Consortium) disponível em:

<http://www.broadinstitute.org/mmgp/data/browseData/6254>. Nesse estudo, foram analisados 238 pacientes com Mieloma Múltiplo, ao diagnóstico ou refratários para variações de número de cópias por aCGH. Este conjunto de dados foi escolhido devido a sua alta resolução em comparação aos estudos anteriores de aCGH em MM e ao número de pacientes analisados.

A plataforma utilizada para coletar os dados primários foi 244 A Agilent (em média uma sonda a cada 8,9 kb), que permitiu a análise das regiões exônicas e intrônicas do genoma com uma resolução de 17,8 Kb. A análise foi realizada com filtro de 2 sondas consecutivas para considerar uma região como anormal.

Para estabelecer a MDR em *TRAF3* os dados primários do estudo mencionado foram analisados com o programa DNA Analytics 4 (Agilent Technologies). As sondas presentes em toda a extensão genômica do gene foram avaliadas através de um sistema de “score”, em que diferentes valores numéricos foram atribuídos a cada alteração encontrada. Consideramos o valor de “log ratio”

0,5 fornecido pelo programa como a presença de deleção monoalélica em $\geq 50\%$ das células; log ratio 1, a presença de deleção monoalélica em todas as células, log 1,5 a presença de deleção monoalélica em todas as células mais deleção bialélica em $\geq 50\%$ das células e log 2, a presença de deleção bialélica em todas as células.

Em seguida, atribuímos o valor 1 a todos os pacientes que possuíam deleção monoalélica (valores de log 0,5 e 1) e 2 aos casos com deleção bialélica (valores de log 1,5 e 2). Ao final, o score total foi calculado como Σ valor log/n, para cada uma das sondas de aCGH individualmente, e as regiões com maior pontuação foram ordenadas de acordo com este valor.

4.2.11 Análise Estatística

Um banco de dados com os resultados obtidos foi criado e inserido no programa SPSS 10.0, para posterior realização das análises estatísticas. A correlação entre os achados moleculares foi realizada utilizando o teste χ^2 ou o teste exato de Fisher (duas caudas) para variáveis categóricas. As associações foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

O presente estudo incluiu 60 pacientes com MM, 35 homens e 25 mulheres (proporção de sexos M:F 1,4), com uma mediana de idade de 54,5 anos (27 a 70 anos). O componente monoclonal mais frequente foi IgG em 64,3% (27/42), entretanto, em 18 pacientes a informação sobre o tipo de Ig não foi obtida.

De acordo com o sistema de estadiamento proposto pela *International Staging System* – ISS (Greipp *et al.*, 2003), 23,9% (11/46) dos pacientes foi incluído no estágio 1, 37% (17/46) no 2 e 39,1% (18/46) no estágio 3. Em 14 pacientes as informações sobre o estadiamento não foram obtidas. Ao diagnóstico, a presença de lesões líticas foi detectada em 85,4% (41/48) dos pacientes e a presença de hipercalcêmica em 20% (9/45). A insuficiência renal ao diagnóstico foi constatada em 37,5%. Dentre o grupo estudado, 19/60 dos pacientes (31,6%) foram a óbito. Características clínicas adicionais são detalhadas na tabela 4.

Tabela 4. Análise descritiva das características clínicas dos pacientes ao diagnóstico. M: Masculino, F: Feminino, ISS: International Staging System.

Característica	Informação disponível (N)	(%)
Idade mediana em anos	60	54,5
(faixa)		(27-70)
Sexo (M:F)	60	35:25
Isotipo de Imunoglobulina	42	
IgG		64,3
IGA		35,7
cadeia leve		1,6
Kappa:Lambda	60	72,5:27,5
Estádio pelo ISS	46	
I		23,9
II		37
III		39,1
risco baixo:alto		23,9:76,1
Hemoglobina <10g/dL	50	34
Cálcio >10,5 mg/dL	45	20
Creatina	47	
< 2mg/dL		34
≥ 2mg/dL		66
Lesões líticas	48	
Presente		85,4
Ausente		14,6

5.1 Análise de anormalidades cromossômicas

5.1.1 Cálculo do valor *cut-off*

Os experimentos de validação da utilização clínica de cada amostra permitiram determinar os valores de *cut-off* para cada sonda de DNA. Estes valores são detalhados na tabela 5.

Tabela 5. Valores *cut-off* calculados para as diferentes sondas comerciais utilizadas neste estudo.

Região cromossômica/ Alteração	Sonda	Cut-off
13q14	LSI D13S319 spectrum orange	11%
t(14q32)	LSI IgH dual color break apart rearrangement	10%
t(4;14) (p16;q32)	LSI IgH/FGFR3 dual color break apart rearrangement probe	7%
17p13	LSI p53 spectrum orange	11%

5.1.2 Translocações da região 14q32

No MM, o gene da cadeia pesada da imunoglobulina (IGH), na região 14q32 está freqüentemente envolvido em translocações com múltiplos cromossomos parceiros. Por isto, a estratégia proposta foi estudar inicialmente a região 14q32 com uma sonda que identificasse a quebra no gene *IGH*. Uma vez confirmada a presença da alteração, procedeu-se à procura do outro cromossomo envolvido. A região parceira estudada foi a 4p16, por ser a mais freqüente e pelo seu valor clínico.

Alterações envolvendo a região 14q32 foram observadas em 35% (21/60) dos casos. A mediana de plasmócitos com a translocação foi de 95% (intervalo 76-100%). A figura 5 mostra as características de um caso com translocação envolvendo 14q32, comparado com um caso com a região 14q32 sem anormalidades citogenéticas.

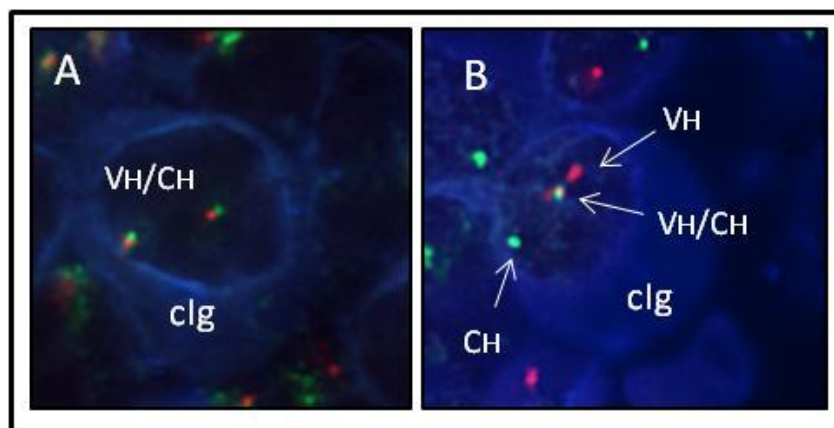


Figura 5. Análise por clg-FISH da translocação 14q32 em pacientes com MM. a) Caso sem translocação, confirmado pela co-localização das duas sondas VH/CH; b) caso com um alelo IGH translocado, demonstrado pela presença de três marcações (setas): um sinal de co-localização (amarelo) representando o cromossomo sem alteração (VH/CH) e as marcações vermelha (VH) e verde (CH) separadas, originadas a partir da quebra na região 14q32.

5.1.3 t(4;14)(p16;q32)

Esta alteração foi detectada em 16,6% (10/60) dos casos estudados, por meio de um conjunto de sondas de DNA comercial (figura 6). Considerando que a t(4;14) é recíproca em 70% dos casos e não balanceada no 30% restante, na análise dois padrões foram aceitos: (i) dois sinais de co-localização, representado os dois derivativos da translocação recíproca e (ii) um sinal de co-localização, ocasionado por um único ponto de fusão. Dentre os casos com a translocação, em 90% (9/10) casos foi observado o padrão de translocação recíproca, e em apenas 1/10 (10%) caso foi identificado 1 único ponto de fusão. A mediana de plasmócitos com a translocação foi de 92% (intervalo 72-100%).

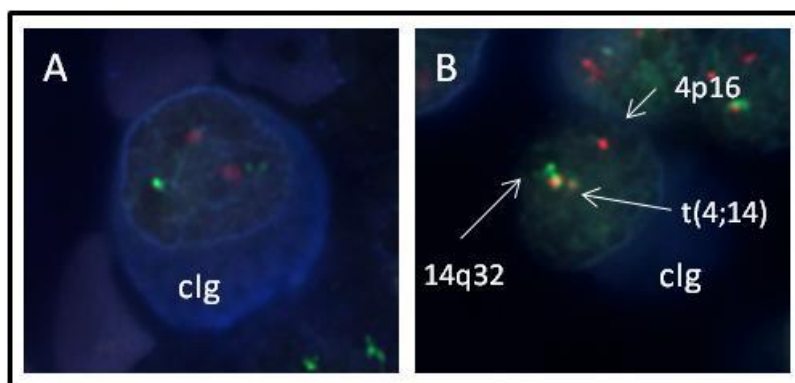


Figura 6. Análise por clg-FISH da $t(4;14)(p16;q32)$ em paciente com MM. a) Caso normal com as duas marcações: uma vermelha e outra verde representado os cromossomos 4 e 14. b) Caso com $t(4;14)(p16;q32)$ demonstrado pela presença de quatro marcações: uma vermelha e outra verde representando os cromossomos 4 e 14 inalterados, respectivamente; e duas amarelas ocasionadas por dois derivativos produto da translocação recíproca entre os cromossomos 4 e 14 (setas).

5.1.4 Deleção da região 13q14

A deleção da região 13q14 foi detectada em 40% (24/60) dos casos (figura 7).

A mediana da percentagem de células plasmáticas com a alteração foi de 83% (intervalo: 25-100%).

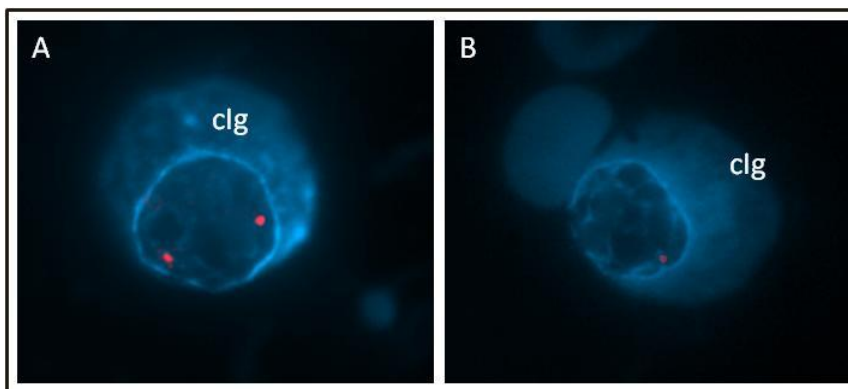


Figura 7. Análise por clg-FISH da deleção da região 13q14 em pacientes com MM. a) caso sem deleção, confirmado pela presença de duas marcações específicas; b) caso com deleção monoalélica.

5.1.5 Deleção da região 17p53

A deleção da região 17p13 foi detectada em apenas 2 casos (3,3%). A mediana da percentagem de células plasmáticas com a alteração foi de 96% (intervalo: 94- 98%). (figura 8).

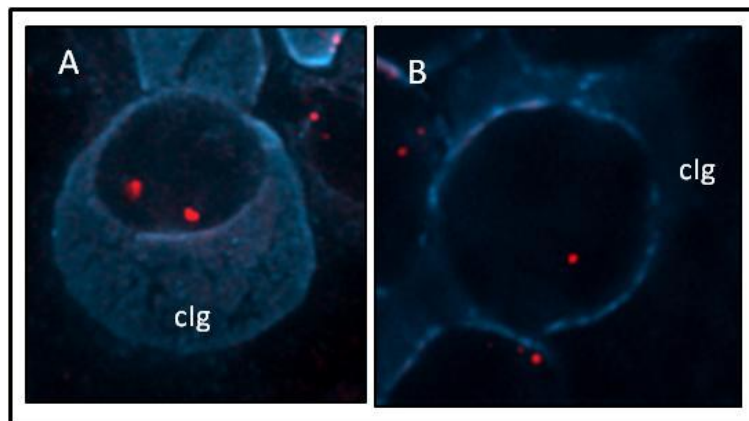


Figura 8. Análise por clg-FISH da deleção da região 17p53 em pacientes com MM. a) caso sem deleção, confirmado pela presença de duas marcações específicas; b) caso com deleção monoalélica.

5.1.6 Deleção no gene *TRAF3*

O estudo do gene *TRAF3* foi realizado com sondas não comerciais, um BAC e um fosmídeo que abrangeram diferentes regiões de *TRAF3*. Um terceiro fosmídeo, para o gene *NFKBIA* localizado próximo ao centrômero, foi usado como controle de número de cópias do cromossomo 14 (figura 9). Como observado na figura 9, a hibridização das sondas em metáfases normais permitiu confirmar a localização cromossômica e a especificidade da banda.

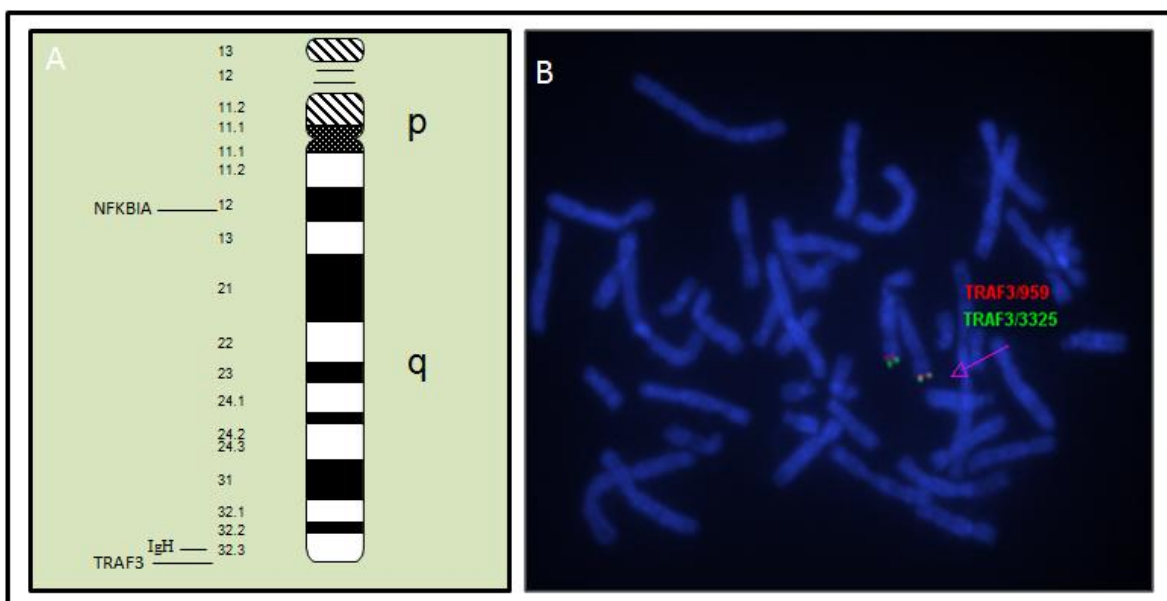


Figura 9. Estratégia de análise por clg-FISH da deleção de *TRAF3* em pacientes com MM. a) desenho esquemático do cromossomo 14 e localização cromossômica dos genes; b) metáfase normal confirmando a especificidade das sondas, em vermelho o fosmídeo e em verde o BAC.

Utilizando a estratégia descrita acima, deleção monoalélica de *TRAF3* foi detectada em 8,3% (5/60) dos pacientes, enquanto que nenhum apresentou deleção bialélica. Quando presente, a deleção monoalélica foi observada em 100% das células plasmáticas. Em todos os casos, houve deleção nas regiões cobertas por ambas as sondas (BAC e fosmídeo). Em 4/5 casos com deleção, a presença de apenas um sinal do fosmídeo de *NFKB1A* mostrou que estes possuíam monossomia do cromossomo 14 (figura 10). Entretanto, em um caso com deleção monoalélica de *TRAF3* foram detectadas 3 cópias de *NFKB1A*, sugerindo ganho de uma cópia do gene.

Dentre os casos sem alterações no gene *TRAF3* houve 2 casos com deleção monoalélica de *NFKB1A*, enquanto que 2 casos apresentaram 3 cópias do gene (figura 10). A mediana de células plasmáticas com alteração em *NFKB1A*, 62% (intervalo de 59-81), foi menor quando comparada a deleções no gene *TRAF3*.

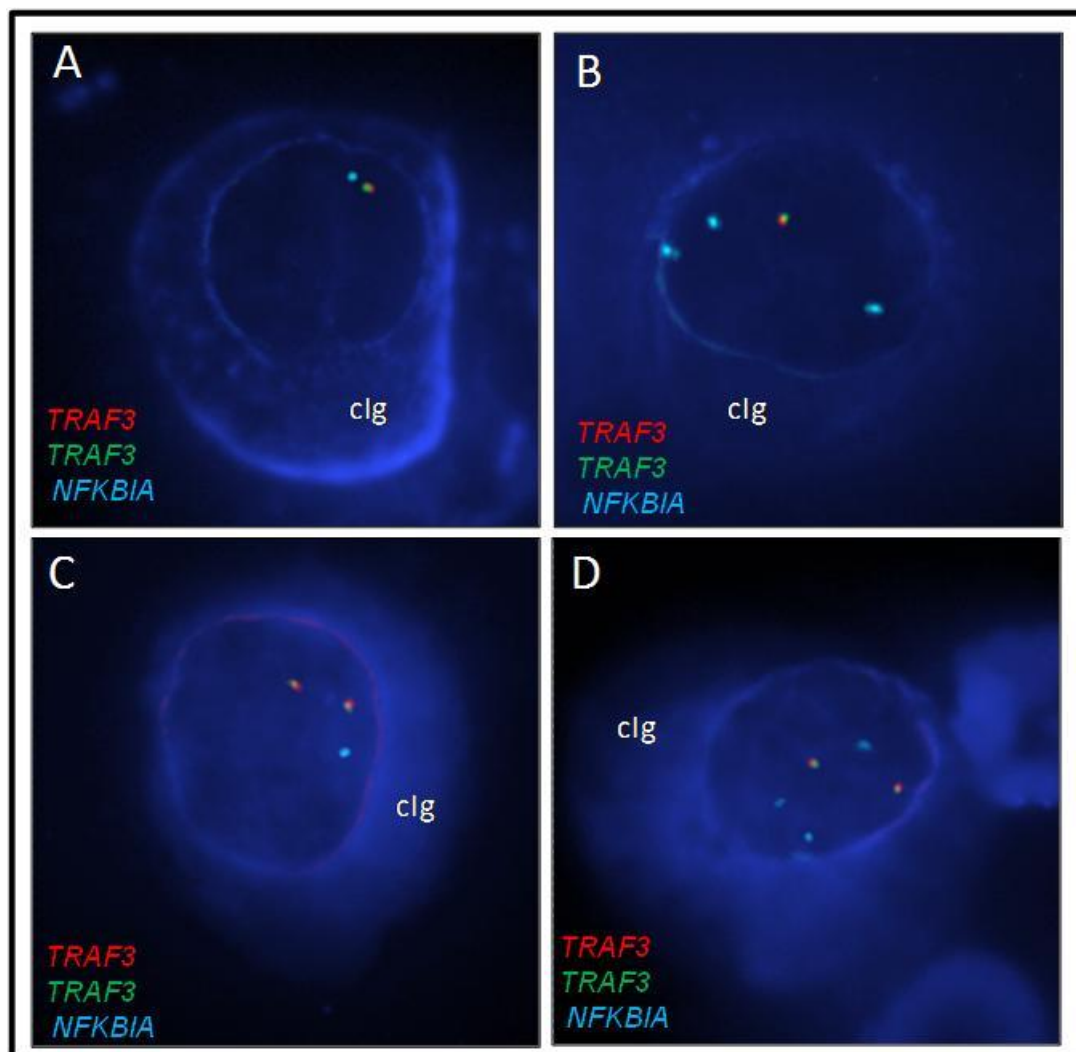


Figura 10. Análise por clg-FISH da deleção no gene *TRAF3* em pacientes com MM. Em aqua, *NFKBIA*; em vermelho, *TRAF3* (BAC) e em verde, *TRAF3* (fosmídeo). a) caso com deleção monoalélica em *TRAF3* e em *NFKBIA*; b) caso com deleção monoalélica de *TRAF3* e 3 cópias de *NFKBIA*; c) caso com deleção monoalélica em *NFKBIA*; d) caso com 3 cópias do gene *NFKBIA*.

5.1.7 Deleções no genes *BIRC2/3* e *CYLD*

Para a análise do gene *BIRC2/3* e *CYLD* foram usadas sondas não-comerciais para as regiões de interesse. Para o gene *BIRC2/3* foi utilizado um fosmídeo localizado no cromossomo 11, e para o gene *CYLD*, um fosmídeo localizado no cromossomo 16. Visto que a trissomia do cromossomo 11 é frequente

no MM, foi utilizada uma sonda centromérica como controle do número de cópias deste cromossomo.

A hibridização das sondas em metáfases normais confirmou a localização cromossômica e a especificidade da banda de cada fosmídeo (figura 11).

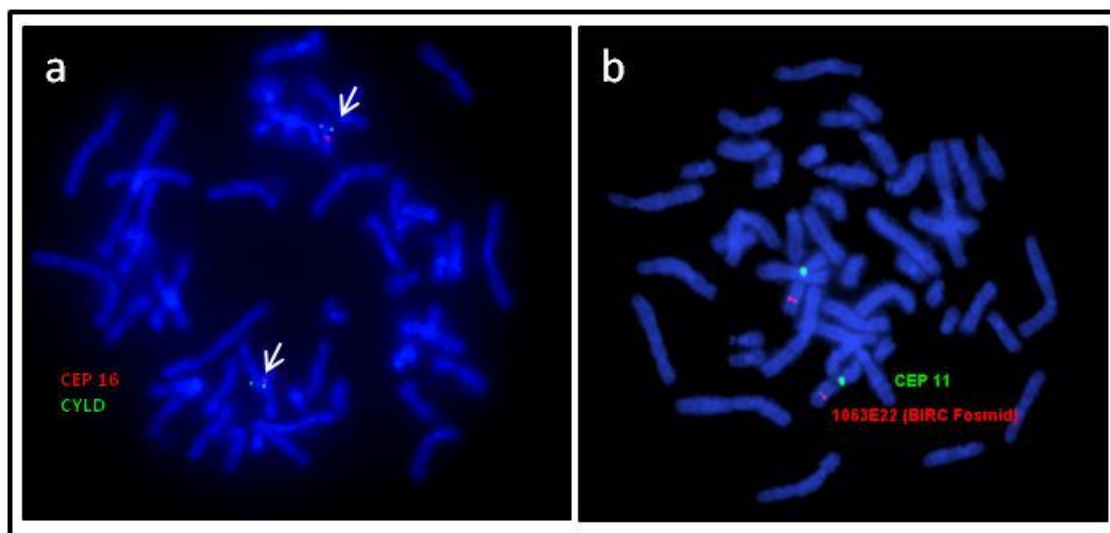


Figura 11. Análise de especificidade da sonda *BIRC2/3* e *CYLD* em metáfases normais. a) em vermelho CEP16 e em verde *CYLD*; b) em verde CEP11 e em vermelho *BIRC2/3*.

Quanto às alterações no gene *BIRC2/3*, foi detectado um caso (1/60 - 1,6%) com deleção bialélica (figura 12) e dois casos (2/60 - 3,3%) com deleções monoalélicas, (medianas de alteração nas células plasmáticas de 100% e 82%, intervalo de 78-86, respectivamente). Treze pacientes (21,6%) apresentaram trissomia do cromossomo 11. A mediana da percentagem de células plasmáticas com a trissomia foi de 87% (intervalo de 74-93). Dentre estes, em um paciente (1,6%) foram detectadas 6 cópias do gene *BIRC2/3*.

A deleção monoalélica do gene *CYLD* foi detectada em 4 (6,6%) pacientes (figura 13), mediana 98% das células (intervalo 97-99).

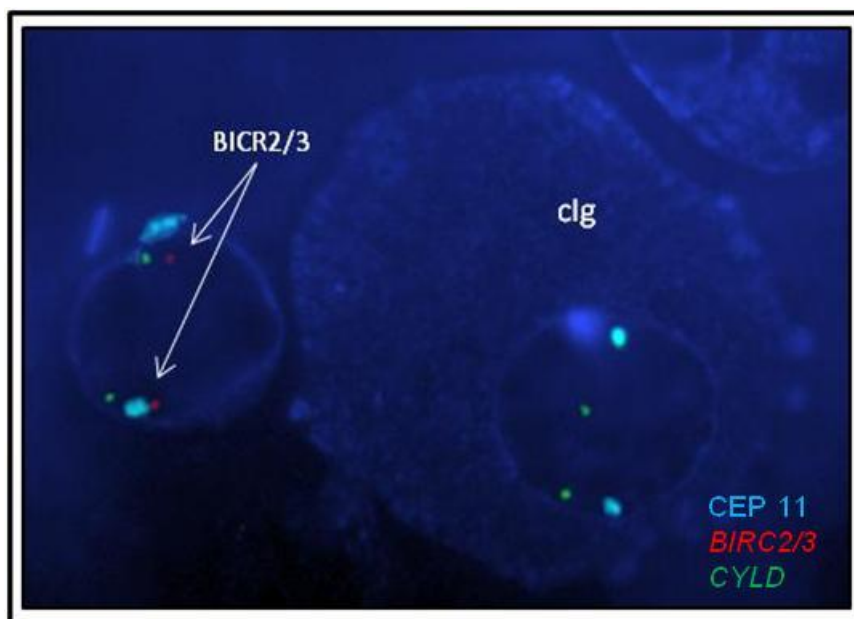


Figura 12. Análise por clg-FISH da deleção nos genes *BICR2/3* e *CYLD* em pacientes com MM. Caso com deleção bialélica de *BIRC2/3* (célula esquerda maçada por clg), confirmado pela presença da marcação citoplasmática e duas marcações específicas em aqua representado o CEP11, ausência de marcação vermelha de *BIRC2/3* e duas marcações verdes representado *CYLD*.

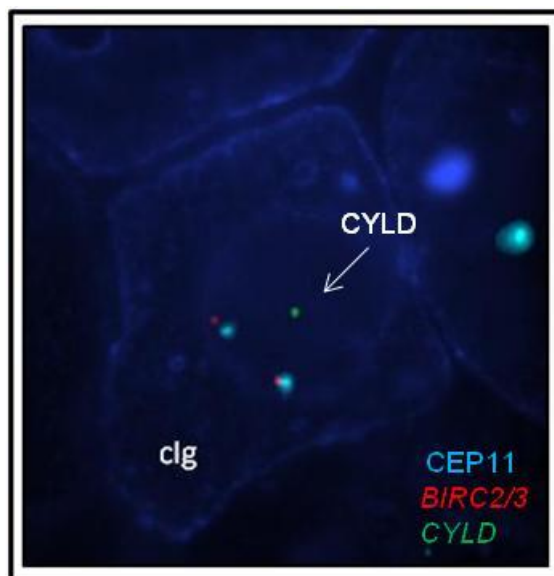


Figura 13. Análise por clg-FISH da deleção do gene *BICR2/3* e *CYLD* em pacientes com MM. Caso com deleção monoalélica de *CYLD*, confirmado pela presença de duas marcações específicas em aqua representado CEP 11, duas marcações em vermelho representado *BIRC2/3* e apenas uma marcação verde representado *CYLD*.

5.2 Associação entre as diferentes alterações genéticas

Com relação às alterações genéticas de valor prognóstico, houve sinergismo entre as translocações na região 14q32 e a deleção do cromossomo 13. Foi identificada uma associação estatisticamente significativa para a presença simultânea da del13q14 e a translocação envolvendo a região 14q32 ($p=0,003$). Quando considerado o parceiro envolvido na translocação, observou-se que a del13q14 esteve presente em 7/10 (70%) pacientes com a t(4;14)(p16;32), ($p=0,001$). Esta associação não foi verificada para casos com translocação da região 14q32 com outro parceiro além do cromossomo 4 ($p=0,22$).

Quanto às alterações envolvendo os genes da via NF-kB no grupo de pacientes estudados, não houve associação entre as diferentes alterações detectadas.

Por sua vez, foi observada uma associação estatística entre a presença concomitante da deleção monoalélica em *TRAF3* e da t(4;14) ($p=0,001$). Como relatado anteriormente, 4/5 casos com deleção monoalélica de *TRAF3* apresentaram deleção monoalélica *NFKBIA* indicando a presença da monossomia do cromossomo 14 nesses casos.

Em um caso foi observada a co-existência de deleções monoalélicas em *TRAF3*, *BIRC2/3* e *CYLD*, da trissomia do cromossomo 11 e da presença de 3 cópias do gene *NFKBIA*.

5.3 Variação genômica intraclonal

Durante o estudo das alterações nos genes da via NF- κ B foram identificados pacientes com variação genômica intraclonal. A variação intraclonal é um fenômeno resultante da evolução cariotípica ou genética de diferentes subclones neoplásicos que pode ser detectada pela identificação de alterações comuns a todas as células, acompanhadas da presença de alterações particulares em frequências variáveis.

Nesse estudo, observamos um caso de variação intraclonal envolvendo os genes *TRAF3* e *NFKBIA*, que apresentou 63% dos plasmócitos com o genótipo de 3 cópias de *NFKBIA* e um segundo subclone com deleção monoalélica de *NFKBIA* (figura 14). Deve ser ressaltado que, neste subclone, além da variação no número de cópias de *NFKBIA* foi detectado apenas um sinal de co-localização dos BAC e fosmideo do gene *TRAF3* (figura 14). A segunda cópia do gene foi caracterizada por uma separação dos sinais correspondentes ao BAC e fosmideo, sugerindo a presença de algum evento genético desconhecido, como por exemplo, uma translocação envolvendo *TRAF3*.

O fenômeno de variação intraclonal foi mais comum em relação aos genes *BIRC2/3* e *CYLD*. Na coorte estudada, foram detectados 13 casos com trissomia do cromossomo 11 (21,6%) e dentre estes, 36,3% (4/11) apresentaram apenas 2 cópias dos genes *BIRC2/3*, indicando perda alélica ou monossomia parcial, com uma mediana de plasmócitos contendo a alteração de 47% (intervalo de 37-56).

Além disso, houve um caso tetraplóide para o cromossomo 11, sem perdas de cópia dos genes *BIRC2/3* (52% dos plasmócitos) e um segundo subclone diplóide, mas com ganho de cópia de *BIRC2/3* e deleção monoalélica de *CYLD* em 32% dos plasmócitos (figura 15). Com relação a *CYLD*, um caso apresentou ganho

de cópia e deleção monoalélica do gene em 34% e 23% dos plasmócitos, respectivamente.

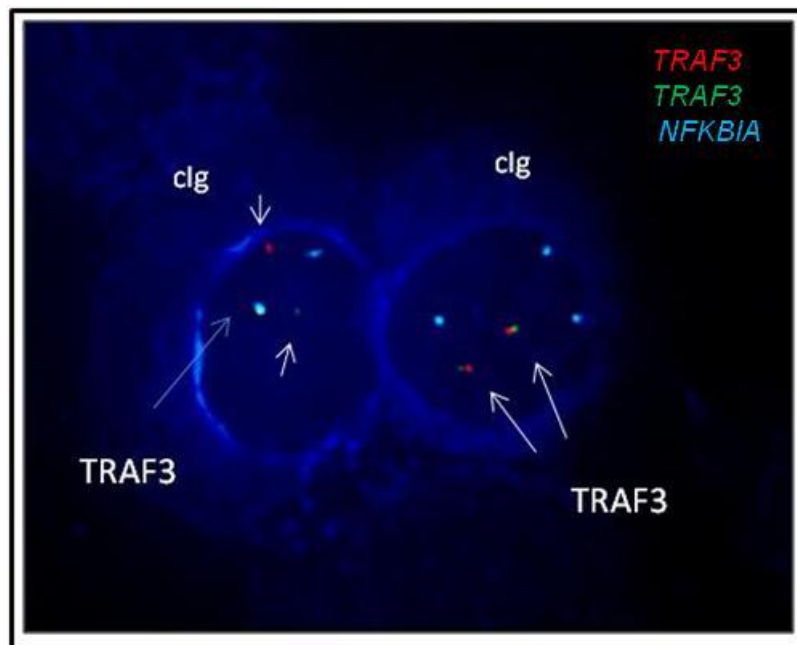


Figura 14. Variação intraclonal detectada por clg-FISH em pacientes com MM. Em aqua *NFKBIA*, em vermelho *TRAF3* (BAC) e em verde *TRAF3* (fossímideo). Subclone com deleção monoalélica em *NFKBIA* e apenas uma sobreposição do BAC e fossímideo (esquerda); subclone com 3 cópias de *NFKBIA* e duas sobreposições (direita).

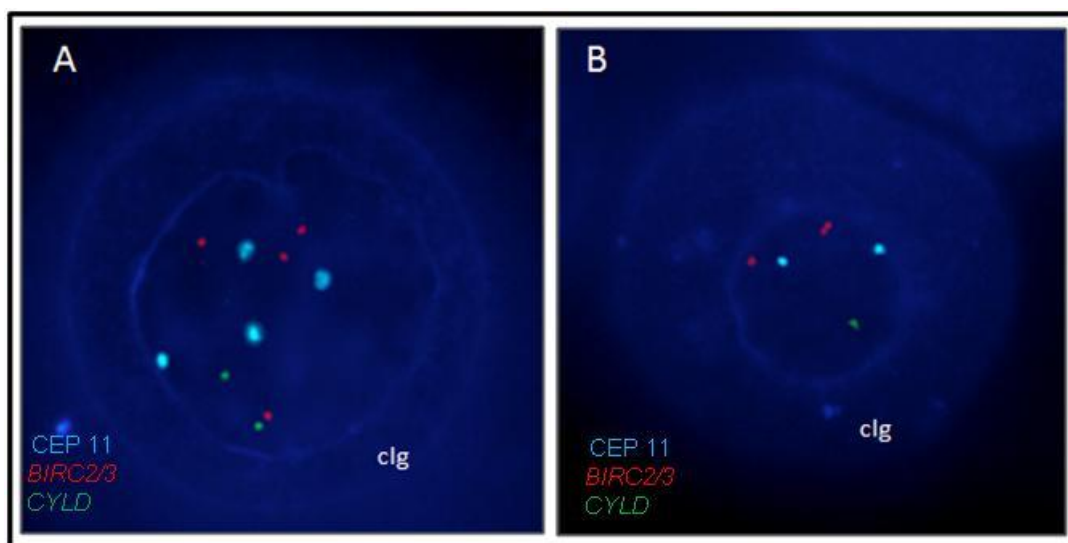


Figura 15. Variação intraclonal detectada por clg-FISH em pacientes com MM. Em aqua *CEP 11*, em vermelho *BIRC2/3* e em verde *CYLD*; a) subclone com tetraploidia do cromossomo 11, 4 cópias de *BIRC2/3* e 2 sinais de *CYLD*; b) subclone com 2 cópias do cromossomo 11, 3 cópias de *BIRC2/3* e 2 cópias de *CYLD*.

5.4 Análise da região mais comumente deletada (MDR) do gene *TRAF3*

Como estratégia para definir a MDR do gene *TRAF3*, decidimos por analisar o banco de dados públicos do MMRC, oriundo de um estudo de número de cópias por aCGH realizado em 238 pacientes com MM. Utilizando esta base de dados, 8 de 238 (3,3%) casos apresentaram deleção bialélica no gene *TRAF3* (tabela 4). A presença de deleção monoalélica foi observada em 21% (50/238) dos casos. Todavia, quando analisamos os casos com base na porcentagem de células com a alteração, 30 casos (12,6%) observados possuíam deleção monoalélica em $\geq 50\%$ das células e 20 (8,4%) em 100% das células (tabela 6).

Tabela 6. Freqüência de deleções genômicas em *TRAF3* no estudo do MMRC e porcentagem de células alteradas.

Alteração	N	Porcentagem de células alteradas	
		$\geq 50\%$	100%
deleção bialélica	8	-	8 (3,3%)
deleção monoalélica	50	30 (12,6%)	20 (8,4%)

Os eventos monoalélicos e bialélicos foram diferentes quanto ao tamanho (tabela 5). As deleções monoalélicas, com exceção de 3 casos, distribuíram-se ao longo da região do gene enquanto o comprimento médio das deleções bialélicas foi de 69.9 kb (15.5 – 131 Kb). A freqüência das deleções ao longo da região estudada foi homogênea quando considerados todos os eventos, entretanto, ao serem analisados apenas os eventos bialélicos, foi identificada uma região de 58.5 kb que inclui a maioria das deleções (tabela 7).

Tabela 7. Esquema da região mais comumente deletada em TRAF3 (MDR) com base nos eventos de deleção recorrentes em pacientes.

Sonda aCGH	Localização cromossômica (bp)	Perda (% pacientes)		Score		Tamanho (kb)	
		1N/0N	0N	1N/0N	0N		
A_16_P20167707	chr14:102315705	23.9	0.4	59	2		
A_16_P20167727	chr14:102323325	23.9	0.4	59	2		
A_14_P107550	chr14:102330794	23.9	0.8	60	4		
A_16_P20167753	chr14:102341854	23.5	1.2	60	6		
A_16_P02987518	chr14:102347733	23.5	1.2	60	6		
A_16_P20167773	chr14:102353726	23.5	1.2	60	6		
MDR2	A_14_P115714	chr14:102359343	23.5	6.3	62	10	15.5
	A_16_P20167827	chr14:102369626	23.5	6.3	62	10	
	A_16_P20167839	chr14:102374893	23.9	6.3	61	8	
	A_16_P40314349	chr14:102380290	23.9	6.3	63	10	
	A_16_P20167853	chr14:102385244	23.9	6.3	63	10	
MDR1	A_16_P20167868	chr14:102401445	23.9	6.3	63	10	37.6
	A_14_P118576	chr14:102408026	23.9	7.5	64	12	
	A_16_P20167911	chr14:102417934	23.9	6.3	63	10	
	A_16_P20167931	chr14:102425021	23.5	1.6	61	8	
	A_16_P20167957	chr14:102433457	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P40314496	chr14:102442060	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P40314515	chr14:102447174	23.5	1.2	60	6	

*eventos monoalélicos e bialélicos ** apenas eventos bialélicos

Assim, um sistema de “score” foi utilizado para melhor definir a MDR. Após análise das sondas presentes em toda a extensão do gene, foi atribuído um valor de pontos a cada alteração encontrada. Ao final, a soma dos valores foi realizada e as regiões com maior pontuação foram ordenadas de acordo com este valor. Pelo sistema de score, os eventos de deleção bialélica e monoalélica definiram uma MDR

no gene *TRAF3* que compreendeu uma região de 37,6 kb (chr14: 102380290-102417934), incluindo 5 sondas consecutivas (MDR1, tabela 5 e figura 16). Embora a região 102408026 (sonda A_14_P118576, tabela 5) tenha obtido uma pontuação superior em pontos as demais, esta diferença foi ocasionada por um único caso. Ao analisarmos somente os eventos com deleção bialélica, a região MDR1 se conservou, entretanto, uma segunda região com 15,5 kb foi identificada (MDR2, tabela 5 e figura 16).

Para inferir o desempenho da estratégia de FISH com as duas sondas empregadas em relação às regiões MDR por aCGH, foram analisadas as regiões com deleção monoalélica e bialélicas em relação à cobertura das duas sondas. Se a estratégia de FISH fosse empregada nos casos analisados por aCGH, as deleções monoalélicas seriam detectadas com 99% de especificidade e 88% de sensibilidade, sem diferenças entre o BAC e o fosmídeo. Contudo, para a detecção das deleções bialélicas, a sensibilidade de detecção seria menor, de 60% e 37%, respectivamente, para o BAC e o fosmídeo.

Durante as análises, foi constatado que a região MDR1 não poderia ser detectada pela estratégia de FISH utilizada, visto que a região está localizada entre as duas regiões abrangidas pelo BAC e pelo fosmídeo. Além disso, é provável que um caso (caso 2, MMRC0277, figura 16) com deleção de uma região de 21 Kb, dentro da região MDR1, não seria detectado por ambos, BAC e fosmídeo.

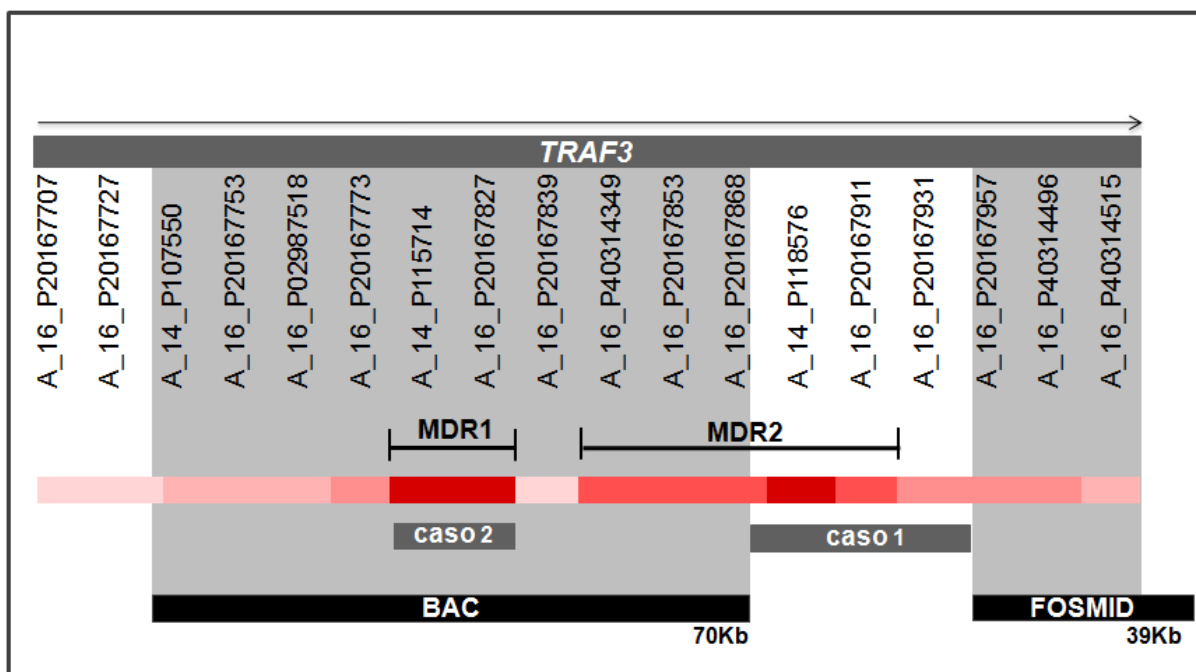


Figura 16. Desenho esquemático das regiões deletadas em *TRAF3* e da localização das sondas de aCGH e FISH. A seta indica a direção de transcrição do gene. A distribuição das sondas de aCGH na região genômica de *TRAF3* é mostrada. A região mais comumente deletada (MDR) de *TRAF3* é descrita em vermelho e as outras regiões em escala de cores. As caixas cinza indicam a posição de cada sonda de FISH. As caixas amarelas indicam 2 casos do MMRC com deleções bialélicas em *TRAF3* detectadas por aCGH, que não seriam detectadas pela estratégia de FISH, conduzindo a um resultado falso negativo.

Em outro caso (caso 1, MMRC0401, figura 16), a deleção compreendeu um fragmento de 21 Kb, dentro da região MDR2 e coberta pela sonda do BAC. Esta deleção tem o tamanho e suficiente para ser detectado por aCGH, mas pela estratégia do FISH, representaria uma perda de somente um terço da região coberta pela sonda, e por isto, provavelmente não haveria perda do sinal, levando a um resultado falso negativo .

A análise da localização genômica dos ambos os eventos, monoalélicos e bialélicos, demonstrou que na maior parte dos casos de deleção monoalélica a região deletada compreende uma grande parte do gene *TRAF3*, podendo ser detectada facilmente pela técnica de FISH utilizada neste estudo. No entanto, com

relação os eventos bialélicos, foi possível identificar 3 casos que por FISH não seriam detectados (figura 16).

6 DISCUSSÃO

Os pacientes com MM constituem um grupo muito heterogêneo em relação às suas características clínico-biológicas e evolução clínica. A tentativa de reduzir esta heterogeneidade pela definição de subgrupos genético-moleculares objetiva a identificação de fatores prognósticos para a estratificação dos pacientes com MM a partir do diagnóstico. Com o conhecimento advindo do entendimento das vias celulares operantes na doença, espera-se que estes fatores possam ser utilizados para a escolha da melhor opção terapêutica e do momento de introduzir a terapia escolhida.

A existência de subgrupos de risco, baseados em uma combinação de alterações citogenéticas identificadas pela técnica de FISH foi proposta por Fonseca *et al.*, (2003a). A presença das alterações adversas, t(4;14); Δ 13q14; t(14;16) e Δ 17p13, esteve associada a uma sobrevida menor em pacientes com MM tratados com quimioterapia de altas doses e transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. Entretanto, com a utilização de novas drogas no tratamento do MM, como o Bortezomibe e a Lenalidomida, o valor adverso de algumas destas alterações citogenéticas pode ser total ou parcialmente revertido (Kumar *et al.*, 2006; Sagaster *et al.*, 2007).

Como ponto de partida deste trabalho, caracterizamos a natureza e a frequência de alterações genéticas, de acordo com um painel mínimo por FISH para avaliação das alterações com valor prognóstico definido no MM, entre elas a deleção das regiões 13q14 e 17p53 e as translocações 14q32, especialmente t(4;14). A translocação t(14;16), atualmente incluída no grupo de alterações de “alto risco” no MM, não foi analisada por se apresentar uma frequência extremamente baixa.

A frequência da detecção das alterações foi coincidente com os achados da literatura. Uma alteração, quando positiva, foi identificada em uma alta frequência de células plasmáticas com medianas de células alteradas superior a 83%. Este fato foi indicativo da qualidade das análises realizadas e da importância da detecção das alterações utilizando-se o clg-FISH, desenhado para a detecção das alterações somente em células plasmáticas, evitando assim o efeito dilucional de células normais. Em nosso estudo, confirmamos a associação entre a presença da t(4;14) e a deleção do cromossomo 13 como sugerido por Avet-Loiseau *et al.*, (2002), Chang *et al.*, (2004) e Braggio (2006).

Embora uma grande instabilidade genômica seja característica do MM, as alterações detectadas com o painel mínimo de FISH foram caracterizadas pela presença destas alterações na maioria das células clonais, indicando seu papel primário na patogênese da doença e sua seleção positiva para o clone neoplásico, independente da história de evolução clonal pré-maligna.

Em contraste, painéis mínimos de FISH propostos recentemente (Fonseca *et al.*, 2009) sugerem a análise da deleção do 17 em várias fases da doença por estar este marcador associado à instabilidade genômica e representar um evento patogênico crucial na aquisição do fenótipo agressivo.

Os resultados deste trabalho devem ser interpretados tendo-se em conta as suas limitações. Em primeiro lugar, nosso estudo foi realizado em uma coorte pequena de pacientes. Por esta razão não foi possível validar o valor prognóstico das alterações estudadas em nossa coorte. Por outro lado, o tempo mediano de acompanhamento dos pacientes foi relativamente curto, não favorecendo a análise do impacto de alterações citogenéticas-moleculares na sobrevida global dos subgrupos de pacientes.

O foco principal deste trabalho foi a caracterização da via NF-kB no MM por citogenética molecular. Alterações genéticas na via NF-kB constitui um dos mais promissores marcadores biológicos em diversas neoplasias (Compagno *et al.*, 2009; Braggio *et al.*, 2009; Novak *et al.*, 2009; Schmitz *et al.*, 2009; Puvvada *et al.*, 2010).

Recentemente, dois estudos destacaram o papel crucial da via de sinalização NF-kB na patogênese do MM e identificaram uma frequência significativa de alterações nos genes reguladores da via (Annunziata *et al.*, 2007; Keats *et al.* 2007). Esta questão foi aqui abordada pela análise com clg-FISH dos genes *TRAF3*, *BIRC2*, *BIRC3*, e *CYLD*, que parecem ser, dentre os reguladores da via NF-kB, os mais afetados por eventos genéticos deletérios.

Em nosso estudo, analisamos a deleção de *TRAF3* em 60 pacientes com MM ao diagnóstico. Identificamos a deleção monoalélica do gene em 8,3% dos casos. Esta frequência foi similar a encontrada em uma série previamente publicada de pacientes por clg-FISH (9,2%) (Keats *et al.*, 2007). Em nossa coorte não identificamos deleções bialélicas, entretanto, estas foram identificadas em 3,2% dos casos por Keats *et al.*, (2007). Esta discordância em relação aos eventos bialélicos pode ter sido ocasionada por duas razões: Em primeiro lugar, o tamanho de nossa coorte, inferior ao único estudo anterior que apresentou dados de frequência de deleções de *TRAF3* (60 pacientes vs. 158 na coorte estudada por Keats *et al.*). Em segundo lugar, a frequência menor de deleções bialélicas em nosso grupo pode ter ocorrido em razão aos pacientes estudados por nós serem recém diagnosticados, enquanto que na série publicada foram também incluídos pacientes refratários. Mutações nos genes da via NF-kB foram identificadas em 40% LCPs e aproximadamente 17% dos pacientes com MM (Carrasco *et al.* 2006; Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007). Visto que a prevalência de mutações na via NF-kB

parece ser substancialmente maior nas LCPs quando comparada ao tumores, alguns autores tem sugerido que as mutações na via NF-kB representam eventos secundários na patogênese do MM e estariam relacionadas a vias moleculares de progressão da doença (Hideshima *et al.*, 2009; Demechenko *et al.*, 2010). Nossos achados, relativos a variação genômica intraclonal, apóiam esta idéia.

O gene *NFKBIA* localizado próximo ao centrômero, foi usado como controle de número de cópias do cromossomo 14. Contudo, a presença de casos com 3 cópias do gene (5%) e casos com deleção monoalélica (3,3%), principalmente na ausência de alterações em *TRAF3*, demonstram que *NFKBIA* pode não ter representado um boa estratégia de controle da monossomia do cromossomo 14 frente a instabilidade detectada neste estudo. O gene *NFKBIA* é um regulador negativo da via NF-kB. Isto pode explicar, pelo menos em parte, as alterações encontradas em nossos casos. Polimorfismos em *NFKBIA* foram associados à predisposição ao MM e a progressão da doença (Spink *et al.*, 2007). No entanto, alterações genéticas em *NFKBIA* foram pouco descritas na literatura. A mediana de células plasmáticas com alteração (62%) em *NFKBIA* sugere que estas podem ser ocasionadas pela instabilidade do clone maligno e não como condição para ativação da via NF-kB. O fato de que no estudo de Keats *et al.* (2007) a freqüência de alterações em *NFKBIA* não foi maior apóiam a idéia de que as alterações neste gene seriam um reflexo da instabilidade genômica no cromossomo 14 mais do que produto da seleção para um fenótipo agressivo.

Quanto as alterações no gene *BIRC2/3*, em nossa coorte identificamos 1 caso com deleção bialélica (1,6%). Na serie previamente publicada por Keats *et al.* (2007), a deleção bialélica em *BIRC2/3* foi identificada em 26,6% dos casos analisados por clg-FISH e em 1,6% dos casos analisado por aCGH. É provável que

esta maior frequência de deleções detectadas por *clg*-FISH possa ter ocorrido por um viés de seleção ocasionado pela inclusão de pacientes com níveis de expressão de *BIRC2/3* muito abaixo da média.

Deleções bialélicas do regulador negativo *CYLD* não foram detectadas neste estudo, provavelmente, pela baixa frequência desta alteração no MM (1,6%) (Keats *et al.*, 2007; Annunziata *et al.*, 2007). A menor frequência de deleção monoalélica detectada na coorte estudada neste trabalho (6,6%), em comparação com a literatura (50%) pode ser explicada em razão de que os 30 pacientes analisados por Keats *et al.* (2007) formavam parte de um grupo de casos com baixa expressão gênica por GEP ou apenas 1 cópia por aCGH.

A análise global das alterações envolvendo os genes da via NF- κ B mostrou que estas se apresentaram com uma frequência de 28% no grupo de pacientes estudados, e não houve associação entre as diferentes alterações detectadas. Por sua vez, foi observada uma associação estatística entre a presença concomitante da translocação (4;14) e da deleção monoalélica em *TRAF3* ($p=0,001$). Além disso, nossos dados mostraram que 4/5 casos possuíam apenas uma cópia do gene *NFKB1A*, sugerindo uma monossomia do cromossomo 14.

Este trabalho apresenta pela primeira vez este resultado, que levanta algumas hipóteses interessantes. A t(4;14)(p16.3;q32.33) é uma translocação balanceada em 70% dos casos cujo pontos de quebra ocorrem quase exclusivamente nas regiões de “switch” de classe da imunoglobulina. Em aproximadamente 25% dos casos parece ocorrer uma translocação desbalanceada com perda do der(14), indicando instabilidade intrínseca durante o processo mutacional.

O gene *TRAF3* está localizado em 14q32.33 a 1,3 Mb do gene de IgH e foi recentemente identificado como supressor de tumor no MM (Keats *et al.*, 2007) e entre os genes reguladores da via NF- κ B, é o gene descrito como a maior prevalência de alterações (Demchenko *et al.*, 2010). Embora seja desconhecida a razão pelas quais alterações em *TRAF3* são predominantes, é possível que a presença de *TRAF3* no cromossomo 14, um dos cromossomos mais instáveis no MM, e principalmente no grupo não-hiperdiplóide, possa contribuir para a alta prevalência de mutações no gene. Devido a seu papel como regulador negativo de uma via crítica para a biologia do MM, como a via não canônica NF- κ B, estas alterações podem ser selecionadas positivamente em um subgrupo de MM. Reforçando a existência de eventos locais de instabilidade, recentemente foi descrito um conjunto de linfomas B com inativação bialélica de *TRAF3* que tinha ocorrido devido a deleção intersticial do cromossomo 14 segmento q24.1q32.33 (Nagel *et al.*, 2009).

Em nosso grupo de pacientes, deleções bialélicas em *TRAF3* (14q32.33) não foram identificadas. Entretanto, a associação entre a presença de t(4;14) e deleção monoalélica de *TRAF3* permite levantar a hipótese de que os eventos genômicos na região possam ocasionar uma inativação do outro alelo de *TRAF3*, levando a uma inativação bialélica funcional. Estudos de mecanismos de inativação do segundo alelo, como fatores epigenéticos (metilação de DNA, acetilação de histonas) ou genéticos (mutações, microdeleções, inversões gênicas) poderão ajudar na obtenção de suporte experimental para a hipótese.

O objetivo de identificar a região mais comumente deletada em *TRAF3* teve o objetivo duplo de descrever pela primeira vez a existência de uma ou mais regiões que possam ser constantemente afetadas por alterações no gene, assim como de

servir como ferramenta para avaliar a eficácia potencial da estratégia de FISH empregada. Para tanto, um banco de dados públicos do MMRC, oriundo de um estudo de número de cópias por aCGH realizado em 238 pacientes com MM foi escolhido para análise. Esta escolha foi baseada em primeiro lugar, na utilização de células plasmáticas nos ensaios e no tamanho da coorte estudada, superior aos estudos anteriores. Em segundo, a alta resolução do estudo, que possibilitou um espaço médio entre cada sonda de 8,9 Kb, conferindo uma resolução de 17.8 Kb quando utilizado um filtro de duas sondas consecutivas.

A frequência de deleção bialélica (3,3%) e deleção monoalélica (8,4%) identificados por nós durante a análise deste banco de dados foi similar à descrita na literatura (Keats *et al.*, 2007). Duas MDRs foram identificadas em *TRAF3*. A primeira, MDR1 com 37,6 Kb é comum a todos os eventos deletoriais e uma segunda região, MDR2, com 15,5 Kb foi identificada por conter as deleções bialélicas. Os eventos bialélicos e monoalélicos foram diferentes quanto a extensão e por esta razão, as deleções bialélicas foram mais informativas para a identificação de MDRs.

Como este foi o segundo estudo a descrever as alterações de *TRAF3*, um questionamento válido é se a estratégia de FISH adotada seria capaz de detectar deleções em *TRAF3* com a mesma sensibilidade e especificidade da técnica de aCGH. De forma marcante, descobrimos que a MDR1 no gene *TRAF3* não era coberta por ambas as sondas, na estratégia de FISH utilizada. Isso poderia explicar a baixa sensibilidade do FISH em comparação ao aCGH, principalmente para os eventos bialélicos, não relatados em nosso estudo.

Outro ponto fundamental foi a discrepância de sensibilidade na detecção de eventos bialélicos entre a sonda composta pelo fosmídeo e pelo BAC. Esta discrepância pode ser atribuída ao tamanho do BAC (70 Kb) e conseqüentemente, a

uma menor sensibilidade para a detecção de deleções de tamanhos menores, quando comparada ao fosmídeo (39 Kb). Outro ponto fundamental é possibilidade do BAC de conduzir a resultados falsos positivos. É importante ressaltar que, a MDR2 está situada dentro da extensão do BAC e durante as nossas análises, foi identificado um caso, dentre os estudados no banco de aCGH analisado, cuja deleção (21Kb) se situa dentro da região compreendida pelo BAC.

A estratégia proposta por Keats *et. al.* (2007) e testada por nós nesse estudo, vem sendo empregada no estudo de alterações em *TRAF3* no MM e em outras neoplasias (Braggio *et al.*, 2009). Nossos dados indicam que a estratégia de FISH ideal para análise de alterações em *TRAF3* precisa cobrir toda a extensão do gene. Nós propomos, baseados em nossos achados, uma combinação de 3 sondas de FISH para análise de *TRAF3*, incluindo um fosmídeo (G248P85085H7, 39 Kb) às duas já validadas. Esta terceira sonda, situada entre as outras duas, poderia aumentar significativamente a sensibilidade da técnica de FISH, frente a estratégia anterior de duas sondas.

Desta maneira, os resultados deste trabalho providenciam uma base para o desenvolvimento de uma estratégia mais eficiente para a detecção de deleções em *TRAF3* por FISH. A técnica do FISH além de ser amplamente empregada, é uma metodologia validada para fins diagnósticos e, possui a vantagem da facilidade e rapidez da sua realização além do baixo custo quando comparada as técnicas de alta resolução como o aCGH.

Este é o segundo trabalho, após o estudo de Keats *et. al.* (2007) a investigar deleções nos genes reguladores da via NF-kB *TRAF3*, *BIRC2/3*, *CYLD* e *NFKBIA* em pacientes com MM. Nós encontramos uma associação significativa ($p=0,01$) entre a t(4;14) e eventos de deleção monoalélica em *TRAF3*, com concomitante

monossomia do cromossomo 14. Estes achados sugerem que estes eventos sejam resultando da instabilidade no cromossomo 14 e estejam relacionados. Além de provar a causalidade desta associação, estes resultados obrigam a pensar num possível sinergismo entre estas alterações, por exemplo em relação à resposta a quimioterápicos específicos. É possível pensar que a presença de deleções de *TRAF3* (tida como favorável) acompanhando a t(4;14) (tida como negativa) seja um fator de confusão na determinação do valor prognóstico destas alterações na resposta ao bortezomibe.

7 CONCLUSÕES

Nós confirmamos a existência de subgrupos genéticos baseados na presença das alterações citogenéticas: deleção das regiões 13q14 e 17p53 e as translocações para a região 14q32 em particular a t(4;14).

Foi identificada uma associação entre a t(4;14) e a presença de deleção monoalélica em *TRAF3*.

As diferenças constatadas na frequência de deleções nos reguladores negativos da via NF- κ B e, principalmente em *TRAF3*, podem ser ocasionadas pela baixa sensibilidade da estratégia de FISH empregada.

Foram identificadas as duas regiões mais comumente deletadas no gene *TRAF3*, o que pode servir de base para o desenvolvimento de uma estratégia de detecção de deleções em *TRAF3* mais eficiente, utilizando uma estratégia de análise por cIg-FISH com 3 sondas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Annunziata, C.M., Davis, E.R., Demchenki, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F. et al. Frequent Engagement of the Classical and Alternative NF- κ B Pathways by Diverse Genetic Abnormalities in Multiple Myeloma. *Cancer Cell* 2007; 12:115-30.
2. Anguiano A, Tuchman SA, Acharya C, Salter K, Gasparetto C, Zhan F, et al. Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2009; 27(25):4197-203.
3. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, San-Miguel, J. et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009; 27:4585-90.
4. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood*. 2007; 109(8):3489-95.
5. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, et al. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002; 99:2185–91.
6. Basseres, D. S., Baldwin, S. Nuclear factor- κ B and inhibitor of κ B Kinase pathway in oncogenic initiation and progression. *Oncogene* 2006, 25: 6817-30.
7. Baldwin RM, Garratt-Lalonde M, Parolin DA, Krzyzanowski PM, Andrade MA, Lorimer IA. Protection of glioblastoma cells from cisplatin cytotoxicity via protein kinase C α -mediated attenuation of p38 MAP kinase signaling. *Oncogene* 2006; 25(20):2909-19.
8. Bergsagel PL, Kuehl M. Molecular Pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6333–8.
9. Bergsagel P, Chesi M, Nardini E, Brents LA, Kirby SL, Khehl WM. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:13931–6.
10. Braggio E, Maiolino A, Gouveia ME, Magalhães R, Souto Filho JT, Garnica M, et al. Methylation status of nine tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Int J Hematol* 2010; 91:87-96.

11. Braggio E, Keats JJ, Leleu X, Van Wier S, Jimenez-Zepeda VH, Valdez R, et al. Identification of copy number abnormalities and inactivating mutations in two negative regulators of nuclear factor-kappaB signaling pathways in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Cancer Res* 2009; 69(8):3579-88.
12. Braggio, E. Alterações citogenéticas e epigenéticas no Mieloma Múltiplo e sua aplicação como potencial valor prognóstico. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. 2010; 206p.
13. Brown SA, Ghosh A, Winkles JA. Full-length, membrane-anchored TWEAK can function as a juxtacrine signaling molecule and activate the NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2010 Apr 13. [Epub ahead of print]
14. Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*. 2003 Aug 14;424(6950):797-801.
15. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, Zhang Y, Sinha R, Feng B, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 2006; 9(4):313-25.
16. Chang H, Li D, Zhuang L, Nie E, Bouman D, Stewart AK, Chun K. Detection of chromosome 13q deletions and IgH translocations in patients with multiple myeloma by FISH: comparison with karyotype analysis. *Leuk Lymphoma* 2004;45(5):965-9.
17. Chesi M, Bergsagel P, Shonukan O, Martelli M, Brents L, Chen T, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998b; 91:4457-63.
18. Chesi M, Nardini E, Brents L, Schrock E, Ried T, Kuehl W, et al. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 1997; 16:260-4.
19. Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL, Kuehl WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20(4): 571-96. Review.
20. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 2006; 25(51):6831-43. Review.
21. Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 1994; 8: 758-67.

22. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, et al. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature*. 2009;459(7247):717-21.
23. Dao D, Sawyer J, Epstein J, Hoover RG, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia* 1994; 8:1280-4.
24. Debes-Marun C, Dewald G, Bryant S, Picken E, Santana-Dávila R, González-Paz N, et al. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 2003; 17:427-36.
25. Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. Classical and/or alternative NF{kappa}B pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 2010; 115(17):3541-52.
26. Desikan R, Barlogie B, Sawyer J, Ayers D, Tricot G, Badros A, et al. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 2000; 95:4008-10.
27. Dewald G, Kyle R, Hicks G, Greipp P. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985; 66:380-90.
28. Dewald G, Therneau T, Larson D, Lee Y, Fink S, Smoley S, et al. Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma. *Blood* 2005; 106:3553-8.
29. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, Fonseca R, Lacy MQ, Bergsagel PL. et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc*. 2007; 82(3):323-41.
30. Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Huber H. The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126:441-7.
31. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Kromer E, Schuster R, Gisslinger H, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 1998; 92:802-9.
32. Durie BG, Harousseau JL., Miguel JS, Bladé J, Barlogie B, Anderson K, et al. International Myeloma Working Group. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20(9):1467-73.

33. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Genevieve F, Zandecki M, et al. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta-2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001; 97: 1566–71.
34. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shaughnessy J, Gutierrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23(12):2210-21. Review.
35. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, et al. Genetics and Cytogenetics of Multiple Myeloma: A Workshop Report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546–58.
36. Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken M, Kyle R, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood* 2003a; 101:4569–75.
37. Fonseca R, Debes-Marun C, Picken E, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003b; 102:2562–7.
38. Fonseca R, Harrington D, Oken M, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, et al. Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) Study. *Cancer Res* 2002; 62:715–20.
39. Fonseca R, Oken M, Greipp P. The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Blood* 2001;98: 1271–2.
40. Gertz M, Lacy M, Dispenzieri A, Greipp P, Litzow M, Henderson K, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005; 106:2837–40.
41. Gilmore, T.D. Multiple Myeloma: Lusting for NF- κ B. *Cancer Cell* 2007; 12:95-97.
42. Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(11): 837-48. Review.
43. Greipp PR. Eastern Cooperative Oncology Group E1A00: phase III randomized study of dexamethasone with or without thalidomide in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2003; 1(3):188-9.

44. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, Mateos MV, Hernández JM, Fernández M, et al. GEM/PETHEMA Spanish Group. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007; 21(1):143-50.
45. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple Myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; 91:3–21.
46. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 2008; 132(3):344-62. Review.
47. Hideshima T., Ikeda H., Chauhan D., Okawa Y., Raje N., Podar K. et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009; 114(5):1046-52.
48. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104:607-18.
49. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem*. 2002; 277(19): 16639-47.
50. Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L, Nunes R, Bittencourt R, Oliveira LC, Faria RM, Pasquini R, Magalhães SM, Souza CA, Pinto Neto JV, Barreto L, Andrade E, Portella Mdo S, Bolejack V, Durie BG; International Myeloma Working Group Latin America. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2008 May;93(5):791-2.
51. Ito CY, Kazantsev AG, Baldwin AS Jr. Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(18):3787-92.
52. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121(5):749-57.
53. Liao CH, Sang S, Liang YC, Ho CT, Lin JK. Suppression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in downregulating nuclear factor-kappa B pathway by Garcinol. *Mol Carcinog* 2004; 41(3):140-9.

54. Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10): 749-59. Review.
55. Karin M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J Sci Am* 1998; 4 Suppl 1: S92-9. Review.
56. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12 (2):131-44.
57. Keats J, Reiman T, Maxwell C, Taylor BJ, Larratt LM, Mant MJ, et al. In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 2003; 101:1520-9.
58. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* 2003; 424(6950):801-5.
59. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23(1):3-9. Review
60. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962-72. Review.
61. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351(18):1860-73. Review.
62. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002 ;2(3):175-87. Review.
63. Kumar S, Rajkumar SV. Thalidomide and lenalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Eur J Cancer* 2006;42(11):1612-22. Review.
64. Magrangeas F, Lodé L, Willeme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H. Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia* 2005;19(2):191-4. Review.
65. Markovina S, Callander NS, O'Connor SL, Kim J, Werndli JE, Raschko M, et al. Bortezomib-resistant nuclear factor-kappaB activity in multiple myeloma cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6(8):1356-64.
66. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fässler R. Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell* 2006;125(4): 665-77.

67. Matsushima A, Kaisho T, Rennert PD, Nakano H, Kurosawa K, Uchida D, et al. Essential role of nuclear factor (NF)-kappaB-inducing kinase and inhibitor of kappaB (IkappaB) kinase alpha in NF-kappaB activation through lymphotoxin beta receptor, but not through tumor necrosis factor receptor I. *J Exp Med* 2001;193(5):631-6.
68. Mazars G, Portier M, Zhang X, Jourdan M, Bataille R, Theillet C, et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene* 1992; 7:1015–8.
69. McConkey DJ, Zhu K. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 2008; 11(4-5):164-79. Review.
70. Moreaux J, Veyrune JL, De Vos J, Klein B. APRIL is overexpressed in cancer: link with tumor progression. *BMC Cancer* 2009; 16:9-83.
71. Moreau P, Attal M, Garban F, Hulin C, Facon T, Marit G, et al. Heterogeneity of t(4;14) in multiple myeloma. Long-term follow-up of 100 cases treated with tandem transplantation in IFM99 trials. *Leukemia* 2007; 21(9):2020-4.
72. Moreau P, Facon T, Leleu X, Morineau N, Huyghe P, Harousseau JL, et al. Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 2002; 100:1579–83.
73. Mosley JD, Keri RA. Splice variants of mlAP1 have an enhanced ability to inhibit apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348(3):1174-83.
74. Nagel I, Bug S, Tönnies H, Ammerpohl O, Richter J, Vater I, et al. Biallelic inactivation of TRAF3 in a subset of B-cell lymphomas with interstitial del(14)(q24.1q32.33). *Leukemia* 2009; 23(11):2153-5.
75. Novak U, Rinaldi A, Kwee I, Nandula SV, Rancoita PM, Compagno M, et al. The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood*. 2009;113(20):4918-21.
76. Palumbo A, Dimopoulos M, San Miguel J, Harousseau JL, Attal M, Hussein M, et al. Lenalidomide in combination with dexamethasone for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Rev*. 2009; 23(2):87-93. Review.
77. Piva R., Penolazzi L., Borgatti M., Lampronti I., Lambertini E., Torreggiani E. et al. Apoptosis of human primary osteoclasts treated with molecules targeting nuclear factor-kappaB. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1171:448-56. Review.
78. Podar K, Anderson KC. A therapeutic role for targeting c-Myc/Hif-1-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 2010; 9 (9):345-48.

79. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia*. 2009; 23(1):10-24. Review.
80. Ponnappan U. Regulation of transcription factor NF kappa B in immune senescence. *Front Biosci*. 1998 Feb 1;3:d152-68. Review.
81. Puvvada SD, Funkhouser WK, Greene K, Deal A, Chu H, Baldwin AS, Tepper JE, O'Neil BH. NF-kB and Bcl-3 Activation Are Prognostic in Metastatic Colorectal Cancer. *Oncology*. 2010 Apr 23;78(3-4):181-188
82. Regamey A, Hohl D, Liu JW, Roger T, Kogerman P, Toftgard R, et al. The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J Exp Med* 2003; 198(12): 1959-64.
83. Richelda R, Ronchetti D, Baldini L, Cro L, Viggiano L, Marzella R, et al. A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 1997; 90:4062–70.
84. Richardson P, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Chauhan D, et al. The treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2007; 3:317-23.
85. Roccaro AM, Vacca A, Ribatti D. Bortezomib in the treatment of cancer. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2006;1(3):397-403. Review.
86. Sagaster V, Ludwig H, Kaufmann H, Odelga V, Zojer N, Ackermann J, et al. Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of a chromosome 13q-deletion. *Leukemia* 2007;21(1):164-8.
87. Sankar S, Chan H, Romanow WJ, Li J, Bates RJ. IKK-i signals through IRF3 and NFkappaB to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cell Signal*. 2006 Jul;18(7):982-93.
88. San-Miguel J, Mateos MV, Gutierrez NC. Risk stratification in the era of novel therapies. *Cancer J* 2009;15(6): 457-64.
89. San-Miguel J, Mateos MV, Gutierrez NC. Risk stratification in the era of novel therapies. *Cancer J*. 2009; 15(6): 457-64.
90. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 2008a; 359(9): 906-17.

91. San-Miguel J, Harousseau JL, Joshua D, Anderson KC. Individualizing treatment of patients with myeloma in the era of novel agents. *J Clin Oncol*. 2008b; 26(16): 2761-6. Review.
92. Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swankowski J, et al. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998; 101: 189-94.
93. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, McCoy J, Tricot G, Jacobson J, et al. Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II. *Br J Haematol* 2003; 120: 44–52.
94. Schilling G, Hansen T, Shimoni A, Zabelina T, Pérez-Simón JA, Gutierrez NC, et al. Impact of genetic abnormalities on survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Leukemia*. 2008; 22(6): 1250-5.
95. Schultheis B, Kramer A, Willer A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Hehlmann R. Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia* 1999; 13: 2099–103.
96. Smadja N, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 2229–38.
97. Spink CF, Gray LC, Davies FE, Morgan GJ, Bidwell JL. Haplotypic structure across the I kappa B alpha gene (NFKBIA) and association with multiple myeloma. *Cancer Lett* 2007; 246(1-2):92-9.
98. Xiao G, Sun SC. Negative regulation of the nuclear factor kappa B-inducing kinase by a cis-acting domain. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21081-5.
99. Tabertero D, Miguel JS, Garcia-Sanz M, Najera L, Garcia-Isidoro M, Perez-Simon JA, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosomespecific probes. *Am J Pathol* 1996; 149: 153–61.
100. Tai YT, Li XF, Breitkreutz I, Song W, Neri P, Catley L, et al. Role of B-cell-activating factor in adhesion and growth of human multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment.
101. Trudel S, Li Z, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, et al. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4;14) multiple myeloma. *Blood* 2005; 105: 2941–8.

102. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:693-733. Review.
103. Varfolomeev E, Goncharov T, Fedorova AV, Dynek JN, Zobel K, Deshayes K et al. c-IAP1 and c-IAP2 are critical mediators of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha)-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* 2008; 283(36): 24295-9.
104. Xiao, G., Harhaj, E.W., Sun, S.C. NF-kB inducing kinase regulates the processing of NF-kB2 p100. *Molecular Cell* 2001; 7: 401-09.
105. Whiteside ST, Israël A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997; 8(2): 75-82. Review.
106. Whiteside ST, Israël A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol.* 1997 Apr;8(2):75-82. Review.
107. Yin L, Wu L, Wesche H, Arthur CD, White JM, Goeddel DV, Schreiber RD. Defective lymphotoxin-beta receptor-induced NF-kappaB transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 2001; 291(5511): 2162-5.
108. Zandecki M., Lai J., Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 1996; 94: 217–27.
109. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, Dempsey PW, Cheung HH, He J, et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 2008; 9(12):1371-8.
110. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; 108(6): 2020-8.
111. Zojer N, Konigsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Kromer E, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000; 95: 1925–30

Anexo I.

Artigo referente a dissertação submetido MS ID#: HAEMATOL/2010/028217

TRAF3 deletions in Multiple Myeloma: considerations about detection

Priscilla Segges¹, Jonathan J. Keats², Esteban Braggio², Rafael Fonseca², Rocio Hassan¹, Angelo Maiolino³, Ilana R. Zalcberg¹

1 Laboratory of Molecular Biology, Bone Marrow Transplantation Center, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

2 Comprehensive Cancer Center, Mayo Clinic Arizona, Scottsdale, AZ 85259, USA

3 Department of Internal Medicine, Hematology Service, University Hospital, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running Title: TRAF3 deletions in multiple myeloma

Acknowledgements: The authors would like to thank the technical contributions of Scott VanWier. This work was supported by grants from FAPERJ (Grant 2007.4315.3; Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Rio de Janeiro, Brazil) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil). P.S work in the Mayo Clinic was supported by an scholarship from Janssen-Cilag Farmaceutica, Brazil.

Correspondence: Rocio Hassan. Instituto Nacional de Câncer – INCA. Praça da Cruz Vermelha 23, 6th floor, 20230-130, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. e-mail: biomol@inca.gov.br . Tel: +55 21 2506 6506; Fax: +55 21 2506 6217

Abstract

Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3) has been described as a tumor suppressor gene and is the most commonly affected gene of the NF- κ B pathway in MM. TRAF3 genomic status was investigated in group of 60 MM patients by clg-FISH, using selected BAC and fosmid probes. We found 8.3% cases with a monoallelic deletion, while biallelic deletions were not detected. Analysis of an additional MM dataset of array-CGH results identified two most commonly deleted regions (MDR), not completely covered by the present FISH approach. MDR1 comprises a 37.6 kb region, including biallelic/monoallelic deletions, while MDR2 encompasses 15.5 kb, and included only biallelic deletions. Ours is the second study of TRAF3 status in MM patients and shows that FISH exhibits a low sensitivity to detect biallelic deletions in TRAF3 gene, setting the basis for developing a more efficient FISH strategy that could be useful for clinical investigation.

Key words: Multiple myeloma; TRAF3, FISH, most commonly deleted region

Introduction

Multiple Myeloma (MM) is a plasma cells disorder characterized by a wide variety of genetic and chromosomal abnormalities.^{1,2} Recently, two studies highlighted the key role of NF- κ B signaling pathways in MM pathogenesis by showing recurrent abnormalities in regulators genes leading to the constitutive activation of NF- κ B pathways, which is required for the growth of MM tumor cells.^{4,5} Tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 (TRAF3), a negative regulator of the non-canonical NF- κ B pathway, was the most commonly affected gene and its tumor suppressor activity was confirmed in a MM in vitro model.⁴ Furthermore, an inverse correlation between TRAF3 expression and the clinical response to bortezomib, a proteasome inhibitor thought to downregulate the NF- κ B pathway, was reported.⁴

Since the NF- κ B pathways, and particularly TRAF3, seem to be important targets for therapeutic intervention in MM,⁶ we sought to investigate TRAF3 copy-number abnormalities in a MM cohort.⁷ We also determined the most commonly deleted region of TRAF3, based on copy number data obtained by aCGH (array-based comparative genomic hybridization), and compared its detection rate with data obtained using clg-FISH.

Design and Methods

Bone marrow samples were collected from 60 newly diagnosed MM patients. Diagnosis and treatment were done in the context of a phase 3 Multicenter Clinical Trial coordinated by the Brazilian Working Group on Onco-Hematology (GEMOH),⁷ after informed consent of patients and approval from the institutional Ethics Committees at each participating center. FISH analysis was performed by cytoplasmic immunoglobulin (clg) staining coupled with FISH (clg-FISH) as previously described.⁸

Briefly, specific DNA probes for the region of interest were used from selected BAC (CTD3325; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and fosmid (w12959M11; BACPAC Resources Center) clones. Each probe was tested to normal metaphase preparations to confirm chromosome and band specificity. A near-centromeric probe (CTD3214F11; BACPAC Resources Center) was used in all hybridizations to define chromosome 14 copy number.

The most commonly deleted regions of TRAF3 were defined by analysis of aCGH data from an unpublished MM cohort. The 244A platform (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA) was used in aCGH experiments. The abnormalities were

calculated using a two-probe log 0.25 filters and aberration detection modules (ADM) 1 algorithm.

Results and Discussion

TRAF3 deletion was analyzed in 60 MM patients by clg-FISH. We detected 5/60 (8.3%) cases with monoallelic deletion. This frequency was similar to what was found in a previously published series of patients by clg-FISH (9.2%)⁴. Based on our aCGH dataset, monoallelic TRAF3 deletion was detected in 8.4% of cases (Table 1). TRAF3 biallelic deletions were detected in 3.2% and 3.3% of cases in Keats et al⁴ and the unpublished dataset, respectively. In our series of Brazilian patients, biallelic deletions were not detected.

Next, the question whether the FISH strategy used by us and others would be able to detect TRAF3 deletions with the same sensitivity and specificity than the aCGH strategy was raised.

Since the exact place where the most commonly deleted regions in TRAF3 remained undefined, we aimed to establish an algorithm to define these regions, using the copy number dataset. We choose this dataset as reference, because assays were performed in a 244A microarray with median probe spacing of 8.9 Kb, leading to a resolution of 17.8 Kb when a two-probe filter was used.

In an attempt to define TRAF3 most commonly deleted regions, a score system was built up by attributing different numerical values to each alteration found. We assigned a score of 1 for monoallelic events, and a score 2 for biallelic events. A final score was calculated as Σ score value / n, for each one of the TRAF3 probes used in the aCGH assay.

Monoallelic and biallelic events differed in size (Table 2). Monoallelic deletions, with the exception of 3 cases, comprise the whole gene region. On the other hand, the

average size of biallelic deletions was of 69.9 kb (15.5 – 131 Kb). Thus, biallelic deletions were more informative in defining the most frequently deleted region. Applying our score system and considering all deletional events, a region of 37.6 kb (chr14: 102380290-102417934) which includes 5 consecutive probes was defined as the TRAF3 minimal deleted region 1 (MDR1; Table 2 and Figure 1). Within MDR1, region 102408026 (probe A14-P118576) obtained a higher score, this difference was due to one case and included only one probe set. When only biallelic deletion events were considered, a second MDRs was identified in a region comprising at least 15.5 kb (chr14:102359343-102369626) (MDR2 in Table 2 and Figure 1).

Subsequently, we inferred, from aCGH results, the probable detection rates which would be obtained by FISH analysis. Monoallelic deletions would have been detected with a 99% of specificity and 88% of sensitivity by FISH (with no differences between BAC and fosmid probes). By contrast, the sensitivity for biallelic deletions would fall to 60% and 37% (for fosmid and BAC probes, respectively). In addition to the lower resolution of FISH compared with aCGH analysis, one of the factors affecting sensitivity might be the large BAC size, which would lead to an increased frequency of false negative results and consequently to a poor sensitivity to detect small deletions, when compared with the fosmid (39 Kb). It is important to highlight that MDR1 is located at the end of the BAC covered region of ~25 kb and MDR2 is found within the BAC region.

In case#1 the FISH approach would not be able to detect a deletion since the deleted region comprises a region located between, and uncovered by both, the BAC and Fosmid probes (Figure 1). In case#2, the deletion comprised a 21 kb fragment within the most commonly deleted region covered by the BAC (MDR2). It is very likely that

this 21 kb deletion would not be detected by FISH, leading to a false negative result (Figure 1). Of note, the MDR1 was not covered by any of two FISH probes.

This is the second report, after Keats et al. 2007,³ to investigate TRAF3 deletion by FISH in MM patients (Table 1). The differences in frequency of TRAF3 biallelic deletions observed in our cases might, at the moment, be explained by a combination of the lack of sensitivity of the FISH approach and the smaller number of cases reported by us.

Based on the analysis herein exposed, that showed that the 2-probes FISH approach would exhibit a low sensitivity to detect TRAF3 biallelic deletions when compared with aCGH, we propose a combination of three FISH probes for TRAF3 analysis, including fosmid (G248P85085H7) to the two aforementioned probes. This probe is located between the other two and would significantly improve the sensitivity of the FISH approach, compared with the 2-probes strategy.

Therefore, our results provide a basis to develop a more efficient FISH strategy to detect TRAF3 deletions, which is most relevant considering that FISH is a widespread, validated methodology for diagnostic purposes, compared with high resolution technologies such as aCGH, which technical complexity and high costs prevent its wide application in the clinical setting. The improved FISH approach could be useful for both, clinical investigation of TRAF3 status in MM patients at diagnosis and molecular description of TRAF3 variability in patient series.

Authorship and Disclosures:

PS, JJK and EB contributed to the conception of the study and performed the laboratory work, analysis and interpretation of the data. IZR, AM, RH and RF coordinated the research, contributing to the conception and design of the study. PS,

RH, and IZR wrote the paper. All authors revised and approved the last version of the manuscript. The authors reported no potential conflicts of interest.

References

1. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, et al. The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 2003;102 7:562-7.
2. Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 2004;104 3:607-18.
3. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, Attal M, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009; 27 27:4585-90.
4. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schopp R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12 2:131-44.
5. Annunziata CM, Davis ER, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007;12 2:115-30.
6. Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. Classical and/or alternative NF{kappa}B pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 2010; 115 17:3541-52.
7. Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L, et al International Myeloma Working Group Latin America. Confirmation of the utility of the

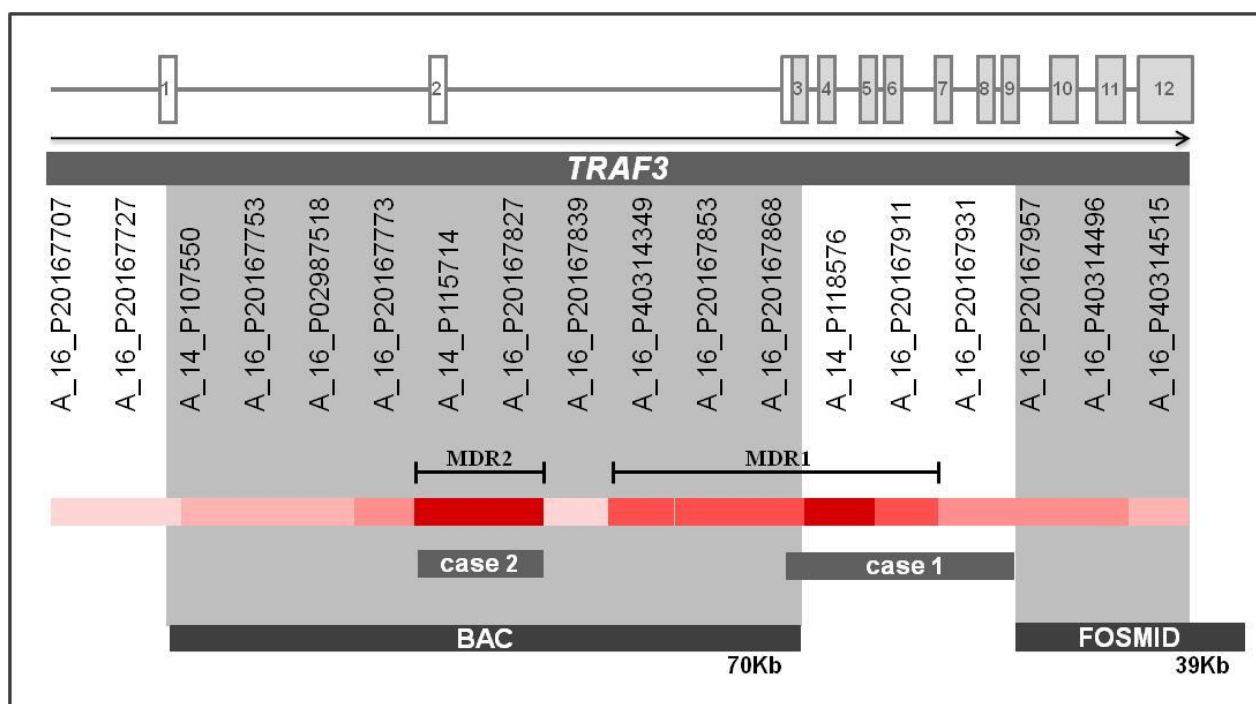
International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2008; 93 5:791-2.

8. Ahmann GJ, Jalal SM, Juneau AL, Christensen ER, Hanson CA, Dewald GW, et al. A novel three-color, clone-specific fluorescence in situ hybridization procedure for monoclonal gammopathies. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 101:7-11.

9. Laubach JP, Mahindra A, Mitsiades CS, Schlossman RL, Munshi NC, Ghobrial IM, et al. The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2009;23 12:2222-32.

Figure legend

Figure1. Scale diagram of the deleted regions in *TRAF3* and localization of FISH probes. The arrow indicates the direction of transcription the gene. The position of each aCGH probe in *TRAF3* genomic region is shown. *TRAF3* most commonly deleted regions (MDR1 and 2) are indicated by bars. Solid black boxes indicate the position of each FISH probe. Cases 1 and 2 indicate the physical position of the deletion events in two cases with *TRAF3* biallelic deletions detected by aCGH, and likely false negatives by the FISH analysis.



Tables

Table 1. Summary of the reported frequency of genomic deletions in *TRAF3*

Study	No. of Patients	Assay	Number of Gene Copies		
			2N/3N/4N (%) [*]	1N (%) [*]	0N (%) [*]
Keats et al. 2007 ³	68	aCGH	54 (87.1)	6 (9.7)	2 (3.2)
	158	FISH	133 (84.2)	19 (9.2)	6 (3.8)
Unpublished aCGH dataset	238	aCGH	180 (75.3)	50 (21.0)	8 (3.3)
This Study	60	FISH	55 (91.6)	5 (8.3)	0 (0.0)

^{*}N represents the copy gene number detected in analyses.

Table 2. Delineation of TRAF3 most commonly deleted regions (MDR) based on recurrent deletions identified in patients

	aCGH Probe	Chromosome position (bp)	Loss* (% patients)		Score		Size (kb)
			All	Biallelic	All	Biallelic	
	A_16_P20167707	chr14:102315705	23.9	0.4	59	2	
	A_16_P20167727	chr14:102323325	23.9	0.4	59	2	
	A_14_P107550	chr14:102330794	23.9	0.8	60	4	
	A_16_P20167753	chr14:102341854	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P02987518	chr14:102347733	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P20167773	chr14:102353726	23.5	1.2	60	6	
MDR2	A_14_P115714	chr14:102359343	23.5	6.3	62	10	15.5
	A_16_P20167827	chr14:102369626	23.5	6.3	62	10	
	A_16_P20167839	chr14:102374893	23.9	6.3	61	8	
MDR1	A_16_P40314349	chr14:102380290	23.9	6.3	63	10	37.6
	A_16_P20167853	chr14:102385244	23.9	6.3	63	10	
	A_16_P20167868	chr14:102401445	23.9	6.3	63	10	
	A_14_P118576	chr14:102408026	23.9	7.5	64	12	
	A_16_P20167911	chr14:102417934	23.9	6.3	63	10	
	A_16_P20167931	chr14:102425021	23.5	1.6	61	8	
	A_16_P20167957	chr14:102433457	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P40314496	chr14:102442060	23.5	1.2	60	6	
	A_16_P40314515	chr14:102447174	23.5	1.2	60	6	

* Represents frequency of patients bearing deletions, by probe set

Anexo II.**Protocolo clínico de tratamento****FICHA DE ADMISSÃO (1)**

Instituição: _____

Nome Paciente: _____

Data de Nascimento: _____

Data de Confirmação do Diagnóstico: ___/___/___

Dados a serem preenchidos pela Central de Dados:**Nº do caso no estudo:** _____

FICHA DE DADOS CLINICOS (2)

Nome Paciente: _____ **Instituição:** _____ **UPN:** _____

Dt Nasc.: ___/___/___ **Sexo:** () M () F **Dt Diagn.:** ___/___/___

Subtipo do mieloma:

- Não secretor
- IgG
- IgA
- IgD
- IgE
- IgM
- Cadeia Leve Kappa
- Cadeia leve Lambda

Estadiamento de Durie - Salmon: (anexo 1)

- Estágio I
- Estágio II
- Estágio III
- A
- B

Estadiamento ISS: (anexo 2)

- Estágio I
- Estágio II
- Estágio III

Lesões líticas

- Sim
- Não

Dados laboratoriais no diagnóstico

Hemoglobina:

Leucócitos:

Plaquetas:

% de células plasmáticas na medula óssea:

Calcio sérico:

Albumina sérica:

Creatinina sérica:

Proteína monoclonal sérica (eletroforese):

Proteína monoclonal urinária (eletroforese):

Beta 2 microglobulina:

Médico: _____

Favor enviar no momento da inclusão no Protocolo

FICHA DE AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO INICIAL (3)

Nome do paciente:

Data de nascimento:

Instituição:

Caso:

Data da Avaliação

Tratamento:

() VAD . No de ciclos:

() Pulsos de dexametasona. No de ciclos:

() Dexametasona + Talidomida. Dose máxima de talidomida:

() Melfalano + Prednisona. No de ciclos:

() Melfalano + Prednisona + Talidomida. No de ciclos:

() Ciclofosfamida + Talidomida + Dexametasona: No de ciclos:

() Outro. Especificar..... : No de ciclos:.....

Toxicidade máxima (WHO)

	0	1	2	3	4	Data		0	1	2	3	4	Data
Leucócitos							Neutrófilos						
Plaquetas							Hemoglobina						
Pulmonar							Neuropatia						
Mucosite							Alopecia						
Cardíaca							Náusea/Vômito						
Alergia							Febre						
Infecção							TVP						

Resposta ao tratamento

Data da avaliação de resposta:

- Remissão completa com imunofixação negativa
- Remissão completa com imunofixação positiva
- Remissão parcial muito boa
- Remissão parcial
- Resposta mínima
- Sem resposta
- Progressão de doença
- Óbito

FICHA DE AVALIAÇÃO PÓS-TRANSPLANTE AUTOLOGO DE CTH (4)

Nome do paciente:

Data de nascimento:

Instituição:

Caso:

Data da Avaliação

Data da mobilização:

GCSF

CTX 4g + GCSF

CTX 3g+ GCSF

CTX 1,5 g + GCSF

Data do Transplante:

Mel 200

Mel 140

Mel 100

Toxicidade máxima (WHO)

	0	1	2	3	4	Data		0	1	2	3	4	Data
Leucócitos							Neutrófilos						
Plaquetas							Hemoglobina						
Pulmonar							Neuropatia						
Mucosite							Alopecia						
Cardíaca							Náusea/Vômito						
Alergia							Febre						
Infecção							TVP						

Resposta ao tratamento**Data da avaliação de resposta:**

- Remissão completa com imunofixação negativa
- Remissão completa com imunofixação positiva
- Remissão parcial muito boa
- Remissão parcial
- Resposta mínima
- Sem resposta
- Progressão de doença
- Óbito

**FICHA DE AVALIAÇÃO PÓS-TRATAMENTO DE CONSOLIDAÇÃO
/MANUTENÇÃO (5)**

Nome do paciente:

Data de nascimento:

Instituição:

Caso:

Data da Avaliação

Tratamento:

() Pulsos de dexametasona. No de ciclos:

() Dexametasona + Talidomida. Dose máxima de talidomida:

() Talidomida. No de ciclos:

() Ciclofosfamida + Talidomida + Dexametasona: No de ciclos:

() Outro. Especificar..... : No de ciclos:.....

Toxicidade máxima (WHO)

	0	1	2	3	4	Data		0	1	2	3	4	Data
Leucócitos							Neutrófilos						
Plaquetas							Hemoglobina						
Pulmonar							Neuropatia						
Mucosite							Alopecia						
Cardíaca							Náusea/Vômito						
Alergia							Febre						
Infecção							TVP						

Resposta ao tratamento

Data da avaliação de resposta:

- Remissão completa com imunofixação negativa
- Remissão completa com imunofixação positiva
- Remissão parcial muito boa
- Remissão parcial
- Resposta mínima
- Sem resposta
- Progressão de doença
- Óbito

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)