



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE MEDICINA

ANNA CAROLINE REIS DE SOUZA

**POTENCIALIDADE DOS MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO NA
IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE MIELOMA MÚLTIPLO: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA DA LITERATURA**

Barreiras-BA

2022

ANNA CAROLINE REIS DE SOUZA

**POTENCIALIDADE DOS MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO NA
IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE MIELOMA MÚLTIPLO: UMA REVISÃO
INTEGRATIVA DA LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB)
como requisito parcial para obtenção de título de
Bacharel em Medicina.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Larissa Paola Rodrigues
Venancio

Barreiras-BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S729 Souza, Anna Caroline Reis de.

Potencialidade dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce do Mieloma Múltiplo: uma revisão integrativa da literatura. / Anna Caroline Reis de Souza. – 2022.

65 f.

Orientador: Profª Drª Larrissa Paola Rodrigues Venâncio.

Monografia (Graduação) – Bacharelado em Medicina. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Gamopatias. 2. Neoplasias hematológicas. 3. Diagnóstico Molecular. 4. Espectrometria de Massa. I. Venâncio, Larrissa Paola Rodrigues. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 610



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
Centro das Ciências Biológicas e da Saúde
Curso de Medicina

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos **08** dias do mês de **dezembro** de **2022**, às **14h**, em sessão pública na sala **PD10** da Universidade Federal do Oeste da Bahia, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora **Larissa Paola Rodrigues Venancio** e composta pelos examinadores: **Prof. Dr. Arlindo Gomes de Macêdo Junior** e **Prof^a Dr^a Mary Hellen Fabres Klein**, a aluna **Anna Caroline Reis de Souza** apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Potencialidade dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce de mieloma múltiplo: uma revisão integrativa da literatura** como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Medicina. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **aprovação** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais examinadores.

Documento assinado digitalmente
gov.br LARISSA PAOLA RODRIGUES VENANCIO
Data: 12/12/2022 16:32:31-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Presidente da Banca Examinadora

Documento assinado digitalmente
gov.br Arlindo Gomes de Macedo Junior
Data: 08/12/2022 16:52:57-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador 01

Documento assinado digitalmente
gov.br MARY HELLEN FABRES KLEIN
Data: 12/12/2022 15:40:21-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinador 02

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por toda força e perseverança que me concedeu durante toda essa jornada para realização de um sonho.

Ao meu pai, Wanderley, o verdadeiro motivo deste trabalho. Ele que sempre lutou para que suas filhas tivessem tudo que precisavam para serem grandes mulheres. Referência de honestidade, organização e sabedoria me mostrou seu amor por meio do cuidado, suporte e incentivo para eu poder ser o que quiser, desde que fosse feliz. Obrigada por tudo, pai. De onde estiver, espero ter deixado o senhor orgulhoso. Te amo para sempre.

À minha mãe, Deuselia, que eu tanto amo. Obrigada pelo cuidado, colo e amor incondicional. Sem você ao meu lado eu não teria conseguido. Todas as minhas conquistas são suas conquistas também. Te amo muito.

Às minhas irmãs, Juliana e Thayse, e ao meu cunhado Neto, que por muitas vezes foram meus pais e mães, quando esses não podiam se fazer presentes. Obrigada por tudo que fizeram e por todo incentivo para eu poder chegar até aqui.

Aos meus grandes amigos, Cindy e Pedro, que viveram essa jornada comigo e estiveram ao meu lado nos melhores e nos piores momentos. Com quem eu dividi os medos, alegrias e inseguranças da faculdade e da vida. Obrigada pela cumplicidade, conforto, apoio e boas risadas. Vocês são incríveis, vou levar uma parte de vocês comigo para sempre.

À minha orientadora, Larissa, por toda a paciência, compreensão e todo aprendizado que compartilhou comigo. Levarei a sua dedicação, disciplina e excelência como referências para a profissional que quero me tornar um dia. Muito obrigada por tudo!

À Universidade Federal do Oeste da Bahia por ter me proporcionar todas as condições necessárias para me graduar no curso que sempre desejei, de forma gratuita e com qualidade. Espero um dia poder fazer parte do corpo docente e poder retribuir um pouco de todo o conhecimento que recebi durante esses 4 anos e que receberei nos 2 anos finais do curso. Muito obrigada!

SOUZA, A.C.R. Potencialidade dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce do Mieloma Múltiplo: uma revisão integrativa da literatura. Barreiras, 2022. 65p. **Monografia**. Bacharelado em Medicina, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia.

RESUMO

Mieloma Múltiplo (MM) é uma neoplasia maligna e incurável do sistema hematológico decorrente da disfunção plasmocitária da medula óssea, os quais promovem produção e secreção de imunoglobulinas do tipo IgG monoclonal, ou partes delas, chamadas de proteínas M. Devido ao seu caráter multissistêmico, os pacientes acometidos pela doença podem manifestar sintomas clássicos representados pela sigla “CRAB” (C: hipercalcemia, R: insuficiência Renal, A: anemia e B: lesões ósseas) ou por outros sintomas e sinais inespecíficos, o que fomenta atrasos e defasagens quanto ao seu diagnóstico, impactando no tratamento e sobrevida dos pacientes acometidos. Diante disso, urge a necessidade de avanço na área dos métodos diagnósticos de MM, a fim de contribuir para melhoria de acurácia deles, de modo a impactar positivamente o prognóstico dos pacientes acometidos. O objetivo desse estudo foi investigar propostas de detecção precoce de MM por meio de métodos moleculares de diagnóstico, analisando-os quanto a sua sensibilidade e especificidade, além de tornar evidente a sua importância para uso efetivo no protocolo de diagnóstico da doença. Nesse sentido, foi realizada uma revisão integrativa de literatura, buscando-se por estudos publicados em um período de 10 anos (2012-2021), nas principais bases de dados (PubMed, SciELO, LILACS e Cochrane). Foram incluídos estudos observacionais (transversais, caso-controle e coorte) e excluídos relatos de caso, revisões de literatura e estudos em desacordo com as recomendações preconizados pelo checklist STROBE. Além disso, foi utilizada três combinações de descritores obtidos via DeCS, para refinamento da busca: “Molecular diagnostic Techniques and multiple myeloma”, “Multiple myeloma and early diagnosis” e “Molecular diagnostic and multiple myeloma”. Foram selecionados 6 estudos que analisaram métodos diagnósticos distintos em amostras que compreendiam não somente portadores de MM, mas também de MGUS, SMM e doadores saudáveis. A detecção de microRNAs por PCR em tempo real (qRT-PCR) se mostrou como a mais sensível (97,4%) e a Espectrometria de Massa associada à Redes Neurais se mostrou a mais específica (95%). Além disso, a Imunofixação Sérica (IFS) e Eletroforese de Proteínas, como os métodos mais utilizados atualmente, se mostraram sensíveis e específicos, mas com precocidade cerca de 6,6 meses para IFS. A carência de publicações na área, principalmente, no viés diagnóstico, somado ao baixo conhecimento por profissionais médicos não hematologistas, atuaram como fatores limitantes desta pesquisa. A amostragem dos estudos investigados foi bastante variável, bem como os dados estatísticos obtidos, ficando 3 estudos com percentuais de sensibilidade e especificidade acima de 90%, dois estudos com percentuais em torno de 70% e um estudo não apresentou dados estatísticos nesse sentido. Nesse sentido, os resultados encontrados se mostraram promissores para o avanço diagnóstico precoce de MM. Espectrometria de Massa e detecção de microRNAs por RT-qPCR se mostraram os mais sensíveis, mas, ainda assim, os demais métodos também apresentaram potencial diagnóstico e de acompanhamento da doença. Ainda são necessários mais estudos que envolvam os métodos estudados para melhor verificação dos dados apresentados nesta pesquisa, que servirá de fonte de busca e análise para pesquisas futuras.

Palavras-chave: Gamopatias; Neoplasias hematológicas; Diagnóstico Molecular; Espectrometria de Massa; RT-qPCR.

SOUZA, A.C.R. Potentiality of molecular diagnostic methods in the early identification of multiple myeloma: an integrative literature review. Barreiras, 2022. 65p. **Monography**. Bachelor of Medicine, Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Western Bahia.

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is a malignant and incurable neoplasm of the hematological system resulting from plasma cell dysfunction of the bone marrow, which promotes the production and secretion of monoclonal IgG immunoglobulins, or parts thereof, called M proteins. Due to its multisystemic character, patients affected by the disease may manifest classic symptoms represented by the acronym “CRAB” (C: hypercalcemia, R: renal failure, A: anemia and B: bone lesions) or by other nonspecific symptoms and signs, which it promotes delays and delays in its diagnosis, impacting the treatment and survival of affected patients. Therefore, there is an urgent need to advance in the area of MM diagnostic methods, in order to contribute to improving their accuracy, in order to positively impact the prognosis of affected patients. The objective of this study was to investigate proposals for early detection of MM through molecular diagnostic methods, analyzing them in terms of their sensitivity and specificity, in addition to making evident their importance for effective use in the disease diagnosis protocol. In this sense, an integrative literature review was carried out, looking for studies published in a period of 10 years (2012-2021), in the main databases (PubMed, SciELO, LILACS and Cochrane). Observational studies (cross-sectional, case-control and cohort) were included and case reports, literature reviews and studies in disagreement with the recommendations recommended by the STROBE checklist were excluded. In addition, three combinations of descriptors obtained via DeCS were used to refine the search: “Molecular diagnostic Techniques and multiple myeloma”, “Multiple myeloma and early diagnosis” and “Molecular diagnostic and multiple myeloma”. Six studies were selected that analyzed different diagnostic methods in samples that included not only MM patients, but also MGUS, SMM and healthy donors. The detection of microRNAs by real-time PCR (qRT-PCR) proved to be the most sensitive (97.4%) and Mass Spectrometry associated with Neural Networks proved to be the most specific (95%). In addition, Serum Immunofixation (SFI) and Protein Electrophoresis, as the most used methods today, proved to be sensitive and specific, but with an early onset of about 6.6 months for SFI. The lack of publications in the area, mainly on the diagnostic bias, added to the low knowledge by non-hematologist medical professionals, acted as limiting factors of this research. The sampling of the investigated studies was quite variable, as well as the statistical data obtained, leaving 3 studies with percentages of sensitivity and specificity above 90%, two studies with percentages around 70% and one study did not present statistical data in this sense. In this sense, the results found were promising for advancing the early diagnosis of MM. Mass spectrometry and detection of microRNAs by RT-qPCR proved to be the most sensitive, but even so, the other methods also showed potential for diagnosis and monitoring of the disease. More studies are still needed involving the methods studied to better verify the data presented in this research, which will serve as a source of search and analysis for future research.

Keywords: Gamopathies; Hematologic Neoplasms; Molecular Diagnostics; Mass Spectrometry; RT-qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRALE Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia

AUC Area Under The Curve

BJ Bence Jones

CRAB Hipercalcemia, Insuficiência Renal, Anemia e Lesões ósseas

DeCS Descritores em Ciência da Saúde

EFS Eletroforese de Proteínas

EM Espectrometria de Massa

FISH Hibridização in situ por fluorescência

FLC Fração de Cadeia Leve livre

GM Gamopatia Monoclonal

Hb Hemoglobina

HC/UFPR Hospital das Clínicas/ Universidade Federal do Paraná

HD Doadores Saudáveis

HUSM Hospital Universitário de Santa Maria

IFS Imunofixação

LILACS Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da saúde

miRNAs MicroRNAs

MGUS Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado

MM Mieloma Múltiplo

NGS Sequenciamento de nova geração

qRT-PCR PCR em tempo real

ROC Receiver Operating Characteristics

SCIELO Scientific Electronic Library Online

SMM Mieloma Múltiplo Latente

STROBE Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology

VPP Valor Preditivo Positivo

VPN Valor Preditivo Negativo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição e referência dos estudos avaliados

Tabela 2 - Comparação entre as técnicas IFS e EFS para sensibilidade na detecção precoce de recidiva em nove pacientes com MM

Tabela 3 - Método diagnóstico estudado, amostra, resultados e conclusões dos estudos

Tabela 4 – Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN relacionados aos métodos evidenciados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Definição de Mieloma Múltiplo e seus distúrbios plasmáticos precursores

Figura 2 - Perfil eletroforético normal (A) e perfil eletroforético com pico monoclonal em paciente com Mieloma Múltiplo (B)

Figura 3 - Delineamento metodológico e sistema de identificação de trabalhos para análise

Figura 4 – Curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*) para comparar combinações de microRNAs

Figura 5 - Curva ROC da combinação de microRNAs e níveis séricos de Hb

Figura 6 - Percentual de pacientes com MM, SMM e MGUS com FLCr normal e com FLCr anormal

Figura 7 - Box and whisker plot de picos de m/z distintos encontrados nas amostras do grupo de treinamento

Figura 8 – Resultado das redes neurais na identificação do número de amostras de MM e HD utilizadas no estudo 4

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Epidemiologia do Mieloma Múltiplo e dificuldades no diagnóstico	14
2.2 Métodos diagnósticos existentes	17
3. JUSTIFICATIVA	21
4. OBEJTIVO	22
4.1 Objetivo Geral	22
4.2 Objetivos Específicos	23
5. METODOLOGIA	24
5.1 Desenho do Estudo	24
5.2 Tipo de Estudo	25
5.3 Coleta de dados	25
5.3.1 Fonte de busca de dados	25
5.4 Critérios de inclusão e exclusão	25
5.5 Estratégias de busca nas bases de dados	26
5.6 Descrição da coleta de dados	26
5.7 Avaliação Metodológica	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 Métodos diagnósticos identificados	32
7. CONCLUSÃO	47
8. REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE	52
ANEXOS	63

1. INTRODUÇÃO

Mieloma Múltiplo é uma neoplasia maligna incurável do sistema hematológico, causada por disfunção proliferativa clonal de plasmócitos na medula óssea, os quais promovem a produção e secreção de imunoglobulinas do tipo IgG monoclonal ou parte delas, chamadas de proteínas M, podendo ser identificadas no soro ou na urina, mas também em locais extramedulares ou sangue periférico durante a progressão da doença (GULLA, 2020).

Representando a segunda neoplasia hematológica mais comum e cerca de 1% de todas as neoplasias malignas, o Mieloma Múltiplo costuma se apresentar de forma inespecífica, sendo esse um dos principais fatores que dificultam o seu diagnóstico, piorando, conseqüentemente, o prognóstico dos pacientes acometidos (FAZEL, 2019).

A presença da proteína monoclonal sob o achado de “pico monoclonal” no soro e/ou urina do paciente, é o achado laboratorial encontrado por meio dos métodos moleculares, sendo a eletroforese de proteínas e imunofixação de urina 24h os mais utilizados para estadiamento correto da doença frente a outras gamopatias monoclonais, bem como para investigação e diagnóstico precoce do Mieloma Múltiplo (RAJKUMAR, 2022).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

Na história do Mieloma Múltiplo, acredita-se que o primeiro relato da doença tenha ocorrido em 1844, chamado na época de “ossio de molidades” por Samuel Solly. Após a autópsia dos dois pacientes observados por Solly, verificou-se que a medula óssea de ambos os pacientes foi substituída por uma substância vermelha preenchida com células grandes de aparência distinta. Além disso, o segundo paciente relatou que a sua urina enrijeceu suas roupas e por isso uma amostra foi enviada para exame pelo Dr. Henry Bence Jones, que evidenciou a urina semissólida que se liquefazia com aquecimento e se tornava viscosa quando resfriada. A partir disso, Bence Jones

enfatizou a importância da análise de amostras de urina no diagnóstico, prática que continua até hoje (BARWICK, 2019).

Sendo alvo de muitos estudos e tendo ainda muito a se esclarecer, o Mieloma Múltiplo não tem uma patogênese definida. Acredita-se que a doença se instale por alterações e desregulações de fatores endócrinos, vasculares, genéticos e metabólicos. O excesso de adiposidade, por exemplo, pode contribuir para aumento no risco de desenvolvimento da doença, devido ao estímulo de efeitos pró-inflamatórios sistêmicos ou advindos especificamente da medula óssea (HEIDER, 2021).

Porém, a temática tem sido estudada, principalmente, no âmbito genético, para tentar estabelecer correlações entre detecção de aberrações cromossômicas e diagnóstico da doença. Com isso, a compreensão precisa da patogênese molecular e da biologia de cada estado da doença é necessária para fomentar o desenvolvimento de novas e melhores ferramentas de diagnóstico e de novas abordagens terapêuticas (HEIDER, 2021).

Pacientes acometidos por essa neoplasia costumam apresentar sintomatologia vasta e, recorrentemente inespecífica; porém, alguns sintomas possuem relevância e são eles: fadiga, dor óssea, comumente referida na região lombar, anemia, insuficiência renal, hipercalcemia e fraturas ósseas não relacionadas à traumas físicos ou outra doença de base (FAZEL, 2019). Essa sintomatologia clássica, é comumente referida pela sigla “CRAB” (C: hipercalcemia, R: insuficiência renal, A: anemia e B: lesões ósseas) (SEESAGHUR, 2021). No entanto, por ser uma patologia do sistema hematológico e possuir caráter sistêmico, o Mieloma Múltiplo pode, também, causar disfunções extramedulares, ainda que somente em 3-5% dos casos, que geralmente envolvem a pele, nasofaringe, laringe, trato respiratório superior e sistema nervoso central (DIAS, 2018).

2.1 Epidemiologia do Mieloma Múltiplo e dificuldades no diagnóstico

Dentro do espectro de doenças comuns a idade idosa, o Mieloma Múltiplo tem grande importância. Aproximadamente 28,6% dos casos de MM são diagnosticados na idade de 65 a 74 anos e cerca de 3,5% abaixo da idade de 44 anos. A incidência é maior em indivíduos de etnia negra do que etnia branca e mais comum no sexo masculino que no feminino (SOLIMAN, 2020). A mortalidade no MM é bastante elevada, estimando-

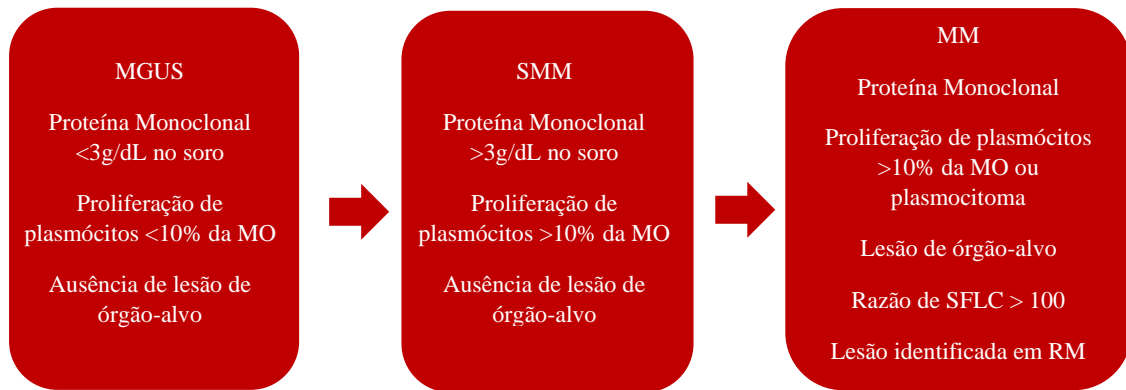
se que, em 2020, ocorreram 12.380 óbitos nos Estados Unidos, enquanto na Europa, o número chega a 31.000 mortes anuais (BEBNOWSKA, 2021).

A realidade epidemiológica do Mieloma Múltiplo no Brasil ainda não é esclarecida. Uma pesquisa realizada pela Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (ABRALE) com 200 pacientes com diagnóstico de mieloma múltiplo, em 2017, evidenciou alguns dos motivos pelos quais a doença ainda é obscura no país. Cerca de 98% dos pacientes relataram não ter nenhum conhecimento a respeito do Mieloma Múltiplo, 28% levaram mais de um ano para receber o diagnóstico e 40% tiveram dificuldades para receber o diagnóstico, seja por diagnóstico inconclusivo, seja dificuldade clínica do profissional médico em estabelecer o diagnóstico. A provável causa disso é o caráter sintomático inespecífico e falta de conhecimento científico por profissionais médicos quanto ao curso da doença e ao seu correto estadiamento (RAJKUMAR, 2022).

Em grande parte dos casos, o Mieloma Múltiplo é precedido por estágios precursores assintomáticos. O curso mais comum da doença, começa por um quadro de Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), que possui três características principais diagnósticas: presença monoclonal no soro em concentração <30g/L, proliferação de células clonais na medula óssea e ausência de características de lesão de órgãos-alvo, típicas de Mieloma Múltiplo (ATKIN, 2018). Entre a MGUS e o Mieloma Múltiplo, há o estágio de Mieloma Múltiplo Latente (SMM). Esse termo foi descrito pela primeira vez somente em 1980, quando alguns pacientes foram analisados e evidenciou-se porcentagem de infiltração da medula óssea compatível com MM, mas não apresentavam lesões líticas, hipercalcemia ou anemia após 5 anos de acompanhamento (KUNACHEEWA, 2020).

Em 2010, o termo SMM foi estratificado quanto ao risco de desenvolver MM, variando de baixo risco, com 5% de chance de progressão, até risco ultra-alto, que tem a sua chance de progressão em 40%, sendo já considerado Mieloma Múltiplo de fato por requerer tratamento (KUNACHEEWA, 2020). A figura 1 reúne de forma sintética e objetiva esses dados sobre os principais estágios precursores que evoluem para o Mieloma Múltiplo.

Figura 1 – Definição de Mieloma Múltiplo e seus distúrbios plasmáticos precusores



Legenda: Critérios definidores de Mieloma Múltiplo e distúrbios de células plasmáticas, incluindo MGUS e SMM. MGUS - Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; MO - Medula Óssea; SMM - Mieloma Múltiplo Latente; MM - Mieloma Múltiplo; SFLC - Fração de Cadeia Leve Livre no Soro; RM - Ressonância Magnética.

Fonte: Adaptado de ATKIN, 2018.

Apesar de atualmente haver avanços no entendimento do MM, a prevalência de diagnósticos tardios, quando já houve um avanço significativo da doença, ainda é alto e tem origem multifatorial. A não existência de método de rastreio ou protocolos sugestivos para o diagnóstico fomentam o subdiagnóstico ou o diagnóstico tardio dos pacientes acometidos por essa neoplasia, de forma a impactar diretamente no prognóstico e qualidade de vida do paciente e sua rede familiar. Nesse aspecto, o diagnóstico de Mieloma Múltiplo é difícil, podendo se apresentar por meio de sinais e sintomas vagos ou inespecíficos (FERREIRA, 2017).

Um paciente é diagnosticado com Mieloma Múltiplo quando possui infiltração clonal maior ou igual a 10% na medula óssea associada a lesão orgânica e proteína monoclonal detectável em soro ou urina (RAJKUMAR, 2022). Em grande parte dos casos, o primeiro achado compatível com o protocolo diagnóstico é a presença da proteína monoclonal ou pico monoclonal em soro ou urina, decorrente da produção e secreção de imunoglobulinas anômalas originadas de plasmócitos também anormais. Métodos moleculares de diagnóstico, como a proteína de “Bence Jones”, eletroforese de proteínas e imunofixação, são os mais usados atualmente e permitem a detecção ou não do pico monoclonal (RAJKUMAR, 2022).

2.2 Métodos diagnósticos existentes

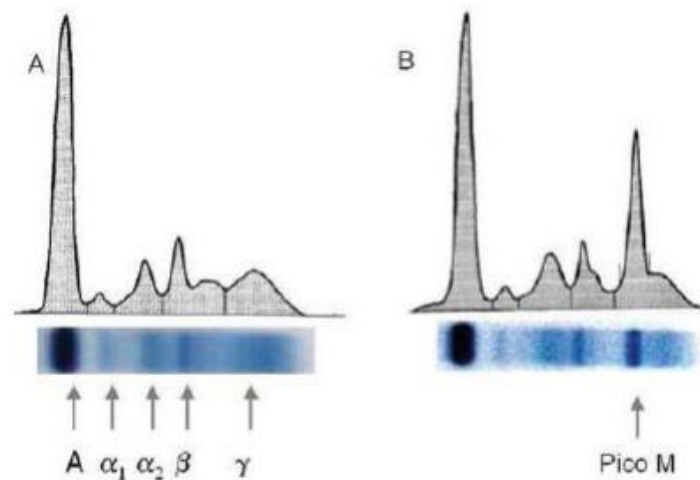
Apesar de descoberta no ano de 1847 e tendo sofrido evoluções e melhorias científicas ao longo dos anos, o teste de proteínas de Bence Jones (BJ) está perdendo espaço para testes mais sensíveis, mesmo que seu método seja de fácil execução e baixo custo. A técnica consiste na acidificação (pH 5) com ácido sulfossalicílico a 3% de 10 mL de urina em um tubo de ensaio e posteriormente colocado em um banho quente por 5 minutos e filtrada ainda quente. Caso fosse percebido turbidez ou precipitação durante o resfriamento, o tubo era colocado novamente na água fervente e, era considerado positivo para proteínas de Bence Jones caso a precipitação desaparecesse a 100°C e reaparecesse ao esfriar (TOMAZ, 2017).

Um estudo realizado no Laboratório de Bacteriologia e Urinálise do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC/UFPR), avaliou 122 pacientes que realizaram detecção urinária de proteínas de Bence Jones no período de janeiro de 2010 a julho de 2015. A análise da significância estatística entre os resultados da proteína de Bence Jones na detecção do MM, obteve sensibilidade de 47,4%, especificidade de 91,3%, VPP (Valor Preditivo Positivo) de 50% e VPN (Valor Preditivo Negativo) de 90,4%. A detecção das proteínas de Bence Jones ainda é prática em muitos laboratórios clínicos, mas dados da pesquisa demonstraram que esse método não contribui efetivamente para o diagnóstico de Mieloma Múltiplo, devendo ser substituídos por métodos mais sensíveis e específicos, como eletroforese de urina e soro (TOMAZ, 2017).

Já os fundamentos da eletroforese têm sua origem nos estudos de Michaelis, em 1909, quando o cientista percebeu que proteínas se moviam quando submetidas a um campo elétrico, podendo ser separadas em frações. Mas, o método de eletroforese de proteínas empregado hoje teve maior influência do método desenvolvido por Arne Tiselius em 1937, rendendo a ele um prêmio Nobel por seu trabalho científico (TISELIUS, 1937). A eletroforese, hoje, pode ser empregada para separar os componentes sanguíneos, urinários, líquóricos e outras soluções. Albumina, alfa-1 globulina, beta globulina e transferrina estão entre os principais componentes proteicos empregados na eletroforese, sendo capazes de fornecer significados clínicos para profissionais de saúde (OLIVEIRA, 2015). Mas, no que diz respeito ao Mieloma

Múltiplo, bem como outras gamopatias monoclonais, o componente proteico usado na eletroforese mais importante são as gamaglobulinas. As estruturas moleculares das imunoglobulinas são heterogêneas, mas, apesar disso, a migração delas na eletroforese ocorre de forma homogênea, formando bandas bem compactas e delimitadas. A essas bandas dá-se o nome de banda policlonal. Entretanto, quando diante de gamopatias monoclonais como o Mieloma Múltiplo, o traçado eletroforético é distinto, ocupando uma posição ampla e delimitada, assim como evidenciado na figura 2 (OLIVEIRA, 2015).

Figura 2 – Perfil eletroforético normal (A) e perfil eletroforético com pico monoclonal em paciente com Mieloma Múltiplo (B)



Legenda: Traçado eletroforético B, em comparação com perfil eletroforético normal (A), evidencia presença de pico monoclonal estreito na fração das gamaglobulinas, compatível com Mieloma Múltiplo. **Fonte:** PAVAN, 2012.

Nas bandas eletroforéticas pode-se encontrar algumas proteínas específicas, como a albumina, encontrada na banda “A”. Antitripsina, alfafetoproteína e globulina ligadora de tiroxina são algumas das proteínas encontradas na banda α_1 . Já na banda α_2 , pode ser encontrada a alfa-2-globulina, haptoglobina e macroglobulina, enquanto na banda β encontram-se a transferrina, a beta-lipoproteína e o complemento C3. Por fim, na banda γ , encontram-se as imunoglobulinas do tipo IgG, IgA, IgM e IgD (SILVA, 2008).

A fim de verificar a sensibilidade e especificidade da eletroforese de proteínas de cadeias leves livres como prova diagnóstica em pacientes com suspeita de gamopatia monoclonal (GM), um estudo prospectivo foi realizado no Chile, entre o período de 2013 a 2016, comparando o poder diagnóstico da eletroforese de proteínas com os

métodos considerados “padrão ouro”: mielograma e biópsia de medula óssea com imunoistoquímica compatível. Foram analisadas 191 amostras de pacientes com suspeita de GM, submetendo todas elas pelo processo de eletroforese. Dessa amostra, 75 tiveram diagnóstico final de gamopatia monoclonal, sendo 53 desses Mieloma Múltiplo. Com isso, a eletroforese de proteínas nos 75 pacientes, possuiu sensibilidade de 94,5% e especificidade de 98,6%, tornando o método, o mais simples com alta sensibilidade e especificidade, sem a necessidade de requerimento de imunofixação urinária (PEÑA, 2018).

Entre os métodos moleculares de diagnóstico, a imunofixação é cerca de 10 vezes mais sensível que a eletroforese sérica para identificar a presença da proteína monoclonal, bem como as cadeias leves ou pesadas envolvidas (CAERS, 2018). A técnica consiste no emprego de reação imunológica, antígeno-anticorpo, para verificar a formação de precipitina em géis ou membranas com o objetivo de visualizar presença de proteínas específicas. O gel ou membrana é lavado de modo a eliminar o que não pertence ao imunoprecipitado e, após isso, o material é corado com fluoresceína, por exemplo, permitindo melhor avaliação da reação imunológica (CSAKO, 2012).

No período compreendido entre janeiro de 2012 e julho de 2014, foi realizado um estudo com 52 pacientes diagnosticados com Mieloma Múltiplo que faziam acompanhamento no Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O objetivo da pesquisa foi de estabelecer comparação entre a sensibilidade e especificidade da eletroforese de proteínas em relação a imunofixação em pacientes com remissão completa da doença, mas com propensão de recidiva. Durante o período analisado, nove pacientes apresentaram retorno do MM; suas amostras foram analisadas por meio da eletroforese de proteínas, mas em nenhuma amostra foi detectado componente monoclonal, mesmo esses pacientes apresentando sinais típicos, como dor óssea, astenia e mal-estar. Assim que os resultados negativos da eletroforese foram obtidos, as mesmas amostras foram submetidas ao método de imunofixação e diferente do método anterior, o componente monoclonal foi encontrado, confirmando a suspeita de Mieloma Múltiplo (AITA, 2015). A maior sensibilidade da imunofixação em relação a eletroforese, encontrada nesse estudo, valida vários estudos realizados, principalmente, nas décadas de 1980 e 1990 (KEREN, 1990).

Outros métodos diagnósticos que podem ser utilizados, incluem radiografia de esqueleto, tomografia computadorizada de corpo inteiro, mielograma e biópsia de medula sendo bastante empregados não somente para a confirmação de Mieloma Múltiplo, mas também para descartar possíveis quadros de Gamopatia Monoclonal de Sinal Indeterminado ou Mieloma Múltiplo Latente (GULLA, 2020). O mielograma e biópsia de medula óssea tem grande importância prática no diagnóstico de MM, por permitir a quantificação de plasmócitos infiltrantes e estudos citogenéticos. Estima-se que a biópsia de medula tenha identificado corretamente o MM em 95% dos casos sintomáticos, sendo um dos métodos recomendados para avaliação plasmocitária anormal (CAERS, 2018). Porém, cabe ressaltar que a avaliação mais precisa e detalhada do conteúdo medular, só é obtido a partir da realização do aspirado de medula somado a biópsia desse conteúdo (KUMAR, 2016).

É evidente que as diversas formas de diagnóstico, sejam eles laboratoriais, de imagem ou histopatológico, se complementam à medida que suas associações promovem maior sensibilidade e caráter confirmatório quanto ao diagnóstico da doença em questão. Para o Mieloma Múltiplo não é diferente: os achados laboratoriais de pico monoclonal por meio dos métodos moleculares já elucidados servem de apoio aos demais exames, também já descritos. Mas, sua maior importância consiste no fato de serem a primeira etapa para o diagnóstico de Mieloma Múltiplo, visto que, para a solicitação de outros exames, como os de imagem ou biópsia de medula, faz-se necessário a identificação do pico monoclonal, já que se trata de exames invasivos, de difícil acesso e alto custo, não solicitados de forma recorrente. A partir disso, é necessário buscar formas mais acessíveis, de menor custo e com valor diagnóstico para que a população seja mais bem assistida, no que diz respeito a um melhor prognóstico, como reflexo de um diagnóstico precoce, bem como a minimização do subdiagnóstico da doença.

3. JUSTIFICATIVA

Nas últimas décadas, na prática médica, bem como em toda a área da saúde, nunca se questionou e exigiu tanto o conhecimento científico baseado em evidências. A busca por melhores medicamentos, procedimentos e métodos a serem oferecidos aos pacientes, desafia os profissionais de saúde tanto na atualização de seus conhecimentos previamente adquiridos, quanto na produção de novos estudos com temáticas intrínsecas à sua profissão e seu contexto profissional (ERCOLE, 2014).

Nesse sentido, os estudos de revisão, utilizando fontes bibliográficas ou eletrônicas de informação, realizam uma síntese com base em diversos artigos e autores, de forma a argumentar, com respaldo teórico e científico, a cerca de determinado objetivo. Destaca-se nessa modalidade de estudo científico, a revisão integrativa de literatura que, de forma ampla, ordenada e criteriosa, é capaz de fundir conhecimentos teóricos e empíricos e, assim, podem ser analisados de forma crítica e posteriormente, incorporados à prática de assistência (ERCOLE, 2014).

Sendo assim, a crescente incidência do Mieloma Múltiplo na sociedade e falta de conhecimento prático e manejo por parte dos profissionais de saúde que compõem toda a estrutura assistencialista, tem importante impacto na sobrevivência dos pacientes acometidos. O desconhecimento sobre a doença fomenta o subdiagnóstico ou até mesmo a ausência diagnóstica, sendo responsável por grande parcela do número de óbitos.

Além disso, por ter caráter progressivo e agressivo, o Mieloma Múltiplo tem seu prognóstico diretamente associado à sua descoberta precoce e posterior tratamento adequado. Porém, a falta de conhecimento clínico e prático, faz com que diversos pacientes transitem entre consultórios e especialistas a fim de se obter um diagnóstico e resolução de seus sintomas, mas que assim não ocorre, por possuírem a causa base de sua patologia relacionada à fonte de produção hematopoiética do organismo e, com isso, tende a se apresentar de forma plural e não padronizada.

Desse modo, a busca por métodos diagnósticos que possuam sensibilidade para o diagnóstico precoce se torna relevante à medida que, pacientes com diagnosticados precocemente tem melhor prognóstico e qualidade de vida. Nesse contexto, os métodos moleculares, geralmente, não invasivos e com menos incômodo para o paciente, durante o procedimento de coleta, principalmente, quando comparados à processos de biópsia da medula óssea, mostram-se mais adequados. Alguns desses métodos, como a cariotipagem e sequenciamento de nova geração, demandam serviços mais especializados e, logo, possui maior custo empregado; mas há também, aqueles que necessitam de estruturas mais simples para serem empregados e possuem menor custo associado, como imunofixação e a eletroforese de proteínas.

Diante disso, urge a necessidade de avanço na área de estudo dos métodos diagnósticos de MM, a fim de se aumentar a acurácia desses, de modo a impactar, positivamente, no prognóstico dos pacientes acometidos pela doença, dando a eles maior

chance de remissão, maior sobrevida e melhores perspectivas de futuro pelo tempo que conviverão com a doença.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo Geral

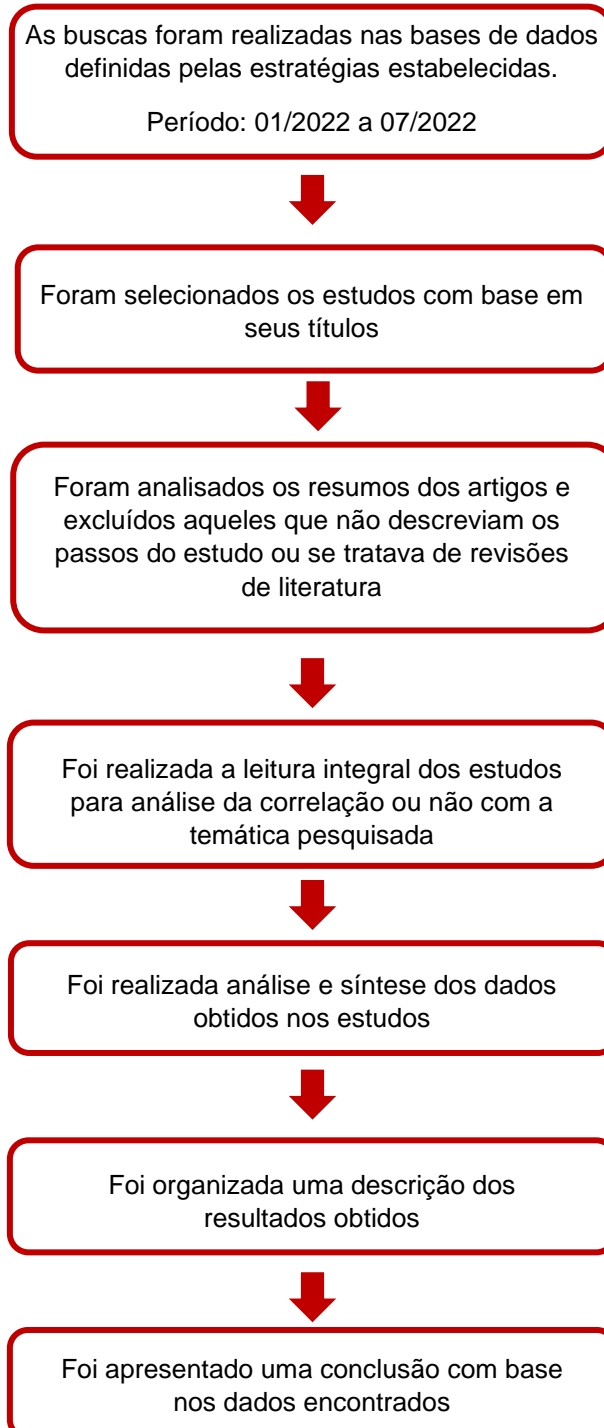
Investigar propostas de detecção precoce de Mieloma Múltiplo por meio de métodos moleculares de diagnóstico, analisando-os quanto a sua sensibilidade e especificidade, a fim de tornar evidente sua importância para uso efetivo no protocolo de diagnóstico da doença.

4.2 Objetivos Específicos

- Elencar e descrever métodos moleculares de diagnóstico para o Mieloma Múltiplo
- Evidenciar o potencial de sensibilidade e especificidade de detecção das anormalidades relacionadas ao Mieloma Múltiplo pelos métodos estudados
- Evidenciar a importância dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce de Mieloma Múltiplo

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho do estudo



Fonte: Elaborado pela autora.

5.2 Tipo de estudo

Trata-se de uma revisão integrativa da literatura científica, que consiste na análise ampla da literatura tendo em vista discussões sobre métodos, resultados e conclusões gerais de uma área particular de estudo com o foco na prática clínica (MENDES, 2008).

Nesse viés, esse estudo foi direcionado em uma pesquisa qualitativa, com base na apresentação de dados de caráter estatístico advindos de técnicas de diagnóstico. Para isso, fez-se uso do método descritivo de busca, e análise crítica de pesquisas que abordam a sensibilidade e especificidade de métodos moleculares de diagnóstico na detecção de marcadores relacionados ao Mieloma Múltiplo.

5.3 Coleta de dados

5.3.1 Fontes para busca de dados

Os dados científicos foram selecionados por meio de busca eletrônica nas bases de dados: PubMed, Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da saúde (LILACS), Scientific Electronic Library Online (SciELO) e Cochrane, tendo sido publicados no período de janeiro de 2012 a dezembro 2021, em inglês, espanhol ou português e estando disponíveis de forma integral, gratuita e online.

5.4 Critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados como critérios de inclusão: estudos observacionais (transversais, caso-controle e coorte), publicados entre janeiro de 2012 a dezembro de 2021, a fim de se revisar os materiais científicos mais atuais da área, nos idiomas inglês, espanhol e português que descrevam e mensurem a capacidade diagnóstica dos métodos moleculares no diagnóstico de Mieloma Múltiplo, evidenciando sua sensibilidade e especificidade; artigos disponíveis na íntegra; artigos que abordem a temática definida.

Foram excluídos estudos do tipo relato de caso, revisões de literatura e estudos que não atendam as recomendações para título e resumo preconizados pelo checklist STROBE (anexo A).

5.5 Estratégias de busca nas bases de dados

Os descritores foram selecionados a partir das definições encontradas nos Descritores em Ciência da Saúde (DeCS), sendo selecionados os seguintes descritores: *Molecular diagnostic techniques*, *Multiple Myeloma*, *Early diagnosis* e *Molecular diagnostic*. Esses descritores foram combinados de forma booleana utilizando o operador “and”, formando três combinações de descritores.

A primeira combinação de descritores pesquisado foi “Molecular diagnostic Techniques and multiple myeloma”. Já a segunda combinação ficou estruturada como: “Multiple myeloma and early diagnosis”. Por fim, a terceira combinação de descritores utilizada foi: “Molecular diagnostic and multiple myeloma”.

A princípio, foram analisados os títulos dos artigos de forma a verificar possível potencial de resposta para a pergunta norteadora e, a partir dessa análise, foi selecionado aqueles que são compatíveis.

5.6 Descrição da coleta de dados

Foram buscados artigos científicos publicados no período de janeiro de 2012 a dezembro de 2021, que abordassem a temática do diagnóstico de Mieloma Múltiplo, dando enfoque aos métodos moleculares de diagnóstico.

Nas bases de dados já mencionadas, foi utilizado as três combinações booleanas com os descritores obtidos via Descritores em Ciências e Saúde (DeCS): “Molecular diagnostic Techniques and multiple myeloma”, “Multiple myeloma and early diagnosis” e “Molecular diagnostic and multiple myeloma”. A partir dos títulos dos trabalhos, foi realizada a pré-seleção dos artigos de acordo com o potencial de compatibilidade com objetivo do estudo, sendo excluídos aqueles que não condiziam com a temática alvo.

A etapa seguinte, consistiu na leitura dos resumos dos artigos e aplicação dos critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos, a fim de refinar a seleção dos estudos.

Posteriormente, foi realizada a leitura integral dos artigos selecionados, de forma crítica, analisando a metodologia, resultados e discussão dos trabalhos em questão de forma a validar ou não a adequação do estudo ao objetivo proposto.

Os estudos selecionados foram agrupados em uma tabela com a finalidade de reunir os dados de cada pesquisa e se realizar uma melhor interpretação dos dados.

5.7 Avaliação Metodológica

Os estudos foram avaliados por meio do formulário STROBE (*Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology*) (ELM et. al, 2008), contendo 22 itens relacionados a informações que devem estar presentes no título, resumo, introdução, metodologia, resultados e discussão de artigos científicos que descrevem estudos observacionais (MALTA et al., 2010). Conforme descrito no Anexo A, esses itens ajudam na avaliação da qualidade do título e resumo, do contexto e objetivos, desenho de estudo, tamanho da amostra e interpretação dos dados obtidos (MOREIRA et al, 2014).

A Iniciativa STROBE oferece um modelo que poderá ser seguido por autores de estudos observacionais e que objetiva contribuir para um relato mais adequado desses estudos e, conseqüentemente, facilitar a leitura crítica dessas publicações por parte de editores, revisores e leitores em geral (MALTA et al., 2010).

A avaliação da possível adequação e qualidade dos artigos encontrados, foi realizada por uma pesquisadora que realizou o confronto dos dados encontrados. Uma tabela foi utilizada a fim de reunir as principais informações, como: título do estudo, autor, metodologia, resultados e conclusão, além do ano e local de publicação.

Os dados resultados deste estudo foram redigidos em forma de artigo de revisão a ser submetido à revista científica direcionada à área da hematologia (Apêndice A).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após utilização dos descritores nas bases de dados PubMed, Scielo, LILACS e Cochrane, foram obtidas quantidades variáveis de estudos. Ao se pesquisar “Molecular diagnostic Techniques and Multiple Myeloma”, 53 estudos foram selecionados por título. Apenas, a base de dados Scielo, não apresentou nenhum retorno. Já a busca utilizando-se o descritor “Multiple myeloma and early diagnosis” indicou 41 estudos selecionados a partir de todas as bases de dados citadas, exceto a base Cochrane. Por fim, busca por “Molecular diagnostic and multiple myeloma” retornou com 20 artigos selecionados e novamente a base de dados Scielo não apresentou nenhum retorno. Em conclusão, essa seleção inicial por título culminou com 114 selecionados.

Posteriormente a etapa de busca, foram excluídos da seleção inicial os estudos que se apresentaram de forma repetida, sendo encontrados em concomitância nas buscas com as três combinações utilizadas ou em apenas duas delas. Dos 41 estudos selecionados a partir da segunda combinação de descritores, 29 foram excluídos por repetição, enquanto na terceira combinação, 8 foram excluídos por repetição. Com isso, 77 artigos seguiram para a próxima etapa.

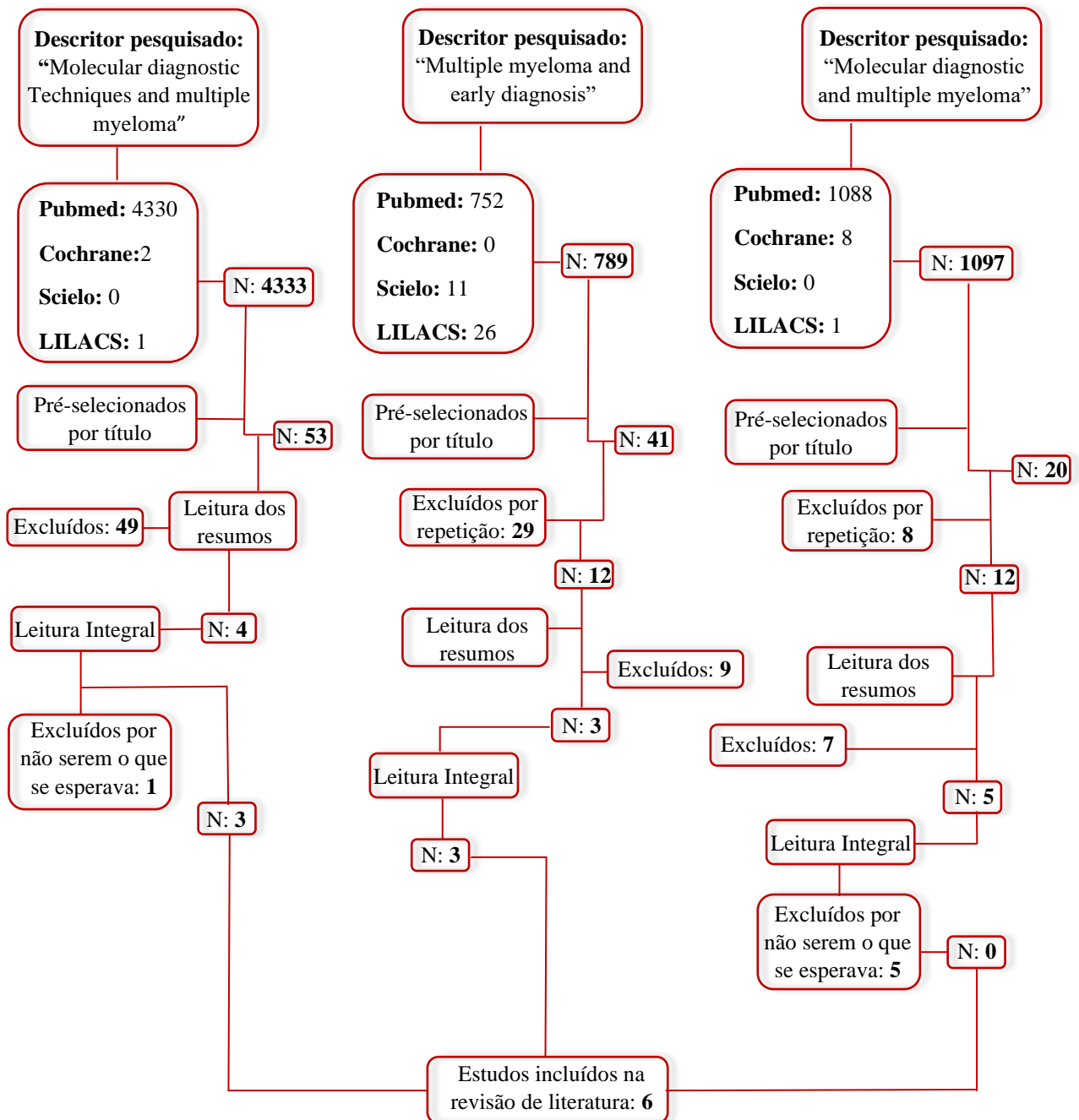
Posteriormente a exclusão por repetição, foi realizada a leitura dos resumos dos artigos a fim de se verificar potencial adequação ao viés de métodos moleculares de diagnóstico no contexto de Mieloma Múltiplo. Dessa forma, 65 estudos foram excluídos por não abordarem métodos moleculares de diagnóstico, por não serem direcionados ao Mieloma Múltiplo, mas sim a outras disfunções hematológicas ou por se tratar de outras revisões de literatura que não tinham finalidade de mensurar acurácia de métodos diagnósticos. Ao final da etapa, 12 estudos seguiram para leitura integral.

Essa etapa consistiu na leitura integral dos estudos selecionados, sendo realizada avaliação dos estudos de forma completa e verificação quanto sua qualidade por meio da presença ou não dos itens indicados no formulário STROBE (Anexo A). Dos 12 estudos participantes dessa etapa, 6 foram excluídos por não se adequarem ao esperado após a leitura de seus resumos, não constando explicitamente as etapas que compuseram as pesquisas. Nesses estudos, houve baixa presença dos itens presentes no formulário avaliativo utilizado, de forma que sequer atingiram 50% do que se esperava.

Todo os 6 estudos restantes, também avaliados pelo STROBE, obtiveram pontuações acima de 80%, sendo esse percentual calculado com base na quantidade de itens preconizados pelo formulário avaliativo que estavam presentes nos estudos

analisados, em relação ao total de itens que o compõem, e foram incluídos nessa revisão por possuírem boa qualidade, além de se adequarem à temática pesquisada. Dessa forma, 6 estudos seguiram para extração, análise e formulação dos dados a serem apresentados nos resultados e discussão desse trabalho, além de serem fonte para as ideias conclusivas. A aplicação da metodologia, e os resultados da seleção, incluindo as exclusões já mencionadas, estão esquematicamente descritas na Figura 3.

Figura 3- Delineamento metodológico e sistema de identificação de trabalhos para análise



Fonte: Elaborado pela autora.

Os 6 estudos selecionados são do tipo coorte, tendo caráter retrospectivo partindo de amostras de doadores saudáveis, portadores de outras Gamopatias Monoclonais, como: Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado e Mieloma Múltiplo Latente, além de pacientes já diagnosticados com Mieloma Múltiplo, a fim de

testar os métodos diagnósticos quanto a sua sensibilidade e potencialidade de detecção da doença, de forma a aprimorar *guidelines* diagnósticos, bem como interferir positivamente no melhor prognóstico do paciente.

Assim como descrito na Tabela 1, 4 estudos foram realizados no continente europeu (estudos 1, 3, 4 e 5), 1 estudo foi realizado em território asiático (estudo 6) e 1 advindo da América do Sul (estudo 2). Dentre os países, estão: República Tcheca, Inglaterra, China, Brasil, Turquia e Itália. Quanto ao ano de publicação, os estudos situaram-se entre 2012 e 2020, sendo esse o mais recente.

Já a tabela 2 reúne as informações relacionadas aos métodos moleculares evidenciados pelos estudos selecionados, além da descrição de amostragem e os resultados e conclusões obtidos pelas pesquisas.

Tabela 1 – Descrição e referência dos estudos avaliados

Nº	Título	Autor	Tipo de Estudo	Local	Ano
1	Identification of circulating microRNAs, as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma	JONES, C I. et al.	Coorte	Inglaterra	2012
2	Comparison between immunofixation and electrophoresis for the early detection of relapsed multiple myeloma	AITA, M H C. et al.	Coorte	Brasil	2015
3	Combined use of free light chain and heavy/light chain ratios allow diagnosis and monitoring of patients with monoclonal gammopathies: Experience of a single institute, with three exemplar case reports	GAGLIARDI, A. et al.	Coorte	Itália	2016
4	Rapid discrimination of multiple myeloma patients by artificial neural networks coupled with mass spectrometry of peripheral blood plasma	DEULOFEU, M. et al.	Coorte	República Tcheca	2019
5	Pros and Cons for Fluorescent <i>in Situ</i> Hybridization, Karyotyping and Next Generation Sequencing for Diagnosis and Follow-up of Multiple Myeloma	ALTI, E.I. et al.	Coorte	Turquia	2020
6	Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance	LI, J; ZHANG, M; WANG, C.	Coorte	China	2020

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 2 – Método diagnóstico estudado, amostra, resultados e conclusões dos estudos

Nº	Autor	Método Diagnóstico Estudado	Amostra	Resultados e Conclusão
1	JONES, C I. et al.	Detecção de microRNAs por PCR de transcrição quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	Foram utilizadas amostras sanguíneas de pessoas normais saudáveis (13), normais hospitalizados (20), pessoas com Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado (MGUS) (15) e pacientes com Mieloma Múltiplo (24).	<p>Foram identificados alguns microRNAs com potencial de biomarcadores. Três miRNAs, miR-720, miR-1246 e miR-1308, foram identificados e validados em amostras de pacientes individuais.</p> <p>O uso de miR-1308 e miR-720 em combinação (ou seja, [miR-1308]/[miR-720]) mostrou excelente especificidade e seletividade na distinção de pacientes com MGUS/mieloma de controles normais e saudáveis, com uma sensibilidade de 97,4% e especificidade de 92,3%, dando apenas 7,7% de falsos positivos e 2,6% de falsos negativos.</p> <p>Também mostramos que miR-1246 e miR-1308 em combinação (ou seja, [miR-1246]/[miR-1308]) podem distinguir mieloma de pacientes com MGUS, com sensibilidade de 79,2% e especificidade de 66,7%.</p> <p>A assinatura de miRNA que identificamos para o mieloma também tem outros benefícios potenciais para pacientes com mieloma.</p>
2	AITA, M H C. et al.	Comparação entre Imunofixação e Eletroforese de proteínas	A amostra foi composta por 52 pacientes com diagnóstico de Mieloma Múltiplo que foram acompanhados de 2012 a 2014 no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM).	<p>Em todos os nove pacientes a IFS detectou o componente monoclonal com maior antecedência que a EFS, com uma média de 6,6 meses de precocidade. Em cinco dos nove pacientes, a EFS não detectou o componente monoclonal, mesmo os pacientes apresentando características clínicas.</p> <p>Os resultados indicaram que a IFS foi mais eficaz do que a EFS em detectar as recidivas. Portanto, o uso da IFS permite monitorar melhor os pacientes com MM, principalmente na detecção das recidivas, o que pode auxiliar na escolha da terapia mais adequada, além de aumentar o tempo de sobrevida livre da doença.</p>

3	GAGLIARDI, A. et al.	Fração de Cadeia leve livre (FLC)	Foram utilizadas 300 amostras foram coletadas de 90 pacientes (49 MM, 6 SMM e 35 MGUS). Nos pacientes com MM, as análises por FLC foi repetida a cada 3 meses para avaliação durante o tratamento.	A fração de cadeia leve livre foi encontrada em 82% de todos os pacientes quando comparada com a primeira amostra recebida, que foi considerada amostra diagnóstica. Os outros 18% que não apresentou anormalidade na FLC, 37,5% eram pacientes com MM. Notavelmente, aproximadamente 70% das amostras intactas de imunoglobulina MM tinham a FLC anormal, apoiando o uso para diagnosticar e monitorar MM.
4	DEULOFEU, M. et al.	Espectrometria de massa associada a Redes Neurais Artificiais	Foram utilizadas 84 amostras de plasma de sangue periférico, sendo 44 obtidas de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM) e 40 de doadores saudáveis (DS). Foi realizada uma coorte aleatória dividindo em dois grupos: Treinamento (20 MM e 20 DS) e Validação (24 MM 20 DS).	No grupo de treinamento a sensibilidade, especificidade e precisão foram de 100%. No grupo de validação a sensibilidade foi de 95,83%, especificidade foi de 95% e precisão de 95,45%. Em conclusão, prevemos que as impressões digitais espectrais relacionadas à doença, juntamente com a inteligência artificial, podem fornecer uma ferramenta complementar e minimamente invasiva para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com MM.
5	ALTI, E.I. et al.	Cariotipagem convencional, Hibridização in situ por fluorescência (FISH) e Sequenciamento de Nova Geração (NGS).	35 pacientes com Mieloma Múltiplo no período de 2018 a 2019 formaram a amostra do estudo. Utilizou-se de material extraído da medula óssea ou sangue periférico para a análise.	A análise citogenética convencional falhou em 10 (28,0%) dos 35 pacientes. Vinte e cinco (71,4%) dos 35 pacientes com MM apresentaram cariótipo normal. Resultados anormais de FISH foram revelados em oito (22,8%) dos 35 casos. A análise de sequenciamento de próxima geração foi aplicada a todos os casos e variações patogênicas ou provavelmente patogênicas foram detectadas em seis dos 25 casos citogeneticamente normais. Além disso, uma variante patológica foi identificada em cinco dos oito casos que tiveram resultados FISH anormais. Em nosso estudo, a análise citogenética convencional foi realizada com sucesso em 71,4% (25/35) das amostras. A taxa de resultado com citogenética convencional em pacientes com MM varia entre 29,5 e 64,0% na literatura. Como resultado, os desenvolvimentos tecnológicos são importantes na classificação do MM em nível molecular. É

				inevitável realizar aplicações citogenéticas tradicionais e FISH para revelar novas anormalidades cromossômicas específicas recorrentes ou outras anormalidades genéticas em pacientes com MM.
6	LI, J; ZHANG, M; WANG, C.	Detecção de microRNAs por PCR de transcrição reversa quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	Para análise por meio da qRT-PCR, foram utilizadas 23 amostras sanguíneas de pacientes com MM, 16 amostras de pacientes com MGUS e 18 amostras de indivíduos saudáveis.	<p>Nesse estudo, foi comparado os níveis de expressão relativa de miRNA entre MGUS e doadores saudáveis (DS). 175 miRNAs foram expressos anormalmente em MM em comparação com MGUS e DS. Destes, 26 miRNAs expressaram aberrantemente quando comparados com MUGS ou DS. No presente estudo, a análise de regressão logística multivariada mostrou que miR-107, miR-15a-5p e Hb eram potenciais biomarcadores diagnósticos para a identificação de MM e MUGS. Com a AUC (área sob curva) aumentada para 0,954, a sensibilidade e especificidade foram de 91,3% e 93,7%, respectivamente. O valor diagnóstico do MM é significativamente melhorado.</p> <p>Além disso, a combinação de miR-107 e miR-15a-5p com Hb distinguirá MM de MUGS, de modo a fornecer tratamento precoce e melhorar o prognóstico.</p>

Fonte: Elaborado pela autora

6.1 Métodos diagnósticos identificados

As gamopatias monoclonais tem se tornado alvo de mais pesquisas atualmente, que buscam esclarecer a sua patogênese, os fatores etiológicos, as terapêuticas potencialmente mais eficazes e meios diagnósticos mais precisos, porém ainda representam um número pouco expressivo. O mieloma múltiplo, como a doença de maior conhecimento desse grande grupo, apesar de também ser alvo dessas pesquisas, compartilha de alguns obstáculos no avanço sobre o seu entendimento, como o baixo número de publicações existentes na literatura, principalmente, no viés diagnóstico da doença, o que reflete diretamente a realidade atual.

Outro obstáculo a se destacar, é o pouco conhecimento pelos profissionais médicos, generalistas ou especialistas não hematologistas sobre o MM, as repercussões clínicas variadas e o impacto que o diagnóstico precoce pode trazer à vida do paciente. É irrefutável, na medicina, a importância da consulta clínica como rastreamento de doenças por meio do levantamento de hipóteses diagnósticas, a solicitação de exames complementares que descartem ou que confirmem essas hipóteses e, se necessário, o encaminhamento para o profissional mais especializado para cada caso. Esse déficit no conhecimento profissional, atrasa o avanço científico da temática, culminando, assim, num ciclo vicioso não benéfico à ciência e à sociedade.

Dessa forma, buscou-se, por meio do uso de diversas fontes de dados, aplicando-se três combinações de descritores a cada uma delas, selecionar a maior quantidade de estudos relevantes e recentes, dentro da faixa temporária pré-estabelecida. Apesar da estratégia adotada, foi encontrado uma baixa quantidade de estudos no âmbito do diagnóstico molecular, sendo a sua maioria de origem europeia e o mais recente, publicado no ano de 2020. Essa baixa quantidade de estudos na temática proposta, ocasionou na seleção de estudos que analisaram métodos diagnósticos distintos, de forma a não proporcionar um possível confronto de dados entre diferentes experimentos que possuíam o mesmo método como alvo do estudo, a exceção de dois estudos (1 e 6), em que foi possível analisar, mesmo que não expressivamente, os dados obtidos por dois diferentes estudos com mesmo método diagnóstico.

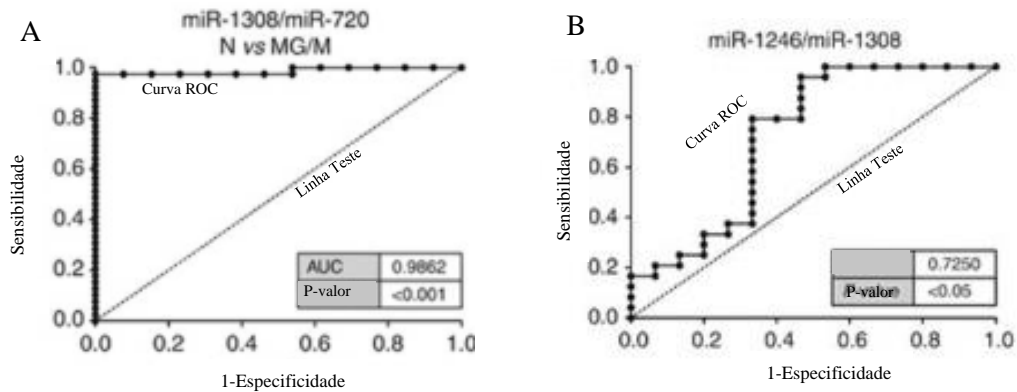
A detecção de microRNAs por PCR em tempo real (qRT-PCR), foi o alvo dos estudos 1 e 6, em que foi realizado primeiramente, a busca por microRNAs com potencial biomarcador para o MM e, posteriormente, avaliando a capacidade de distinção desses possíveis biomarcadores nas amostras utilizadas.

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes conhecidos por regular a expressão gênica. Geralmente, se ligam aos mRNAs (RNAs mensageiros) na sua porção 3' não traduzida e causam hiporregulação da expressão proteica por repressão traducional ou clivagem e degradação do mRNA alvo (KONG, 2012). O uso de miRNAs como biomarcadores aumentou muito com a descoberta de que eles estão presentes no sangue circulante, sendo evidenciado que podem ser detectados no soro ou plasma humano, onde se acredita que sejam protegidos da degradação por serem encapsulados em microvesículas ou exossomos e/ou são ligados por proteínas de ligação ao RNA (REID, 2011). Mudanças nos níveis de miRNAs circulantes têm sido associadas a vários tipos de câncer. Esses dados, portanto, mostram que é viável o uso de miRNAs derivados de amostras de sangue como uma ferramenta de diagnóstico minimamente invasiva para pacientes com câncer (HENEGHAN, 2010).

Dessa forma, o estudo 1 identificou três microRNAs como biomarcadores que foram validados a partir das amostras, são eles: miR-720, miR-1246 e miR-1308. A partir dessa identificação, o estudo demonstrou que o uso de miR-1308 e miR-720 em combinação, ou seja, [miR-1308]/[miR-720] apresentou sensibilidade de 97,4% e especificidade de 92,3%, dando apenas 7,7% de falsos positivos e 2,6% de falsos negativos, no que diz respeito a distinção entre os pacientes com MM, MGUS e doadores saudáveis, através das curvas ROC (*Receiver Operating Characteristics*), forma gráfica utilizada para representar a performance de um modelo de dados quantitativos segundo sua taxa de sensibilidade (fração dos verdadeiros positivos) e fração dos falsos positivos (1- especificidade). Além disso, o estudo utilizou outro recurso, muitas vezes utilizados quando não se há grande quantidade de dados no teste, a AUC (*Area Under The Curve*). AUC é o resultado da integração de todos os pontos durante o trajeto da curva e computa, simultaneamente, sensibilidade e especificidade, atuando como indicador de sucesso do teste à medida que mede a classificação correta de um sujeito ao acaso. Valores de AUC entre 0,5-0,6 são considerados péssimos, entre 0,6-0,7 ruins, 0,7-0,8 pobres, 0,8-0,9 bons e acima de 0,9 excelentes (POLO, 2020). Na combinação em questão, a AUC foi de 0,9862, ou seja, de caráter excelente (figura 4A).

Outro ponto analisado, foi a combinação de miR-1246 e miR-1308 (miR-1246)/[miR-1308]) que apresentou sensibilidade de 79,2% e especificidade de 66,7%, mas AUC de 0,7250 (figura 4B), conferindo aos dados apresentados, caráter pobre. Ainda assim, o estudo concluiu que essa combinação é capaz de distinguir pacientes com MM de pacientes com MGUS.

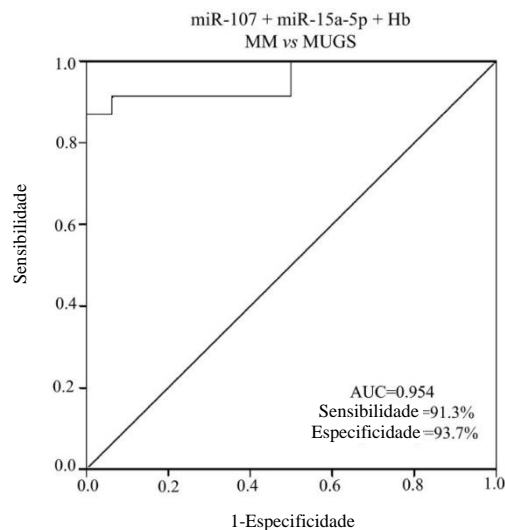
Figura 4 – Curvas ROC (Receiver Operating Characteristics) para comparar potencial de combinações de microRNAs no diagnóstico de MM



Legenda: **A)** Valor de AUC para os microRNAs miR-1308/miR-720 evidenciando boa qualidade dos dados de sensibilidade e especificidade, bem como de falsos positivos e falsos negativos obtidos pela curva ROC. **B)** AUC para os microRNAs miR-1246/miR-1308 demonstra menor qualidade quanto aos dados obtidos, não conferindo alto grau de confiança à ROC. MG - Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; M - Mieloma; ROC - Receiver Operating Characteristics; AUC – Area Under The Curve. **Fonte:** JONES, 2012 (modificado).

O estudo 6 por sua vez, identificou miR-134-5p, miR-107 e miR-15a-5p como potenciais biomarcadores; porém, foi com a utilização de miR-107, miR-15a-5p e níveis séricos de hemoglobina (Hb), considerando 92,96 g/L como mediana das amostras MM, que o método apresentou sensibilidade de 91,3% e especificidade de 93,7%, melhorando assim, o valor diagnóstico do MM (figura 5). Por fim, foi visto que a detecção dos três biomarcadores identificados somados aos níveis séricos de Hb é capaz de realizar a distinção de pacientes com MM de pacientes com MGUS.

Figura 5 – Curva ROC da combinação de microRNAs e níveis séricos de Hb



Legenda: Análise de curva ROC de miR-107, miR-15a-5p e Hb com AUC de 0,954, apontando boa qualidade de sensibilidade (91,3%) e especificidade (93,7%) obtidos pelo teste. Hb- Níveis Séricos de hemoglobina; MM- Mieloma Múltiplo; MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; AUC – Area Under The Curve.

Fonte: LI, 2020 (modificado).

A Imunofixação (IFS) e a Eletroforese de Proteínas (EFS) fazem parte do protocolo diagnóstico atual de MM e, geralmente, são solicitadas de forma concomitante tendo uma sensibilidade próxima a 97% (RAJKUMAR, 2018). Por conta disso, a análise individual dessas técnicas foi o objeto de trabalho do estudo 2. Nesse caso, partiu-se de uma amostra de 52 pacientes com Mieloma Múltiplo que foram acompanhados por 2 anos (2012-2014) avaliando-os quanto a presença de recidivas da doença. Durante esse tempo, 9 pacientes apresentaram recidivas e essas amostras foram submetidas a IFS e EFS para avaliação do seu potencial de detecção.

Em todos os 9 pacientes, a IFS detectou o componente monoclonal com maior antecedência que a EFS, com uma média de 6,6 meses de precocidade. Além disso, a EFS não detectou o componente monoclonal em cinco pacientes, mesmo esses apresentando as características clínicas compatíveis com a doença, o que demonstrou a maior acurácia da IFS quanto a precocidade diagnóstica (Tabela 3).

Tabela 3 – Comparação entre as técnicas IFS e EFS para sensibilidade na detecção precoce de recidiva em nove pacientes com MM

Pacientes (n = 9)	Deteção de recaída pelo IFS (data)	Deteção de recaída por EFS (data)	Antecipar a deteção de recaída pelo IFS (meses)
1	10/03/2013	22/10/2013	7.4
2	08/01/2014	07/09/2014	6
3	13/03/2014	02/07/2014	3.6
4	12/07/2012	01/02/2013	5.7
5	03/09/2012	10/01/2013	4.2
6	23/12/2013	30/06/2014	6.2
7	13/12/2012	14/06/2013	6
8	01/06/2014	31/07/2014	2
9	10/04/2012	27/10/2013	18.6

Legenda: Tabela comparativa entre a data de deteção de componente monoclonal por IFS e data de deteção por EFS em nove pacientes. Fica evidente a precocidade da IFS na deteção antecipada de MM. MM – Mieloma Múltiplo; IFS - Imunofixação Sérica; EFS – Eletroforese de Proteínas.

Fonte: Adaptado de AITA, 2015.

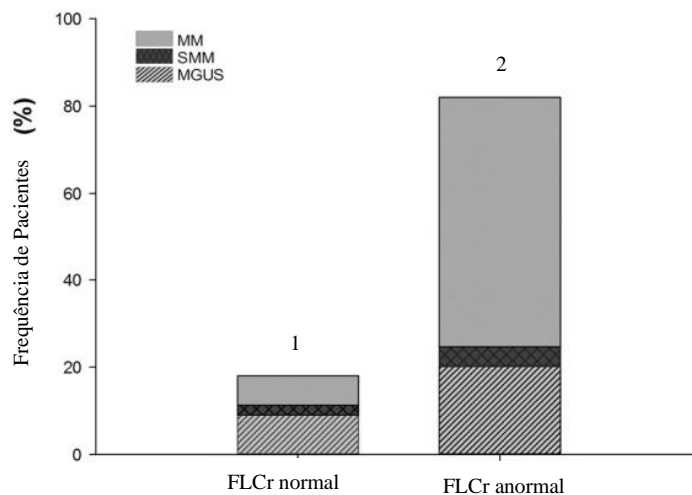
O estudo 3, teve como foco a análise das Frações de Cadeia Leve Livre (FLC). Essa pesquisa utilizou 300 amostras extraídas de 90 pacientes, sendo colhidas a cada 3

meses para avaliação durante a resposta ao tratamento. Foram utilizadas 49 amostras de pacientes com MM, 6 amostras de SMM e 35 de MGUS, colhidas no período de 2012 a 2014.

A técnica evidenciada é um tipo de ensaio policlonal de cadeia leve livre no soro, que identificam epítomos do componente da cadeia leve Kappa (κ) ou Lambda (λ) das imunoglobulinas, que estão expostos quando não ligados ao seu par de cadeia pesada. A partir da quantificação das cadeias κ e λ , é possível realizar a razão entre as concentrações encontradas, sendo esse um indicador sólido de monoclonalidade. Quando uma das cadeias estão em maior concentração que a outra, a razão κ/λ é dita anormal e forte preditor tumoral (CRUSOE, 2018). Atualmente, essa quantificação é mais comumente realizada por meio da EFS e IFS, mas cada vez mais a FLC detectada com Freelite[®] (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, Reino Unido) vem ganhando espaço, por permitir a medição nefelométrica/turbidimétrica automática no soro, ou seja, a diminuição da intensidade pela difração da luz e o grau de turbidez da amostra, respectivamente, possuindo, assim, melhor precisão de medição das FLCs (GAGLIARDI, 2016).

Desse modo, as FLC foram encontradas em 82% de todos os pacientes, quando comparadas com a primeira amostra recebida de cada paciente, que foi considerada a amostra diagnóstica. Dos outros 18% que não apresentaram anormalidades na FLC, 37% eram pacientes com Mieloma Múltiplo. Com isso, aproximadamente 70% das amostras de MM tinham FLC anormal, apoiando seu uso para diagnosticar e monitorar MM (figura 6).

Figura 6 – Percentual de pacientes com MM, SMM e MGUS com FLCr normal e com FLCr anormal

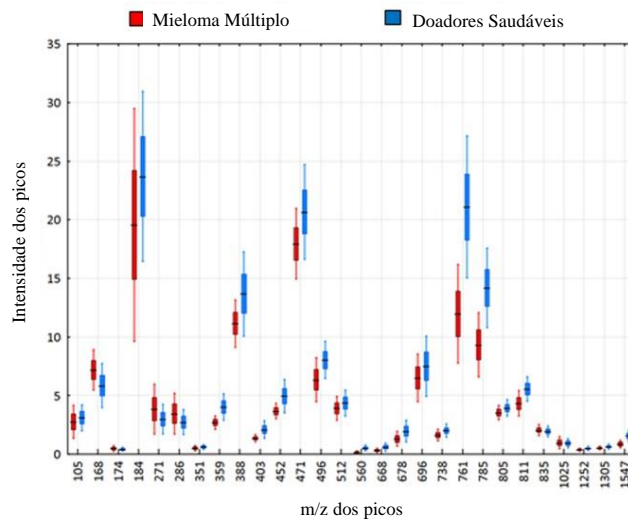


Legenda: Gráfico em barra demonstrando o percentual de pacientes com MM, MGUS ou SMM que possuíam FLCr de caráter normal (barra 1) ou que possuíam FLCr de caráter anormal (barra 2). A barra 1 corresponde a um total de 18% da amostra (16,2) (37,5% - MM; 50% - MGUS; 12,5% - SMM), enquanto a barra 2 corresponde aos 82% (73,8) (69,9% - MM; 24,6% - MGUS; 5,5% - SMM) restante da amostra. FLCr – razão de cadeia leve livre; MM – Mieloma Múltiplo; MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; SMM – Mieloma Múltiplo Latente.

Fonte: GAGLIARDI, 2016 (modificado).

A Espectrometria de Massa (EM) associada à Redes Neurais Artificiais foi analisada no estudo 4, partindo-se de uma amostra de 84 pacientes, sendo 44 deles já diagnosticados com MM. Esse método de química analítica permite não só a identificação de potenciais biomarcadores, mas também a detecção de muitos peptídeos e proteínas no soro, sendo aplicado em muitos cânceres como renal, pulmonar e hepático (DEULOFEU, 2019). O método foi desenvolvido no final dos anos de 1890 quando J. J. Thomson determinou a relação massa/carga (m/z) do elétron. Baseia-se na mensuração das moléculas do analito - substância ou componente químico da amostra que é alvo de análise em um ensaio -, por meio da separação de íons em fase gasosa de acordo com suas diferentes m/z . (DURANS, 2022). O espectro de massas é representado num gráfico cartesiano bidimensional, em que o eixo x representa a relação m/z do íon encontrada no analito e o eixo y representa a intensidade do íon naquele local. (GROSS, 2017). A figura 7, extraída do estudo 4, evidencia a correlação entre o eixo x e y por meio de *box and whisker plot*, método de análise de amostras que é capaz de representar a variação de dados observados através quartis. Esse tipo de representação gráfica, possui a caixa, representada por um retângulo, que é formada pelo quartil inferior (Q1), quartil superior (Q3) e entre eles há a mediana (Q2) que indica o grau de simetria dos dados representados pela *box and whisker plot*, sendo simétrico quando posicionado no centro do retângulo. A diferença entre Q3 e Q1, ou interquartil, representa a amplitude da caixa e quanto maior o seu valor, maior a variabilidade dos dados analisados. Além disso, a caixa é cortada por uma reta (*whisker*), horizontal ou vertical, a depender da orientação do retângulo, que indica a variabilidade fora do quartil superior e inferior, possuindo valor máximo e mínimo, respectivamente (DIVAGAR, 2017).

Figura 7 – Box and whisker plot referente a análise de picos de m/z distintos encontrados nas amostras do grupo de treinamento.



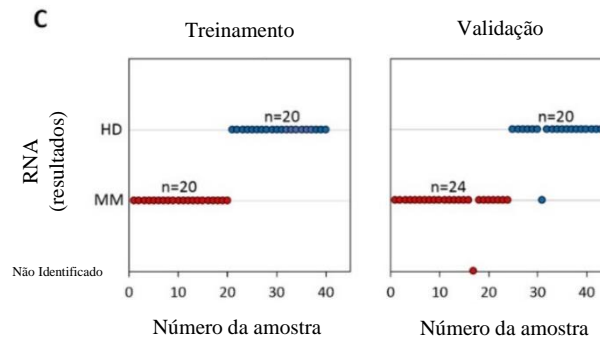
Legenda: Box and whisker plot de 28 picos de m/z distintos encontrados no grupo de treinamento (MM: 20 e DS: 20), incluindo as regiões com múltiplos picos de menor intensidade, ou seja, regiões com menor variabilidade de dados que foram utilizadas na análise do teste. m/z – Relação massa/carga; MM – Mieloma Múltiplo; DS – Doadores Saudáveis.

Fonte: DEULOFEU, 2019 (modificado).

No âmbito do Mieloma Múltiplo, a baixa quantidade de estudos que evidenciem biomarcadores relacionados à doença, entra como fator limitante para a avaliação do potencial diagnóstico dos métodos, por isso, outras metodologias entram para aperfeiçoar a análise. No estudo em questão, foi utilizado as Redes Neurais Artificiais, que entram como ferramenta matemática com capacidade de trabalhar com dados não lineares nos quais, a relação entre as variáveis é desconhecida ou muito complexa, e fornecer generalizações e previsões, sendo altamente adequadas para reconhecimento de padrões e classificações, tornando-se amplamente aplicadas em diferentes campos do diagnóstico clínico (AMATO, 2013).

Partindo disso, o estudo segmentou as 84 amostras em dois grupos: Treinamento, que continham 20 doadores saudáveis e 20 pacientes com MM, e Validação que possuía 24 MM e 20 doadores saudáveis. No grupo treinamento, a sensibilidade, especificidade e precisão do método em distinguir as amostras de MM foi de 100%, enquanto no grupo de Validação, a sensibilidade foi de 95,83% e especificidade de 95%, assim como demonstrado na figura 8.

Figura 8 – Resultado das redes neurais na identificação do número de amostras de MM e HD utilizadas no estudo 4.



Legenda: Identificação de amostras saudáveis (HD) ou como mieloma múltiplo (MM) pelas Redes Neurais Artificiais após Espectrometria de Massa, nos grupos Treinamento e Validação. É evidenciado no grupo de treinamento que as 20 amostras de MM (vermelho) e 20 amostras HD (azul) foram corretamente classificadas, mas no grupo de validação, uma amostra de HD foi incorretamente classificada como MM e uma amostra de MM não foi identificada pelo método de análise, concluindo, assim, com 42 amostras corretamente identificadas. RNA - Redes Neurais Artificiais; HD - doadores saudáveis; MM - Mieloma Múltiplo.

Fonte: DEULOFEU, 2019 (modificado).

O estudo número 5 trouxe um comparativo de prós e contras de métodos de citogenética clássica e molecular, como a Cariotipagem convencional (CC) e Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), respectivamente e, métodos de biologia molecular, como sequenciamento de nova geração (NGS) a partir de uma amostra de 35 pacientes diagnosticados com MM entre 2018 e 2019.

A CC e a FISH, são métodos que se baseiam em métodos citogenéticos que analisam a estrutura, funcionalidade, patologias e questões hereditárias dos cromossomos (MONTENEGRO, SANTOS; VEITH, 2008). Desse modo, a CC analisa o cariótipo, estudo da representação dos cromossomos presentes nas células que permite a análise quanto a presença de alterações cromossômicas, sendo as translocações e deleções os alvos de pesquisas recentes com foco no MM (YELLAPANTULA, 2019).

A FISH por sua vez, é um procedimento citogenético que possibilita a identificação de um trecho específico do DNA ou RNA e, dessa forma, uma sonda marcada com corante fluorescente é hibridizada com intuito de indicar a sequência complementar da sonda. Essa técnica é realizada em uma lâmina, por isso denominada *in situ*, sendo utilizado tecidos e preparações citológicas, nos quais, os cromossomos são espalhados, desnaturados e hibridizados mostrando fluorescência (NEVES; GUEDES, 2012).

Anormalidades citogenéticas têm significado prognóstico no MM, e aproximadamente 30 a 50% dos casos demonstram cariótipos anormais, e a frequência de

anormalidades também está diminuída em pacientes recém-diagnosticados. A análise citogenética pode fornecer informações prognósticas úteis, mas a atividade proliferativa espontânea particularmente baixa das células tumorais no estágio inicial da doença é considerada um importante fator limitante (AYDIN, 2020).

Outra técnica abordada no estudo 5, foi o sequenciamento de nova geração (NGS) que consiste em tecnologias recentes para sequenciamento de DNA e RNA, permitindo a detecção de variantes e mutações. Ao combinar vantagens químicas de sequenciamento exclusivas, matrizes de sequenciamento e tecnologia de bioinformática, é possível, através da NGS, o sequenciamento paralelo massivo de vários comprimentos de sequências de material genético ou mesmo o genoma inteiro dentro de um tempo relativamente curto. Com isso, a NGS permite análise de mutações relacionadas a cânceres, como o MM, em um tempo mais curto e necessitando de menor quantidade de amostra para se realizar uma análise genômica ampla (QIN, 2019).

Nesse sentido, a cariotipagem convencional no estudo 5, falhou em 10 dos 35 pacientes (28,5%) e 25 pacientes apresentaram cariótipo normal (71,4%). Já o FISH se apresentou anormal em 8 das 35 amostras (22,8%). O NGS foi aplicado a todas as amostras e encontrou-se variações patogênicas ou potencialmente patogênicas em 6 das 25 (24%) amostras com cariótipo normal e uma variante patológica foi encontrada em 5 das 8 (62,5%) amostras com FISH anormal.

A partir disso, a tabela 4 reuniu os dados estatísticos, que foram disponibilizados, relacionados à sensibilidade, especificidade, VPP e VPN obtidos a partir dos métodos moleculares evidenciados. O VPP foi calculado através da relação da quantidade de doentes sobre o total de pacientes com teste positivo, enquanto o VPN é a relação entre não doentes e o total de pacientes com teste negativo (KAWAMURA, 2002).

Tabela 4 – Sensibilidade, especificidade, VPP e VPN relacionados aos métodos evidenciados

Autor	Método Diagnóstico Estudado	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	VPP (%)	VPN (%)
JONES, C I. et al.	Detecção de microRNAs por PCR de transcrição quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	97,4%	92,3%	92,67%	97,26%
AITA, M H C. et al.	Comparação entre Imunofixação e Eletroforese de proteínas	-	-	-	-
GAGLIARDI, A. et al.	Fração de Cadeia leve livre (FLC)	69,9%	-	-	-
DEULOFEU, M. et al.	Espectrometria de massa associada a Redes Neurais Artificiais	95,83%	95%	95,83%	95%
ALTI, E I. et al.	Cariotipagem convencional, Hibridização in situ por fluorescência (FISH) e Sequenciamento de Nova Geração (NGS).	-	-	-	-
LI, J; ZHANG, M; WANG, C.	Detecção de microRNAs por PCR de transcrição quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	91,3%	93,7%	93,83%	88,98%

Fonte: Elaborado pela autora.

A amostragem dos estudos selecionados apresentou algumas divergências. Além de variarem quanto ao número bruto de amostras utilizadas, também apresentaram variabilidade quanto ao tipo de amostra utilizada. Três estudos (2, 4 e 5) utilizaram somente amostras de pacientes com Mieloma Múltiplo e paciente saudáveis, enquanto os demais estudos (1, 3 e 6), incluíram também amostras de pacientes com SMM e MGUS, o que também se torna relevante à medida que esses estágios iniciais tendem a evoluir para o MM com um percentual de chance de 10% nos primeiros 5 anos de diagnóstico. Logo, a sua detecção exige um acompanhamento assíduo que leva à um diagnóstico precoce do MM, caso o quadro evolua para esse desfecho (HEIDER, 2021).

Os métodos diagnósticos evidenciados pelos estudos selecionados apresentaram variabilidade, tanto em relação as metodologias empregadas, quanto à sensibilidade e especificidade encontradas. Os estudos 4 e 5 trabalharam com Espectrometria de massa associada a redes neurais e cariotipagem, hibridização *in situ* e sequenciamento de nova geração, respectivamente, sendo esses, métodos moleculares mais complexos, com maior grau de tecnologia empregado, profissionais mais especializados para sua realização e, claramente, maior custo associado. Quanto aos dados estatísticos, o estudo 4 apresentou sensibilidade e especificidade maior que o 5. Sendo assim, a Espectrometria de massa associada a redes neurais é capaz de detectar o MM em 95 pessoas dentro de um grupo de 100 pessoas que possuem a doença, sendo estatisticamente mais relevante que a metodologia empregada pelo estudo 5.

A detecção de microRNAs por PCR em tempo real, foi o objeto de análise dos estudos 1 e 6. Utilizando-se de um método desenvolvido inicialmente em 1983 por Kary Mullis (ZAHA, 2012) e amplamente usado na detecção do SARS-CoV-2, durante a recente pandemia da COVID-19 (SULE, 2020), os dois estudos em questão divergiram em alguns aspectos. Primeiramente, ambos necessitaram de análise prévia quanto aos microRNAs potencialmente biomarcadores associados ao MM, o que representa um ponto de falha, visto que, não está claro na literatura os melhores biomarcadores relacionados a doença, para, somente depois disso, proceder-se com a PCR em tempo real. O primeiro ponto de divergência foi justamente relacionado aos biomarcadores utilizados, enquanto o estudo 1 analisou a combinação de miR-1308 e miR-720, o estudo 6 analisou miR-107, miR-15a-5p em conjunto com níveis séricos de hemoglobina.

Em relação aos dados estatísticos, o estudo 1 apresentou sensibilidade 6,1% superior ao estudo 6. Já em relação a especificidade, a diferença percentual foi menor

(1,4%). Com isso, evidencia-se que a PCR em tempo real tem potencial no diagnóstico do MM, porém seu desempenho está condicionado aos biomarcadores utilizados que ainda estão em processo de pesquisa, não havendo consenso presente na literatura.

Dois métodos amplamente utilizados no diagnóstico de diversas patologias foram confrontados entre si no estudo 2. A IFS e EFS já fazem parte das ferramentas utilizadas no diagnóstico do MM, sendo solicitadas de forma individual ou complementares (CAERS, 2018). Dessa forma, o estudo 2 se propôs a analisar qual dos métodos seria mais sensível para detecção do pico monoclonal associado ao mieloma.

O estudo em questão apresentou alguns pontos falhos ao não evidenciar os dados de sensibilidade e especificidade individual de cada método citando apenas a precocidade média de 6,6 meses da IFS detectar o componente monoclonal em relação à EFS. Além disso, nesse estudo houve uma diminuição de amostragem, tendo em vista que os 52 pacientes foram acompanhados para potencial recidiva e apenas 9 deles apresentaram esse desfecho, resultando nesse número como amostra relacionada ao dado encontrado de precocidade. Com isso, o estudo 2 apresentou limitações para análise estatística, ao possuir redução significativa de amostragem e não evidenciar percentuais quanto a sensibilidade e especificidade dos métodos estudados, impedindo uma comparação de maior criticidade, não somente entre IFS e EFS, mas também com os demais métodos encontrados nesta revisão de literatura.

No estudo 3 foi analisado a fração de cadeia leve livre, alvo promissor considerando a sua capacidade de mensurar e distinguir as cadeias de imunoglobulinas envolvidas, fator esse importante para a correta classificação da patologia, bem como da sua conduta terapêutica e prognóstico (GAGLIARDI, 2016). Estatisticamente, o estudo 3 apresentou percentual de sensibilidade abaixo dos encontrados nos métodos acima citados. Essa baixa numérica pode estar relacionada à amostragem utilizada, visto que as amostras sofreram alterações por conta do tempo e da conjuntura. A amostragem que foi utilizada na testagem do método de detecção FLC, ao mesmo tempo que eram utilizadas na análise também recebiam tratamento para a doença, logo, a eficácia da terapêutica pode ter colaborado para a menor sensibilidade do método, considerando a redução das cadeias leves livres devido a remissão da doença. Apesar disso, o estudo não considerou a eficácia terapêutica como fator interferente nos dados obtidos da pesquisa, destacando a FLC como possível de uso para diagnosticar e acompanhar o MM.

Levando-se em consideração todo o exposto, os métodos evidenciados pelos estudos 1, 4 e 6 se mostraram ser os mais sensíveis na detecção do MM, com percentuais acima de 90% em comparação com os estudos 3 e 5 que tiveram a sua sensibilidade em torno de 70% e com o estudo 2, que não revelou dados estatísticos nesse sentido. Entretanto, todos os estudos que integram esta revisão de literatura concluíram suas análises com a perspectiva positiva de que todos os métodos podem ser utilizados para o diagnóstico e/ou acompanhamento do Mieloma Múltiplo. Desta forma, pode-se intervir terapêuticamente, frente à uma detecção precoce da doença, oferecendo assim, um melhor desfecho ao paciente. A escolha de um método ou outro permanece à critério dos profissionais envolvidos, do paciente e da disponibilidade de realização no território.

Deve ficar evidente que a carência de pesquisas e publicações na área atuou como fator limitante para o desenvolvimento deste estudo, por impedir o confronto de dados e análise estatística mais ampla e crítica. Associado a isso, têm-se ainda, o fato de o estudo 2 apresentar dados estatísticos diferentes dos encontrados nos demais estudos, dificultando a sua interpretação e comparação com os demais.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados no presente estudo se mostraram promissores para o avanço no diagnóstico precoce do Mieloma Múltiplo, mas indicam ainda a necessidade de maior progresso científico. A partir da análise dos estudos conclui-se que:

1. A espectrometria de massa associada a redes neurais artificiais e a detecção de microRNAs por PCR em tempo real parecem ser os métodos mais sensíveis para o diagnóstico precoce do MM.
2. Apesar de apresentarem percentuais mais baixos, a cariotipagem convencional, FISH, NGS e FLC também se mostraram úteis para o diagnóstico e acompanhamento do curso da doença. IFS e EFS, como metodologias já amplamente utilizadas no diagnóstico, apresentaram bons resultados para detecção do pico monoclonal, destacando-se a IFS como mais precoce, mesmo que não tenha sido apresentado dados estatísticos concisos.
3. Ainda são necessários mais estudos que envolvam os métodos estudados para melhor verificação dos dados já existentes e possível confronto com dados futuros. A partir disso, será possível melhorar não somente a abordagem diagnóstica do MM, mas também trará impactos positivos nas condutas terapêuticas, no conhecimento médico-profissional e, principalmente, será possível ofertar melhor qualidade de vida e perspectivas futuras ao paciente e sua rede familiar.
4. Os resultados desse trabalho mostram-se úteis para escolha de métodos diagnósticos frente a um possível quadro de Mieloma Múltiplo, além de poder ser fonte de busca e análise por pesquisas futuras relacionadas à doença em questão, ao grupo das gamopatias monoclonais, ou ainda, ao grande grupo das neoplasias hematológicas.

8. REFERÊNCIAS

AITA, M.H.C. et al. Comparison between immunofixation and electrophoresis for the early detection of relapsed multiple myeloma. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 51, n. 6, dez 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpm/a/CQ3LG6Q3YxKHVHxCVH5dHCP/?lang=en>>.

ALTI, E.I. et. al. Pros And Cons For Fluorescent In Situ Hybridization, Karyotyping And Next Generation Sequencing For Diagnosis And Follow-Up Of Multiple Myeloma. **Balkan Journal Of Medical Genetics.** v. 12, n. 2, p. 59-64, nov 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8009570/>>.

AMATO, F. et. al. Artificial neural networks in medical diagnosis. **Journal of Applied Biomedicine.** v.11, p. 47-58, 2013. Disponível em: <https://jab.zsf.jcu.cz/artkey/jab-201302-0001_artificial-neural-networks-in-medical-diagnosis.php>.

ATKIN, C; RICHTER, A; SAPEY, E. What is the significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance?. **Clin Med (Lond).** v. 18, n. 5, p. 391-396, out 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6334115/>>.

AYDIN, C. et. al. Conventional Cytogenetics and Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Results in Multiple Myeloma: A Turkey Laboratory Analysis of 381 Cases. **Indian J Hematol Blood Transfus.** v. 36, n. 2, p. 284-291, abr 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7229081/>>.

BARWICK, B.G. et al. Cell of Origin and Genetic Alterations in the Pathogenesis of Multiple Myeloma. **Front Immunol.** v. 10, n. 1121, mai 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6558388/>>.

BEBNOWSKA, D. et. al. Immunological Prognostic Factors in Multiple Myeloma. **Int J Mol Sci.** v. 22, n. 7, p. 3587, abr 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8036885/>>.

CAERS, J. et al. European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. **Haematologica.** v. 103, n. 11, p. 1772-1784, nov 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6278986/>>.

CRUSOE, E. Q. et al. Desempenho diagnóstico do Freelite® para detecção de Mieloma Múltiplo em uma população brasileira. **Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.** 2018. Disponível em: <http://newslab.com.br/wp-content/uploads/yumpu_files/Desempenho%20diagn%C3%B3stico%20do%20Freelite%20para%20detec%C3%A7%C3%A3o%20de%20Mieloma%20M%C3%BAltiplo%20em%20uma%20popula%C3%A7%C3%A3o%20brasileira.pdf>.

CSAKO, G. Immunofixation Electrophoresis for Identification of Proteins and Specific Antibodies. **Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)**. v. 869, p. 147-171, abril 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22585484/>>.

DEULOFEU, M. et. al. Rapid discrimination of multiple myeloma patients by artificial neural networks coupled with mass spectrometry of peripheral blood plasma. **Scientific Reports**. v. 9, p. 7975, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6538619/>>.

DIAS, A.L.M.S. et al. Multiple myeloma and central nervous system involvement: experience of a Brazilian center. **Hematol., Transfus. Cell Ther.** v. 40, n. 1, jan 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/htct/a/8ftRW8FQ7nZs9K7Zzcww9Cc/?lang=en>>.

DIVAGAR, K. et al. Data analysis using Box and Whisker plot for Functional Point. **International Conference on Trends in Electronics and Informatics**. maio 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/317385336_Data_analysis_using_Box_and_Whisker_plot_for_Functional_Point>.

DURANS, A.F.F. Aplicação de Métodos Quimiométricos e Espectrometria de Massa para Detectar Câncer de Próstata através da urina. Dissertação Mestrado em Química, **Universidade Federal de Uberlândia**, 2022. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/36162>>.

ELM, E.V. et. al. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. **J Clin Epidemiol**. v. 61, n. 4, p. 344-9, abril 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18313558/>>.

ERCOLE, F.F; MELO, L.S; ALCOFORADO, C.L.G. Revisão Integrativa versus Revisão Sistemática. **Rev Min Enferm**. v. 18, n. 1, p. 1-260, jan 2014. Disponível em: <<https://cdn.publisher.gn1.link/remo.org.br/pdf/v18n1a01.pdf>>.

FAZEL, F; BASSA, F. An approach to the diagnosis and management of multiple myeloma. **S Afr Med J**. v. 109, n. 10, p. 723-727, out 2019. Disponível em: <<http://www.scielo.org.za/pdf/samj/v109n10/09.pdf>>.

FERREIRA, K.S. et al. Clinical characterization and survival of patients with multiple myeloma in a state of northeast brazilian. **Revista Cubana de Hematología, Inmunol y Hemoter**. v. 33, n. 2, fev 2017. Disponível em: <<http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/509/308>>.

GAGLIARDI, A. et. al. Combined use of free light chain and heavy/light chain ratios allow diagnosis and monitoring of patients with monoclonal gammopathies: Experience of a single institute, with three exemplar case reports. **Oncology Letters**. v. 12, n. 4, p. 2363-2370, out 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5038391/>>.

GROSS, J.H. **Mass Spectrometry**. 3^a ed. Suíça: Springer, 2017.

GULLA, A; ANDERSON, K.C. Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into the future. **Haematologica** 2020. v. 105, n. 10, p. 2358-2367, out 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33054076/>>.

HEIDER, M. et. al. Multiple Myeloma: Molecular Pathogenesis and Disease Evolution. **Oncol Res Treat**. v. 44, n. 12, p. 672-681, dez 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8743906/>>.

HENEGHAN, H.M. et. al. Systemic miRNA-195 Differentiates Breast Cancer from Other Malignancies and Is a Potential Biomarker for Detecting Noninvasive and Early Stage Disease. **The Oncologist**. v. 15, p. 673-682, jun 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228012/>>.

JONES, C.I. et. al. Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma. **British Journal of Cancer**. v. 107, n. 12, p. 1987-1996, dez 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3516695/>>.

KEREN, D.F. The use of high-resolution electrophoresis, kappa and lambda quantification, and immunofixation to diagnose monoclonal gammopathies in serum. **Clin Immunol**. v. 7, n. 1, p. 106-110, 1990.

KONG, Y. W; MCCOLLOUGH, D.F; JACKSON, T.J. microRNAs in cancer management. **The Lancet Oncology**. v. 13, n. 6, p. 249-258, jun 2012. Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(12\)70073-6/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(12)70073-6/fulltext)>.

KUMAR, V. et al. Role of Bone Marrow Aspiration and Biopsy in Diagnosis of Hematological Disorders: A Prospective Study. **J Pharm Biomed Sci**. v. 6, n. 3, p. 150-154, dez 2015. Disponível em: <https://scholar.archive.org/work/axfevavzfzdyhgycbe6kj5jjjm/access/wayback/http://lawarencepress.com/ojs/index.php/JPBMS/article/viewFile/68/pdf_39>.

KUNACHEEWA, C; MANASANCH, E.E. High-risk smoldering myeloma versus early detection of multiple myeloma: current models, goals of therapy, and clinical implications. **Best Pract Res Clin Haematol**. v. 33, n. 1, jan 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7069728/>>.

KUWAMURA, T. Interpretação de um teste sob a visão epidemiológica. **Arq Bras Cardiol**. v. 79, n. 4, p. 437-441, 2002. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/abc/a/H5MFfM6Syr6HwLnNPdwRqyg/?format=pdf&lang=pt>>.

LI, J; ZHANG, M; WANG, C. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**. v. 34, n. 6, jun 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7307343/>>.

MALTA, M. et al. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. **Rev Saúde Pública**. v. 44, n.3, p. 559-665, jun 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/3gYcXJLzXksk6bLLpvTdnYf/?lang=pt>>.

MENDES, K.D.S; SILVEIRA, R.C.C.P; GALVAO, C.M. Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem. **Texto e Contexto - enferm**. v. 17, n. 4, p. 758-764, dez 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/tce/a/XzFkq6tjWs4wHNqNjKJLkXQ/?lang=pt>>.

MONTENEGRO, V. S.; SANTOS, V. M. V. O.; VEITH, M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. **Rev. Fac. Ciênc. Méd.** v. 10, n. 3, p. 5-12, ago. 2008. Disponível em: <<https://revistas.pucsp.br/index.php/RFCMS/article/viewFile/581/655>>.

MOREIRA, R.S; MAGALHAES, L.C.; ALVES, C.R.L. Efeito do nascimento prematuro no desenvolvimento motor, comportamento e desempenho de crianças em idade escolar: revisão sistemática. **J. Pediatr**. v. 90, n. 2, p. 119-134, mar 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jped/a/GccjjpgRCZ43dVXYNFTbCpCy/?lang=pt>>.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização in situ fluorescente: Princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, dez 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aib/v79n4/a23v79n4.pdf>>.

OLIVEIRA, E. et. al. Eletroforese: conceitos e aplicações. **Enciclopédia biosfera**. Centro Científico Conhecer – Goiânia. v. 11 n. 22; p. 1129, 2015. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015c/agrarias/Eletroforese.pdf>>.

PAVAN, E. Estudo Citogenético e Molecular em Mieloma Múltiplo. **Academia de Ciência e Tecnologia**, 2012. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/biblioteca-digital/outros_temas/citologia_patologica/7-Estudo-citogenetico-e-molecular-em-Mieloma-multiplo.pdf>.

PEÑA, C. et. al. Sensibilidad diagnóstica de electroforesis de proteínas y cadenas livianas libres séricas en gammapatías monoclonales: Diagnostic accuracy of serum protein electrophoresis and free light chain measurements for monoclonal gammopathies. **Rev Med Chile**. v. 146, n.1, fev 2018. Disponível em: <https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872018000100064>.

POLO, T.C.F; MIOT, H.A. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 19, 2020. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jvb/a/8S8Pfqnz8csmQJVqwgZT8gH/?lang=pt>>.

QIN, D. Next-generation sequencing and its clinical application. **Cancer Biol Med**. v. 16, n. 1, p. 4-10, fev 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6528456/>>.

RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. **Am J Hematol.** v. 97, n. 8, p. 1086-1107, ago 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35560063/>>.

RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk stratification, and management. **Am J Hematol.** v.93, n.8, p. 981-1114, ago 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6223128/>>.

REID, G; KIRSCHNER, M.B; ZANDWIJK, N.V. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use a biomakers. **Crit Rev Oncol Hematol.** v.80, n. 2, p. 193-208, nov 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842810002611?via%3Dihub>>.

SEESAGHUR, A. et. al. Clinical features and diagnosis of multiple myeloma: a population-based cohort study in primary care. **BMJ Open.** v. 11, n. 10, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8496401/>>.

SILVA, R.O.P; LOPES, A.F; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais.** v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008. Disponível em: <<http://rmmg.org/artigo/detalhes/520>>.

SOLIMAN, A.M. et. al. Role of microRNAs in Diagnosis, Prognosis and Management of Multiple Myeloma. **Int J Mol Sci.** v. 21, n. 20, p. 7539, out 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7589124/>>

SULE, W.F; OLUWAYELU, D.O. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. **Pan Afr Med J.** v. 35, n. 2, p. 121, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7687508/>>.

TISELIUS, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. **Trans Farad Soc.** v. 33, p.524–531, 1937.

TOMAZ, A.P. et. al. The detection of Bence Jones protein in urine by the heat test helps in diagnosis of multiple myeloma?. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v. 53, n. 1, jan 2017. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpm/a/QpPXKGckTRFnN3LtfRwm43r/?lang=en#>>.

YELLAPANTULA, V. et. al. Comprehensive detection of recurring genomic abnormalities: a targeted sequencing approach for multiple myeloma. **Blood Cancer J.** v. 9, n. 12, p. 101, dez 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6906304/>>.

ZAHA, A; FERREIRA, H; PASSAGLIA, L.M.P. *Biologia Molecular Básica.* 4ª edição. ArtMed. 26 jan 2012.

APÊNDICE A – Artigo de revisão a ser submetido

Artigo de Revisão

POTENCIALIDADE DOS MÉTODOS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO NA IDENTIFICAÇÃO PRECOCE DE MIELOMA MÚLTIPLO: UMA REVISÃO INTEGRATIVA DA LITERATURA

Anna Caroline Reis de Souza^a, Larissa Paola Rodrigues Venancio^b

^a Universidade Federal do Oeste da Bahia

^b Universidade Federal do Oeste da Bahia

RESUMO

Introdução: Mieloma Múltiplo é uma neoplasia maligna incurável do sistema hematológico, causada por disfunção proliferativa clonal de plasmócitos na medula óssea, os quais promovem a produção e secreção de imunoglobulinas do tipo IgG monoclonal ou parte delas, chamadas de proteínas M. A presença da proteína monoclonal sob o achado de “pico monoclonal” no soro e/ou urina do paciente, é o achado laboratorial encontrado por meio dos métodos moleculares, sendo a eletroforese de proteínas e imunofixação de urina 24h os mais utilizados para estadiamento correto da doença frente a outras gamopatias monoclonais, bem como para investigação e diagnóstico precoce do Mieloma Múltiplo.

Objetivo e metodologia: Por meio deste artigo, buscou-se revisar os principais métodos moleculares de diagnóstico para o Mieloma Múltiplo, evidenciando os potenciais de sensibilidade e especificidade de detecção das anormalidades relacionadas à doença pelos métodos estudados, além de tornar evidente a importância dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce do Mieloma Múltiplo.

Resultados e Discussão: A detecção de microRNAs por PCR em tempo real (qRT-PCR) se mostrou como a mais sensível (97,4%) e a Espectrometria de Massa associada à Redes Neurais se mostrou a mais específica (95%). Além disso, a Imunofixação Sérica (IFS) e Eletroforese de Proteínas, como os métodos mais utilizados atualmente, se mostraram sensíveis e específicos, mas com precocidade cerca de 6,6 meses para IFS. Nesse sentido, os resultados encontrados se mostraram promissores para o avanço diagnóstico precoce de MM.

Conclusões: Espectrometria de Massa e detecção de microRNAs por RT-qPCR se mostraram os mais sensíveis, mas, ainda assim, os demais métodos também apresentaram potencial diagnóstico e de acompanhamento da doença. Ainda são necessários mais estudos que envolvam os métodos estudados para melhor verificação dos dados apresentados nesta pesquisa, que servirá de fonte de busca e análise para pesquisas futuras.

Introdução

Mieloma Múltiplo é uma neoplasia maligna incurável do sistema hematológico, causada por disfunção proliferativa clonal de plasmócitos na medula óssea, os quais promovem a produção e secreção de imunoglobulinas do tipo IgG monoclonal ou parte delas, chamadas de proteínas M, podendo ser identificadas no soro ou na urina, mas também em locais extramedulares ou sangue periférico durante a progressão da doença.¹

Representando a segunda neoplasia hematológica mais comum e cerca de 1% de todas as neoplasias malignas, o Mieloma Múltiplo costuma se apresentar de forma inespecífica, sendo esse um dos principais fatores que dificultam o seu diagnóstico, piorando, conseqüentemente, o prognóstico dos pacientes acometidos.²

A presença da proteína monoclonal sob o achado de “pico monoclonal” no soro e/ou urina do paciente, é o achado laboratorial encontrado por meio dos métodos moleculares, sendo a eletroforese de proteínas e imunofixação de urina 24h os mais utilizados para estadiamento correto da doença frente a outras gamopatias monoclonais, bem como para investigação e diagnóstico precoce do Mieloma Múltiplo.³

Sinais e sintomas associados ao Mieloma Múltiplo

Os pacientes acometidos por essa neoplasia costumam apresentar sintomatologia vasta e, recorrentemente inespecífica; porém, alguns sintomas possuem relevância e são eles: fadiga, dor óssea, comumente referida na região lombar, anemia, insuficiência renal, hipercalcemia e fraturas ósseas não relacionadas à traumas físicos ou outra doença de base.² Essa sintomatologia clássica, é comumente referida pela sigla “CRAB” (C: hipercalcemia, R: insuficiência renal, A: anemia e B: lesões ósseas).⁴ No entanto, por ser uma patologia do sistema hematológico e possuir caráter sistêmico, o Mieloma Múltiplo pode, também, causar disfunções extra-medulares, ainda que somente em 3-5% dos casos. Geralmente, os acometimentos extra-medulares envolvem a pele, nasofaringe, laringe, trato respiratório superior e sistema nervoso central.⁵

Epidemiologia

Aproximadamente 28,6% dos casos de MM são diagnosticados na idade de 65 a 74 anos e cerca de 3,5% abaixo da idade de 44 anos. A incidência é maior em indivíduos de etnia negra do que etnia branca e mais comum no sexo masculino que no feminino.⁶ A mortalidade no MM é bastante elevada, estimando-se que, em 2020, ocorreram 12.380 óbitos nos Estados Unidos, enquanto na Europa, o número chega a 31.000 mortes anuais.⁷

Diagnóstico de Mieloma Múltiplo e estágios precursores

Em grande parte dos casos, o Mieloma Múltiplo é precedido por estágios precursores assintomáticos. O curso mais comum da doença, começa por um quadro de Gamopatia monoclonal de significado indeterminado (MGUS), que possui três características principais diagnósticas: presença monoclonal no soro em concentração <30g/L, proliferação de células clonais na medula óssea e ausência de características de lesão de

órgãos-alvo, típicas de Mieloma Múltiplo.⁸ Entre a MGUS e o Mieloma Múltiplo, há o estágio de Mieloma Múltiplo Latente (SMM). Em 2010, o termo SMM foi estratificado quanto ao risco de desenvolver MM, variando de baixo risco, com 5% de chance de progressão, até risco ultra-alto, que tem a sua chance de progressão em 40%, sendo já considerado Mieloma Múltiplo de fato por requerer tratamento.⁹ A figura 1 reúne de forma sintética e objetiva esses dados sobre os principais estágios precursores que evoluem para o Mieloma Múltiplo.

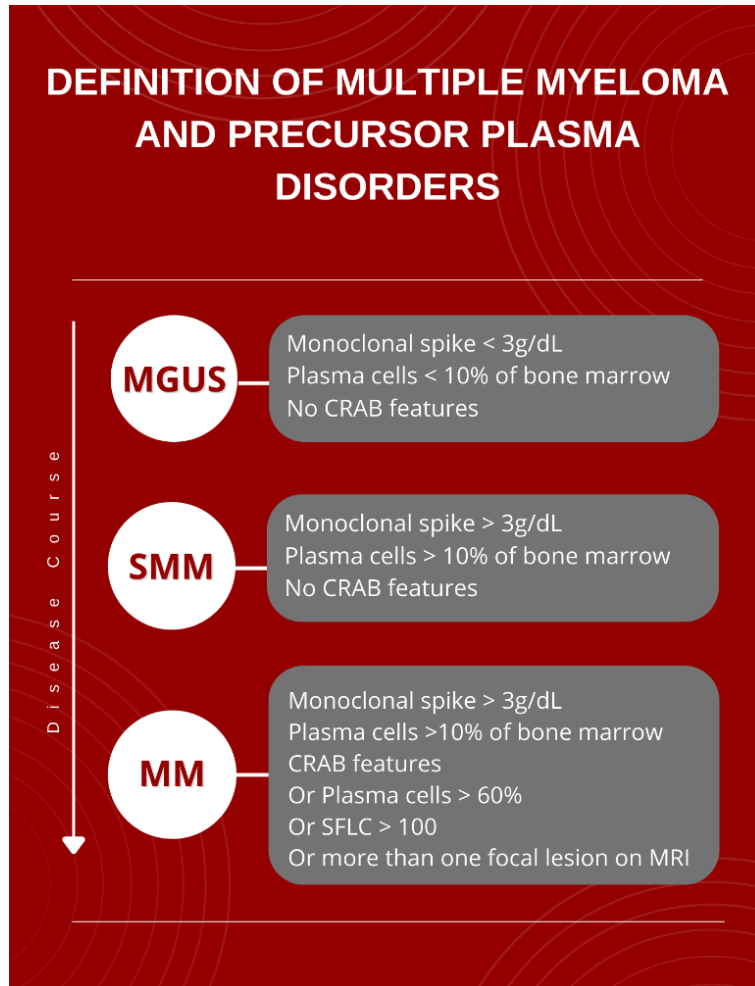


Figura 1 – Critérios definidores de Mieloma Múltiplo e seus distúrbios plasmáticos precursores, incluindo MGUS e SMM.⁸ MGUS – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado; SMM – Mieloma Múltiplo Latente; MM – Mieloma Múltiplo; CRAB- Hipercalcemia, Insuficiência renal, Anemia e Lesões ósseas; SFLC – Fração de cadeia leve livre; MRI – Ressonância Magnética.

Um paciente é diagnosticado com Mieloma Múltiplo quando possui infiltração clonal maior ou igual a 10% na medula óssea associada a lesão orgânica e proteína monoclonal detectável em soro ou urina.³ Em grande parte dos casos, o primeiro achado compatível com o protocolo diagnóstico é a presença da proteína monoclonal ou pico monoclonal em soro ou urina, decorrente da produção e secreção de imunoglobulinas anômalas originadas de plasmócitos também anormais

Métodos Diagnósticos Existentes

Proteínas de Bence Jones: Apesar de descoberta no ano de 1847 e tendo sofrido evoluções e melhorias científicas ao longo dos anos, o teste de proteínas de Bence Jones (BJ) está perdendo espaço para testes mais sensíveis, mesmo que seu método seja de fácil execução e baixo custo. Sendo descritas pela primeira vez pelo Dr. Henry Bence Jones, as proteínas de Bence Jones é a denominação dada às imunoglobulinas de cadeia leve que, quando detectadas na urina, recebem essa denominação.¹⁰

Eletroforese de proteínas: Os fundamentos da eletroforese têm sua origem nos estudos de Michaelis, em 1909.¹¹ Hoje, pode ser empregada para separar os componentes sanguíneos, urinários, líquóricos e outras soluções. Mas, no que diz respeito ao Mieloma Múltiplo, bem como outras gamopatias monoclonais, o componente proteico usado na eletroforese mais importante são as gamaglobulinas. As estruturas moleculares das imunoglobulinas são heterogêneas, mas, apesar disso, a migração delas na eletroforese ocorre de forma homogênea, formando bandas bem compactas e delimitadas. A essas bandas dá-se o nome de banda policlonal. Entretanto, quando diante de gamopatias monoclonais como o Mieloma Múltiplo, o traçado eletroforético é distinto, ocupando uma posição ampla e delimitada.¹²

Imunofixação: a imunofixação é cerca de 10 vezes mais sensível que a eletroforese sérica para identificar a presença da proteína monoclonal, bem como as cadeias leves ou pesadas envolvidas.¹³ A técnica consiste no emprego de reação imunológica, antígeno-anticorpo, para verificar a formação de precipitina em géis ou membranas com o objetivo de visualizar presença de proteínas específicas. O gel ou membrana é lavado de modo a eliminar o que não pertence ao imunoprecipitado e, após isso, o material é corado com fluoresceína, por exemplo, permitindo melhor avaliação da reação imunológica.¹⁴

Outros métodos: Outros métodos diagnósticos que podem ser utilizados, incluem radiografia de esqueleto, tomografia computadorizada de corpo inteiro, mielograma e biópsia de medula sendo bastante empregados não somente para a confirmação de Mieloma Múltiplo, mas também para descartar possíveis quadros de Gamopatia Monoclonal de Sinal Indeterminado ou Mieloma Múltiplo Latente.¹ O mielograma e biópsia de medula óssea tem grande importância prática no diagnóstico de MM, por permitir a quantificação de plasmócitos infiltrantes e estudos citogenéticos. Estima-se que a biópsia de medula tenha identificado corretamente o MM em 95% dos casos sintomáticos, sendo um dos métodos recomendados para avaliação plasmocitária anormal.¹³ Porém, cabe ressaltar que a avaliação mais precisa e detalhada do conteúdo medular, só é obtido a partir da realização do aspirado de medula somado a biópsia desse conteúdo.¹⁵

Objetivo e Metodologia

Por meio deste artigo, buscou-se revisar os principais métodos moleculares de diagnóstico para o Mieloma Múltiplo, evidenciando os potenciais de sensibilidade e especificidade de detecção das anormalidades relacionadas à doença pelos métodos estudados, além de tornar evidente a importância dos métodos moleculares de diagnóstico na identificação precoce do Mieloma Múltiplo.

Métodos moleculares encontrados

Espectrometria de Massa Associada à Redes Neurais Artificiais

Esse método de química analítica permite não só a identificação de potenciais biomarcadores, mas também a detecção de muitos peptídeos e proteínas no soro, sendo aplicado em muitos cânceres como renal, pulmonar e hepático.¹⁶ O método foi desenvolvido no final dos anos de 1890 quando J. J. Thomson determinou a relação massa/carga (m/z) do elétron. Baseia-se na mensuração das moléculas do analito - substância ou componente químico da amostra que é alvo de análise em um ensaio -, por meio da separação de íons em fase gasosa de acordo com suas diferentes m/z.¹⁷

As Redes Neurais Artificiais, que entram como ferramenta matemática com capacidade de trabalhar com dados não lineares nos quais, a relação entre as variáveis é desconhecida ou muito complexa, e fornecer generalizações e previsões, sendo altamente adequadas para reconhecimento de padrões e classificações, tornando-se amplamente aplicadas em diferentes campos do diagnóstico clínico.¹⁸

Partindo disso, um estudo segmentou 84 amostras em dois grupos: Treinamento, que continham 20 doadores saudáveis e 20 pacientes com MM, e Validação que possuía 24 MM e 20 doadores saudáveis. No grupo treinamento, a sensibilidade, especificidade e precisão do método em distinguir as amostras de MM foi de 100%, enquanto no grupo de Validação, a sensibilidade foi de 95,83%, especificidade de 95% e precisão de 95,45%.¹⁶

Detecção de microRNAs por PCR em tempo real

Os microRNAs são pequenos RNAs não codificantes conhecidos por regularem a expressão gênica. Geralmente, se ligam aos mRNAs (RNAs mensageiros) na sua porção 3' não traduzida e causam hiporregulação da expressão proteica por repressão traducional ou clivagem e degradação do mRNA alvo.¹⁹ O uso de miRNAs como biomarcadores aumentou muito com a descoberta de que eles estão presentes no sangue circulante, sendo evidenciado que podem ser detectados no soro ou plasma humano, onde se acredita que sejam protegidos da degradação por serem encapsulados em microvesículas ou exossomos e/ou são ligados por proteínas de ligação ao RNA.²⁰ Mudanças nos níveis de miRNAs circulantes têm sido associadas a vários tipos de câncer. Esses dados, portanto, mostram que é viável o uso de miRNAs derivados de amostras de sangue como uma ferramenta de diagnóstico minimamente invasiva para pacientes com câncer.²¹

Jones et al. identificaram três microRNAs como biomarcadores: miR-720, miR-1246 e miR-1308 e a partir disso, foi visto que a combinação de miR-1308 e miR-720 (miR-1308/miR-720) apresentou resultados mais promissores. Essa combinação apresentou 97,4% e especificidade de 92,3%, dando apenas 7,7% de falsos positivos e 2,6% de falsos negativos no que diz respeito a distinção entre os pacientes com MM, MGUS e doadores saudáveis.²²

Além disso, outra combinação analisada foi a de miR-1246 e miR-1308 (miR-1246/[miR-1308]) que apresentou sensibilidade de 79,2% e especificidade de 66,7%, sendo inferiores aos apresentados pela combinação anterior, mas, ainda assim, foi considerado capaz de distinguir MM dos seus estágios precursores.²²

Outra linha de pesquisa identificou miR-107, miR-15a-5p e níveis séricos de hemoglobina (Hb) como potenciais biomarcadores. Nesse caso, o método apresentou sensibilidade de 91,3% e especificidade de 93,7%, melhorando assim, o valor diagnóstico do MM.²³

Imunofixação sérica e Eletroforese de Proteínas

A Imunofixação (IFS) e a Eletroforese de Proteínas (EFS) fazem parte do protocolo diagnóstico atual de MM e, geralmente, são solicitadas de forma concomitante tendo uma sensibilidade próxima a 97%.²⁴ Aita et al. realizou uma análise comparativa entre datas de detecção do pico monoclonal em pacientes com recidiva de MM pela IFS e pela EFS. Em todos os 9 pacientes, a IFS detectou o componente monoclonal com maior antecedência que a EFS, com uma média de 6,6 meses de precocidade. Além disso, a EFS não detectou o componente monoclonal em cinco pacientes, mesmo esses apresentando as características clínicas compatíveis com a doença, o que demonstrou a maior acurácia da IFS quanto a precocidade diagnóstica.²⁵

Cariotipagem convencional, FISH e NGS

A Cariotipagem Convencional (CC) e a FISH (hibridização *in situ* por imunofluorescência), são métodos que se baseiam em métodos citogenéticos que analisam a estrutura, funcionalidade, patologias e questões hereditárias dos cromossomos.²⁶ Desse modo, a CC analisa o cariótipo, estudo da representação dos cromossomos presentes nas células que permite a análise quanto a presença de alterações cromossômicas, sendo as translocações e deleções os alvos de pesquisas recentes com foco no MM.²⁷

A FISH por sua vez, é um procedimento citogenético que possibilita a identificação de um trecho específico do DNA ou RNA e, dessa forma, uma sonda marcada com corante fluorescente é hibridizada com intuito de indicar a sequência complementar da sonda. Essa técnica é realizada em uma lâmina, por isso denominada *in situ*, sendo utilizado tecidos e preparações citológicas, nos quais, os cromossomos são espalhados, desnaturados e hibridizados mostrando fluorescência.²⁸

Anormalidades citogenéticas têm significado prognóstico no MM, e aproximadamente 30 a 50% dos casos demonstram cariótipos anormais, e a frequência de anormalidades também está diminuída em pacientes recém-diagnosticados. A análise citogenética pode fornecer informações prognósticas úteis, mas a atividade proliferativa espontânea particularmente baixa das células tumorais no estágio inicial da doença é considerada um importante fator limitante.²⁹

O sequenciamento de nova geração (NGS) que consiste em tecnologias recentes para sequenciamento de DNA e RNA, permitindo a detecção de variantes e mutações. Ao combinar vantagens químicas de sequenciamento exclusivas, matrizes de sequenciamento e tecnologia de bioinformática, é possível, através da NGS, o sequenciamento paralelo massivo de vários comprimentos de sequências de material genético ou mesmo o genoma inteiro dentro de um tempo relativamente curto. Com isso, a NGS permite análise de mutações relacionadas a cânceres, como o MM, em um tempo mais curto e necessitando de menor quantidade de amostra para se realizar uma análise genômica ampla.³⁰

Alti et al. comparou os três métodos em questão quanto a detecção de anormalidades relacionadas ao MM. a cariotipagem convencional no estudo 5, falhou em 10 dos 35 pacientes (28,5%) e 25 pacientes apresentaram cariótipo normal (71,4%). Já o FISH se apresentou anormal em 8 das 35 amostras (22,8%). O NGS foi aplicado a todas as amostras e encontrou-se variações patogênicas ou potencialmente patogênicas em 6 das 25 (24%) amostras com cariótipo normal e uma variante patológica foi encontrada em 5 das 8 (62,5%) amostras com FISH anormal.³¹

Fração de Cadeia Leve Livre

Fração de Cadeia Leve Livre (FLC) é um tipo de ensaio policlonal de cadeia leve livre no soro, que identificam epítomos do componente da cadeia leve Kappa (κ) ou Lambda (λ) das imunoglobulinas, que estão expostos quando não ligados ao seu par de cadeia pesada. A partir da quantificação das cadeias κ e λ , é possível realizar a razão entre as concentrações encontradas, sendo esse um indicador sólido de monoclonalidade. Quando uma das cadeias estão em maior proporção que a outra, a razão κ/λ é dita anormal e forte preditor tumoral.³² Atualmente, essa quantificação é mais comumente realizada por meio da EFS e IFS, mas cada vez mais a FLC detectada com Freelite[®] (The Binding Site Group Ltd., Birmingham, Reino Unido) vem ganhando espaço, devido a melhor precisão de medição das FLCs.³³

Gagliardi et al. avaliou a detecção de FLC em pacientes com MM, MGUS e SMM, que forneceram amostras de 3 em 3 meses para o estudo. Foram encontradas em 82% de todos os pacientes, quando comparadas com a primeira amostra recebida, que foi considerada a amostra diagnóstica. Dos outros 18% que não apresentaram anormalidades na FLC, 37% eram pacientes com Mieloma Múltiplo. Com isso, aproximadamente 70% das amostras de MM tinham FLC anormal, apoiando seu uso para diagnosticar e monitorar MM.³³

Conclusões

A partir da análise dos estudos pode-se concluir que a espectrometria de massa associada a redes neurais artificiais e a detecção de microRNAs por PCR em tempo real parecem ser os métodos mais sensíveis para o diagnóstico precoce do MM.

Apesar de apresentarem percentuais mais baixos, a cariotipagem convencional, FISH, NGS e FLC também se mostraram ser úteis para o diagnóstico e acompanhamento do curso da doença. IFS e EFS, como metodologias já amplamente utilizadas no

diagnóstico, apresentaram acuracidade para detecção do pico monoclonal, mesmo que não tenha sido apresentado dados estatísticos concisos.

Porém, ainda são necessários mais estudos que envolvam os métodos estudados para melhor verificação dos dados já existentes e possível confronto com dados futuros. A partir disso, será possível melhorar não somente a abordagem diagnóstica do MM, mas também trará impactos positivos nas condutas terapêuticas, no conhecimento médico-profissional e, principalmente, será possível ofertar melhor qualidade de vida e perspectivas futuras ao paciente e sua rede familiar.

Por fim, os resultados desse trabalho podem ser úteis para escolha de métodos diagnósticos frente a um possível quadro de Mieloma Múltiplo, além de poder ser fonte de busca e análise por pesquisas futuras relacionadas à doença em questão, ao grupo das gamopatias monoclonais, ou ainda, ao grande grupo das neoplasias hematológicas.

Conflitos de Interesse

Nenhum.

Referências

1. Gulla A, Anderson KC. Multiple myeloma: the (r)evolution of current therapy and a glance into future. *Haematologica*. 2020 Oct 1;105(10):2358-2367. doi: 10.3324/haematol.2020.247015. PMID: 33054076; PMCID: PMC7556665.
2. Fazel, F, & Bassa, F. (2019). An approach to the diagnosis and management of multiple myeloma. *SAMJ: South African Medical Journal*, 109(10), 723-727. <https://dx.doi.org/10.7196/samj.2019.v109i10.14376>.
3. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. 2022 Aug;97(8):1086-1107. doi: 10.1002/ajh.26590. Epub 2022 May 23. PMID: 35560063; PMCID: PMC9387011.
4. Seesaghur, Anouchka et al. “Clinical features and diagnosis of multiple myeloma: a population-based cohort study in primary care.” *BMJ open* vol. 11,10 e052759. 6 Oct. 2021, doi:10.1136/bmjopen-2021-052759.
5. Dias, Ana Luiza Miranda Silva et al. Multiple myeloma and central nervous system involvement: experience of a Brazilian center. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* [online]. 2018, v. 40, n. 1. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.09.004>.
6. Soliman, Amro M et al. “Role of microRNAs in Diagnosis, Prognosis and Management of Multiple Myeloma.” *International journal of molecular sciences* vol. 21,20 7539. 13 Oct. 2020, doi:10.3390/ijms21207539.
7. Bębnowska, Dominika et al. “Immunological Prognostic Factors in Multiple Myeloma.” *International journal of molecular sciences* vol. 22,7 3587. 30 Mar. 2021, doi:10.3390/ijms22073587.
8. Atkin, Catherine et al. “What is the significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance?.” *Clinical medicine (London, England)* vol. 18,5 (2018): 391-396. doi:10.7861/clinmedicine.18-5-391.

9. Kunacheewa, C., & Manasanch, E. E. (2020). High-risk smoldering myeloma versus early detection of multiple myeloma: Current models, goals of therapy, and clinical implications. *Best practice & research. Clinical haematology*, 33(1), 101152. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2020.101152>
10. Tomaz, Ana Paula O. et al. The detection of Bence Jones protein in urine by the heat test helps in diagnosis of multiple myeloma?. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [online]. 2017, v. 53, n. 1 [Accessed 22 November 2022] , pp. 20-23. Available from: <<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170006>>. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20170006>.
11. Tiselius, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans Farad Soc.* v. 33, p.524–531, 1937.
12. Oliveira, E. et. al. Eletroforese: conceitos e aplicações. *Enciclopédia biosfera. Centro Científico Conhecer – Goiânia.* v. 11 n. 22; p. 1129, 2015. doi: http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_149
13. Caers, J., Garderet, L., Kortüm, K. M., O'Dwyer, M. E., van de Donk, N. W. C. J., Binder, M., Dold, S. M., Gay, F., Corre, J., Beguin, Y., Ludwig, H., Larocca, A., Driessen, C., Dimopoulos, M. A., Boccadoro, M., Gramatzki, M., Zweegman, S., Einsele, H., Cavo, M., Goldschmidt, H., Engelhardt, M. (2018). European Myeloma Network recommendations on tools for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. *Haematologica*, 103(11), 1772–1784. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.189159>
14. Csako G. Immunofixation electrophoresis for identification of proteins and specific antibodies. *Methods Mol Biol.* 2012;869:147-71. doi: 10.1007/978-1-61779-821-4_13. PMID: 22585484.
15. Manju, Kumar V, Gupta N, Kapoor A, Kumar HS. Role of bone marrow aspiration and biopsy in diagnosis of hematological disorders: a prospective study. *J Pharm Biomed Sci* 2016; 06(03):150–154. doi: <http://dx.doi.org/10.20936/jpbms/160214>.
16. Deulofeu M, Kolářová L, Salvadó V, María Peña-Méndez E, Almáši M, Štokr M, Pour L, Boadas-Vaello P, Ševčíková S, Havel J, Vaňhara P. Rapid discrimination of multiple myeloma patients by artificial neural networks coupled with mass spectrometry of peripheral blood plasma. *Sci Rep.* 2019 May 28;9(1):7975. doi: 10.1038/s41598-019-44215-1. PMID: 31138828; PMCID: PMC6538619.
17. Durans, A F F. Aplicação de métodos quimiométricos e espectrometria de massa para detectar câncer de próstata através da urina. 73 f. Dissertação (Mestrado em História) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2022. doi: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5048>.
18. Amato F, López A, Peña-Méndez EM, Vaňhara P, Hampl A, Havel J. Artificial neural networks in medical diagnosis. *J Appl Biomed.* 2013;11(2):47-58. doi: 10.2478/v10136-012-0031-x.
19. Kong, Y. W; Mccollough, D.F; Jackson, T.J. microRNAs in cancer management. *The Lancet Oncology.* v. 13, n. 6, p. 249-258, jun 2012. doi: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70073-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70073-6)
20. Reid, G; kirschner, M.B; zandwijk, N.V. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use a biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.* doi: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.11.004>.

21. Heneghan HM, Miller N, Kelly R, Newell J, Kerin MJ. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *Oncologist*. 2010;15(7):673-82. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0103. Epub 2010 Jun 24. PMID: 20576643; PMCID: PMC3228012.
22. Jones CI, Zabolotskaya MV, King AJ, Stewart HJ, Horne GA, Chevassut TJ, Newbury SF. Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma. *Br J Cancer*. 2012 Dec 4;107(12):1987-96. doi: 10.1038/bjc.2012.525. Epub 2012 Nov 20. PMID: 23169280; PMCID: PMC3516695.
23. Li J, Zhang M, Wang C. Circulating miRNAs as diagnostic biomarkers for multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *J Clin Lab Anal*. 2020 Jun;34(6):e23233. doi: 10.1002/jcla.23233. Epub 2020 Feb 10. PMID: 32039495; PMCID: PMC7307343.
24. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2018 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2018 Aug 16;93(8):981-1114. doi: 10.1002/ajh.25117. PMID: 30400719; PMCID: PMC6223128.
25. Aita, Marta Helena C. et al. Comparison between immunofixation and electrophoresis for the early detection of relapsed multiple myeloma. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [online]. 2015, v. 51, n. 6 [Accessed 22 November 2022] , pp. 359-368. Available from: <<https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150057>>. Epub Nov-Dec 2015. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150057>.
26. Montenegro, V. S.; Santos, V. M. V. O.; Veith, M. Análise citogenética na leucemia mielóide crônica. *Rev. Fac. Ciênc. Méd.* v. 10, n. 3, p. 5-12. doi: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20150057>.
27. Yellapantula V, Hultcrantz M, Rustad EH, Wasserman E, Londono D, Cimera R, Ciardiello A, Landau H, Akhlaghi T, Mailankody S, Patel M, Medina-Martinez JS, Arango Ossa JE, Levine MF, Bolli N, Maura F, Dogan A, Papaemmanuil E, Zhang Y, Landgren O. Comprehensive detection of recurring genomic abnormalities: a targeted sequencing approach for multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2019 Dec 11;9(12):101. doi: 10.1038/s41408-019-0264-y. Erratum in: *Blood Cancer J*. 2020 Jan 30;10(1):11. PMID: 31827071; PMCID: PMC6906304.
28. Neves, S.M.N. e Guedes, R.M.C. Hibridização in situ fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2012, v. 79, n. 4, pp. 627-632. Epub 03 Jun 2013. ISSN 1808-1657.
29. Aydin C, Ulas T, Hangul C, Yucel OK, Iltar U, Salim O, Ekinci D, Berker Karauzum S. Conventional Cytogenetics and Interphase Fluorescence In Situ Hybridization Results in Multiple Myeloma: A Turkey Laboratory Analysis of 381 Cases. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2020 Apr;36(2):284-291. doi: 10.1007/s12288-019-01215-5. Epub 2019 Oct 25. PMID: 32425379; PMCID: PMC7229081.
30. Qin D. Next-generation sequencing and its clinical application. *Cancer Biol Med*. 2019 Feb;16(1):4-10. doi: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0055. PMID: 31119042; PMCID: PMC6528456.
31. Ikbali Atli E, Gurkan H, Onur Kirkizlar H, Atli E, Demir S, Yalcintepe S, Kalkan R, Demir AM. Pros and Cons for Fluorescent in Situ Hybridization, Karyotyping and Next

Generation Sequencing for Diagnosis and Follow-up of Multiple Myeloma. *Balkan J Med Genet.* 2021 Mar 23;23(2):59-64. doi: 10.2478/bjmg-2020-0020. PMID: 33816073; PMCID: PMC8009570.

32. Crusoe E, Peres A, Higashi F, Cury P, Dias A, Rossato M, Hungria C, Desiato M, Soares E, Hungria V. Desempenho diagnóstico do Freelite® para detecção de Mieloma Múltiplo em uma população brasileira. *Disciplina de Hematologia e Oncologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.*

33. Gagliardi A, Carbone C, Russo A, Cuccurullo R, Lucania A, Cioppa PD, Misso G, Caraglia M, Tommasino C, Mastrullo L. Combined use of free light chain and heavy/light chain ratios allow diagnosis and monitoring of patients with monoclonal gammopathies: Experience of a single institute, with three exemplar case reports. *Oncol Lett.* 2016 Oct;12(4):2363-2370. doi: 10.3892/ol.2016.4965. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27698801; PMCID: PMC5038391

ANEXO A – FORMULÁRIO STROBE

Tabela. Itens essenciais que devem ser descritos em estudos observacionais, segundo a declaração Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE). 2007.

Item	Nº	Recomendação
Título e Resumo	1	Indique o desenho do estudo no título ou no resumo, com termo comumente utilizado Disponibilize no resumo um sumário informativo e equilibrado do que foi feito e do que foi encontrado
Introdução		
Contexto/Justificativa	2	Detalhe o referencial teórico e as razões para executar a pesquisa.
Objetivos	3	Descreva os objetivos específicos, incluindo quaisquer hipóteses pré-existentes.
Métodos		
Desenho do estudo	4	Apresente, no início do artigo, os elementos-chave relativos ao desenho do estudo.
Contexto (<i>setting</i>)	5	Descreva o contexto, locais e datas relevantes, incluindo os períodos de recrutamento, exposição, acompanhamento (follow-up) e coleta de dados.
Participantes	6	Estudos de Coorte: Apresente os critérios de elegibilidade, fontes e métodos de seleção dos participantes. Descreva os métodos de acompanhamento. Estudos de Caso-Control: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e o critério-diagnóstico para identificação dos casos e os métodos de seleção dos controles. Descreva a justificativa para a eleição dos casos e controles Estudo Seccional: Apresente os critérios de elegibilidade, as fontes e os métodos de seleção dos participantes. Estudos de Coorte: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de expostos e não expostos. Estudos de Caso-Control: Para os estudos pareados, apresente os critérios de pareamento e o número de controles para cada caso.
Variáveis	7	Defina claramente todos os desfechos, exposições, preditores, confundidores em potencial e modificadores de efeito. Quando necessário, apresente os critérios diagnósticos.
Fontes de dados/ Mensuração	8 ^a	Para cada variável de interesse, forneça a fonte dos dados e os detalhes dos métodos utilizados na avaliação (mensuração). Quando existir mais de um grupo, descreva a comparabilidade dos métodos de avaliação.
Viés	9	Especifique todas as medidas adotadas para evitar potenciais fontes de vies.
Tamanho do estudo	10	Explique como se determinou o tamanho amostral.
Variáveis quantitativas	11	Explique como foram tratadas as variáveis quantitativas na análise. Se aplicável, descreva as categorizações que foram adotadas e porque.
Métodos estatísticos	12	Descreva todos os métodos estatísticos, incluindo aqueles usados para controle de confundimento. Descreva todos os métodos utilizados para examinar subgrupos e interações. Explique como foram tratados os dados faltantes ("missing data") Estudos de Coorte: Se aplicável, explique como as perdas de acompanhamento foram tratadas. Estudos de Caso-Control: Se aplicável, explique como o pareamento dos casos e controles foi tratado. Estudos Seccionais: Se aplicável, descreva os métodos utilizados para considerar a estratégia de amostragem. Descreva qualquer análise de sensibilidade.
Resultados		
Participantes	13 ^a	Descreva o número de participantes em cada etapa do estudo (ex: número de participantes potencialmente elegíveis, examinados de acordo com critérios de elegibilidade, elegíveis de fato, incluídos no estudo, que terminaram o acompanhamento e efetivamente analisados) Descreva as razões para as perdas em cada etapa. Avalie a pertinência de apresentar um diagrama de fluxo
Dados descritivos	14 ^a	Descreva as características dos participantes (ex: demográficas, clínicas e sociais) e as informações sobre exposições e confundidores em potencial. Indique o número de participantes com dados faltantes para cada variável de interesse. Estudos de Coorte: Apresente o período de acompanhamento (ex: média e tempo total)

Continua

Tabela continuação

Item	Nº	Recomendação
Desfecho	15 ^a	Estudos de Coorte: Descreva o número de eventos-desfecho ou as medidas-resumo ao longo do tempo Estudos de Caso-Control: Descreva o número de indivíduos em cada categoria de exposição ou apresente medidas-resumo de exposição. Estudos Seccionais: Descreva o número de eventos-desfecho ou apresente as medidas-resumo.
Resultados principais	16	Descreva as estimativas não ajustadas e, se aplicável, as estimativas ajustadas por variáveis confundidoras, assim como sua precisão (ex: intervalos de confiança). Deixe claro quais foram os confundidores utilizados no ajuste e porque foram incluídos. Quando variáveis contínuas forem categorizadas, informe os pontos de corte utilizados. Se pertinente, considere transformar as estimativas de risco relativo em termos de risco absoluto, para um período de tempo relevante.
Outras análises	17	Descreva outras análises que tenham sido realizadas. Ex: análises de subgrupos, interação, sensibilidade.
Discussão		
Resultados principais	18	Resuma os principais achados relacionando-os aos objetivos do estudo.
Limitações	19	Apresente as limitações do estudo, levando em consideração fontes potenciais de viés ou imprecisão. Discuta a magnitude e direção de vieses em potencial.
Interpretação	20	Apresente uma interpretação cautelosa dos resultados, considerando os objetivos, as limitações, a multiplicidade das análises, os resultados de estudos semelhantes e outras evidências relevantes.
Generalização	21	Discuta a generalização (validade externa) dos resultados.
Outras Informações		
Financiamento	22	Especifique a fonte de financiamento do estudo e o papel dos financiadores. Se aplicável, apresente tais informações para o estudo original no qual o artigo é baseado.