



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

ALLAN SOUZA DOS SANTOS

Caracterização de subpopulações linfocitárias e marcadores prognósticos em pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo submetidos à terapia de primeira linha com ciclofosfamida, talidomida, dexametasona e daratumumabe.

SALVADOR – BA
2023

2023

Caracterização de subpopulações linfocitárias e marcadores prognósticos em pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo submetidos à terapia de primeira linha com ciclofosfamida, talidomida, dexametasona e daratumumabe.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ALLAN SOUZA DOS SANTOS



UFBA

ALLAN SOUZA DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DE SUBPOPULAÇÕES
LINFOCITÁRIAS E MARCADORES PROGNÓSTICOS EM
PACIENTES RECÉM DIAGNOSTICADOS COM MIELOMA
MÚLTIPLO SUBMETIDOS À TERAPIA DE PRIMEIRA
LINHA COM CICLOFOSFAMIDA, TALIDOMIDA,
DEXAMETASONA E DARATUMUMABE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex José Leite Torres
Coorientador: Prof. Dr. Edvan de Queiroz Crusóe

Salvador – BA
2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237 Santos, Allan Souza dos
Caracterização de subpopulações linfocitárias e marcadores prognósticos em pacientes recém diagnosticados com mieloma múltiplo submetidos à terapia de primeira linha com Ciclofosfamida, Talidomida, Dexametasona e Daratumumabe/Allan Souza dos Santos. – Salvador, 2023.
49 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Alex José Leite Torres; Coorientador: Prof. Dr. Edvan de Queiroz Crusoé.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.
Inclui referências e apêndice.

1. Mieloma múltiplo. 2. CTd. 3. Daratumumabe. 4. Plasmócitos. 5. Imunomoduladores. I. Torres, Alex José Leite. II. Crusoé, Edvan de Queiroz. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.155.392

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças e direcionamento na minha vida.

À toda a minha família, em especial meus pais, minha filha e esposa, por terem me proporcionado suporte emocional nessa jornada.

Ao Professor Dr. Roberto Meyer pelo excelente trabalho na condução do Laboratório de Imunologia, sempre valorizando o potencial de cada colaborador, acreditando e incentivando a pesquisa científica.

Ao Professor Dr. Alex Torres por ter se comprometido a me orientar sobre este tema, mesmo não sendo a linha de pesquisa de dedicação. Ao Dr. Edvan Crusoé por ter idealizado o projeto e ter viabilizado toda a execução da pesquisa.

À equipe de citometria do LABIMUNO: Herbert Henrique, Mariane Melo, Lorene Santos, Gessiana Andrade, no convívio diário e na execução da pesquisa. A todos os meus amigos e colegas de trabalho.

À minha esposa, Mariane Melo, que contribuiu ativamente na produção desse trabalho e me deu apoio e força nessa caminhada.

RESUMO

O mieloma múltiplo (MM) é a segunda neoplasia hematológica mais frequente, decorrente da proliferação de plasmócitos produtores de proteína monoclonal, afetando majoritariamente a população idosa. Na última década, os avanços terapêuticos têm possibilitado aumento da sobrevida global dos pacientes, contudo a doença permanece incurável. Protocolos terapêuticos combinando agentes alquilantes, imunomoduladores, imunossupressores e imunoterapia induzem a uma alteração imunológica ainda pouco compreendida. O objetivo deste estudo foi caracterizar subpopulações linfocitárias em pacientes com Mieloma Múltiplo elegíveis ao Transplante Autólogo de Células-Tronco Hematopoiéticas (TACTH), utilizando a terapia de primeira linha com ciclofosfamida, talidomida, dexametasona associado ao daratumumabe (CTd-Dara), anticorpo monoclonal anti-CD38. Entre 2018 e 2022, 23 pacientes com MM recém-diagnosticados tiveram seus perfis linfocitários analisados em cinco momentos distintos e a resposta terapêutica monitorada por Next-Generation Flow (NGF), através da pesquisa de doença residual mensurável (DRM). Observou-se que o tratamento induziu mudanças significativas no perfil linfocitário, com destaque para a diminuição de linfócitos B e células NK. A composição das subpopulações de linfócitos B alterou significativamente ao longo do tratamento. Na avaliação de variáveis prognósticas, a expressão da molécula CD38 na superfície dos plasmócitos, revelou-se um marcador promissor, correlacionando-se a menores níveis de DRM para esta terapia e ao sistema R-ISS. Embora as subpopulações linfocitárias e as Células Tumorais Circulantes (CTCs) não tenham alcançado significância estatística em termos prognósticos, elas indicam um padrão que merece uma investigação mais aprofundada. Estes resultados enriquecem nossa compreensão sobre os efeitos imunomoduladores de terapias no MM e sinalizam caminhos para otimizar tratamentos e monitoramento de pacientes.

Palavras-Chave: Mieloma Múltiplo. CTd. Daratumumabe. CD38. Plasmócitos. Imunomoduladores.

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is the second most common hematological malignancy, resulting from the proliferation of monoclonal protein-producing plasma cells, predominantly affecting the elderly population. In the last decade, therapeutic advances have led to an increase in the overall survival of patients, however the disease remains incurable. Therapeutic protocols combining alkylating agents, immunomodulators, immunosuppressants, and immunotherapy induce an immunological shift that is still not fully understood. The aim of this study was to characterize lymphocyte subsets in patients with Multiple Myeloma eligible for Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) using first-line therapy with cyclophosphamide, thalidomide, dexamethasone combined with daratumumab (CTd-Dara), an anti-CD38 monoclonal antibody. Between 2018 and 2022, 23 newly-diagnosed MM patients had their lymphocyte profiles analyzed at five distinct time points, and the therapeutic response was monitored by Next-Generation Flow (NGF), through the detection of measurable residual disease (MRD). It was observed that the treatment induced significant changes in the lymphocyte profile, with emphasis on the decrease in B cells and NK cells. The composition of the B cell subsets changed significantly throughout the treatment. When evaluating prognostic variables, the expression of the CD38 molecule on the surface of plasma cells emerged as a promising marker, correlating with lower MRD levels for this therapy and the R-ISS system. Although the lymphocyte subpopulations and Circulating Tumor Cells (CTCs) did not achieve statistical significance in prognostic terms, they indicate a pattern warranting further investigation. These findings enhance our understanding of the immunomodulatory effects of therapies in MM and signal ways to optimize treatments and patient monitoring.

Keywords: Multiple Myeloma. CTd. Daratumumab. CD38. Plasma Cell. Immunomodulators.

LISTA DE ABREVIATURAS

- CAR-T – Receptor Antigênico Quimérico de Células T
- CCDA – Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos
- CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
- CTC – Células Tumorais Circulantes
- CTd- Ciclofosfamida, Talidomida e dexametasona
- CTH – Células Tronco Hematopoiéticas
- Dara – Daratumumabe
- DRM – Doença Residual Mensurável
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- FCDA – Fagocitose Celular Dependente de Anticorpos
- GMSI – Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado
- IMiD – Imunomodulador
- MIF – Média de Intensidade de Fluorescência
- MM – Mieloma Múltiplo
- MMS – Mieloma Múltiplo *Smoldering*
- MO – Medula óssea
- NGF – *Next-Generation Flow*
- NGS – *Next-Generation Sequencing*
- PET/CT – Tomografia Computadorizada – Tomografia por Emissão de Pósitrons
- R-ISS – Sistema de Estadiamento Internacional Revisado
- RMN – Ressonância Magnética Nuclear
- SG – Sobrevida Global
- SLP – Sobrevida Livre de Progressão
- TACTH – Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas modalidade Autólogo
- TC - Tomografia Computadorizada
- TCTH – Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 EPIDEMIOLOGIA	8
2.2 PATOGÊNESE E DESFECHO CLÍNICO	9
2.3 DIAGNÓSTICO.....	10
2.4 PROGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO.....	11
2.5 TRATAMENTO.....	12
2.5.1 Protocolo Ciclofosfamida-Talidomida-Dexametasona.....	15
2.5.2 Imunoterapia com anticorpo monoclonal Daratumumabe	16
2.5.3 Células CAR-T.....	16
2.5.4 Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.....	17
2.6 DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL	17
2.7 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4 CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO	21
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO	22
METODOLOGIA.....	23
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	35
CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo, também conhecido como doença de Kahler ou mielomatose, é uma neoplasia hematológica caracterizada pela proliferação de células plasmocitárias produtoras de uma proteína monoclonal. Esta proliferação afeta a medula óssea e frequentemente invade o tecido ósseo adjacente, resultando em dor e fraturas ósseas, além de causar hipercalcemia, anemia, disfunção renal e lesões ósseas (1). Embora seja uma doença rara, o MM é a segunda neoplasia hematológica mais comum, com altas taxas de morbidade e mortalidade, sendo, até o momento, considerado incurável (2). A taxa de mortalidade é especialmente elevada em países latino-americanos devido às dificuldades de acesso ao diagnóstico e às terapias disponíveis (3).

O tratamento do MM tem evoluído ao longo das últimas décadas, saindo de abordagens exclusivamente quimioterápicas para protocolos que combinam diferentes drogas com mecanismos de ação específicos nas células tumorais. Nesse contexto, o marcador CD38 tem emergido como um alvo terapêutico promissor para o tratamento do MM. O CD38 é um marcador confiável para a identificação de plasmócitos, sejam eles normais ou neoplásicos, e seu alto nível de expressão e função como receptor e ectoenzima o tornam uma opção potencial para terapias direcionadas ao MM (4).

Dada a gravidade da doença e a falta de cura até o momento, com baixas taxas de sobrevida global, torna-se essencial a realização de novos estudos de protocolos terapêuticos. O tratamento do MM envolve a combinação de drogas como quimioterapia, imunomoduladores, inibidores de proteassoma e imunoterapias. No entanto, apesar dos avanços terapêuticos, a heterogeneidade do MM, continua a apresentar desafios, levando a falhas terapêuticas e à busca constante por novas opções de tratamento (5,6).

O objetivo principal é contribuir para um maior entendimento das bases imunológicas do MM, visando potencialmente auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e personalizados para os pacientes afetados por essa neoplasia. Portanto, torna-se essencial a avaliação inédita da combinação das drogas Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona, TACTH associados ao anticorpo monoclonal anti-CD38 (Daratumumab) em primeira linha. A adição da imunoterapia específica, em conjunto com essas drogas imunomodulatórias e o

transplante, pode induzir respostas imunológicas ainda desconhecidas, tornando imprescindível o conhecimento do comportamento linfocitário diante dessas combinações terapêuticas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os distúrbios de células plasmocitárias são neoplasias monoclonais que se desenvolvem a partir de progenitores comuns na linhagem linfóide B. Mieloma Múltiplo, Macroglobulinemia de Waldenström, amiloidose primária e doenças de cadeia pesada são exemplos desse grupo que podem ser denominados como gamopatias monoclonais, paraproteinemias, discrasias plasmocitárias e disproteinemias (7,8).

Embora já existissem outros casos anteriores, o primeiro relato de caso envolvendo o MM foi descrito por Samuel Solly, em 1844, quando foi caracterizado dois pacientes que apresentaram sintomas como fadiga, dores ósseas e fraturas múltiplas. Entretanto, o caso que levou melhor conhecimento sobre a doença, neste mesmo ano, foi de Thomas Alexander McBean, “um comerciante respeitável”, no qual foi possível realizar o estudo não apenas da autópsia, como também da urina (9).

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O Mieloma Múltiplo é uma doença que está mais relacionada com a população idosa, e com aumento da longevidade da população mundial, teve como consequência a maior incidência de casos. De 1990 a 2016, os casos incidentes aumentaram 126% no mundo e 40% nos EUA (10). O Brasil, em 2020, apresentou 2,0 casos novos por 100.000 habitantes, prevalência de 6,4 casos por 100.000 habitantes e mortalidade de 4.293 indivíduos diagnosticados com MM (11).

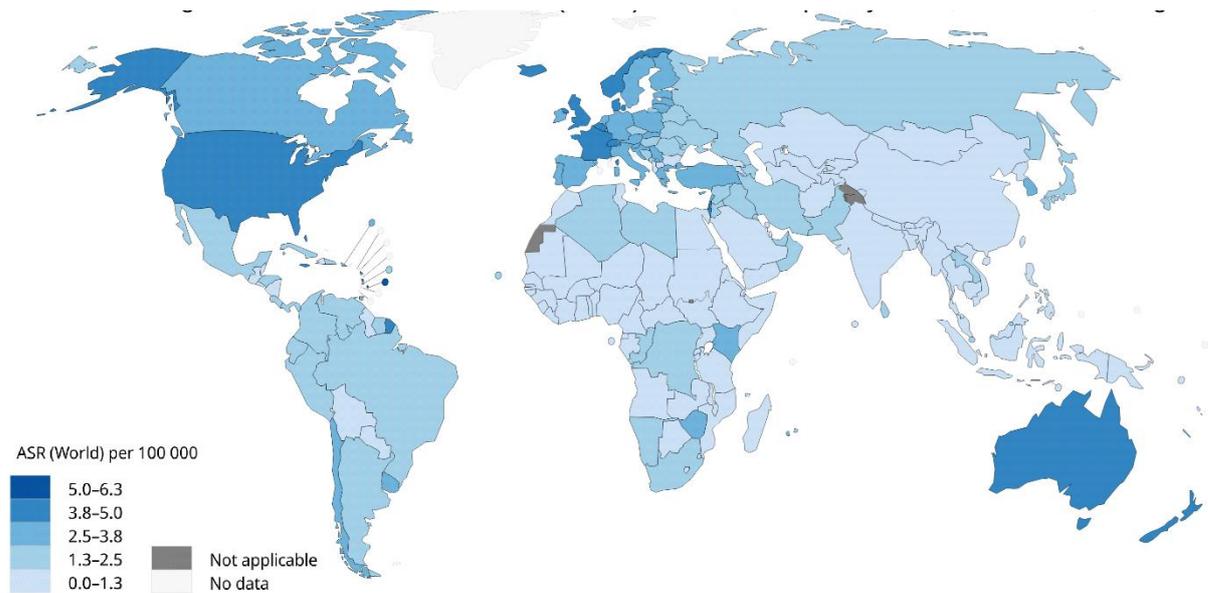


Figura 1: Mapa exibindo a taxa de incidência estimada por 100.000 habitantes no mundo, em 2020.

Fonte: Dados obtidos de GLOBOCAN 2020. (11)

2.2 PATOGÊNESE E DESFECHO CLÍNICO

A patogênese do mieloma múltiplo tem sua origem na translocação que ocorre no locus de uma das cadeias de imunoglobulina (Ig), levando a instabilidade genética e desenvolvimento da gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI). Inicialmente, a GMSI é uma condição assintomática que pode progredir para um estágio intermediário conhecido como MM assintomático, também denominado de MM *smoldering*. Com sucessivas mutações nos precursores das células linfoides B, os plasmócitos tumorais maduros são formados, caracterizados por sua capacidade de proliferar independentemente de estímulos estromais e apresentando resistência à apoptose. Esses eventos levam à infiltração da medula óssea e ao desenvolvimento de lesões líticas. A progressão da doença também pode permitir a infiltração da doença em sítio extramedular, como no sangue periférico levando a uma leucemia de células plasmocitárias ou em ossos, tecidos moles e órgãos levando ao plasmocitoma (12,13).

O Mieloma Múltiplo é um distúrbio neoplásico de células plasmocitárias que se caracteriza pela proliferação clonal de plasmócitos malignos na medula óssea, associada à presença de proteína monoclonal em sangue periférico ou na urina e, no mínimo, uma disfunção orgânica associada, como dores ou fraturas ósseas, insuficiência renal, susceptibilidade a

infecções, anemia e hipercalemia. Outras anormalidades com menores frequências incluem distúrbios de coagulação, sintomas neurológicos e hiperviscosidade sanguínea (14).

Estudos crescentes sobre MM têm mostrado que o sistema imunológico é disfuncional ou prejudicado na doença de fase ativa, com diminuição dos níveis de imunoglobulina normais (15). Pacientes com MM apresentam uma redução de linfócitos B tanto em sangue periférico quanto na medula óssea. Isso pode estar relacionado a pacientes com MM apresentarem menores percentuais de linfócitos B naive, em comparação com indivíduos saudáveis e portadores de GMSI (16) e menores níveis de IL-4, citocina importante na indução de respostas imunes e proliferação das células B. A supressão das células B sanguíneas também pode ser maior em pacientes com células plasmocitárias circulantes, pois esses pacientes têm níveis mais altos de tumor medular e, portanto, provavelmente terão maior supressão da produção de células B (17).

Uma variedade de fatores possibilita um aumento na susceptibilidade para doenças infecciosas em pacientes com MM. Dentre esses fatores pode-se destacar hipogamaglobulinemia, funcionalidade prejudicada dos linfócitos, imunossupressão por agentes esteroides, neutropenia secundária à quimioterapia ou infiltração da medula óssea por células neoplásicas. A relação entre as células plasmáticas do mieloma e o microambiente da medula óssea é fundamental para a manutenção da doença. As células tumorais e células estromais interagem através de moléculas de adesão e redes de citocinas para promover simultaneamente a sobrevivência de células tumorais, resistência a drogas, angiogênese e metabolismo ósseo desordenado (18).

2.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do MM é composto de um conjunto de exames para definição e avaliação prognóstica da doença, como avaliação clínica, exames laboratoriais, mielograma e exames de imagem. O diagnóstico é baseado na infiltração de plasmócitos clonais na medula óssea, associados a outros eventos de outros eventos que são definidores do MM, como detecção e quantificação de proteína monoclonal (proteína M) no soro ou na urina e na evidência de lesões em órgãos-alvo, particularmente hipercalemia, insuficiência renal, anemia e lesões ósseas, conhecidos pela sigla CRAB (hypercalcaemia, renal failure, anaemia, and bone lesions) (19).

Segundo os critérios da revisão do International Myeloma Working Group, o diagnóstico do MM deve demonstrar a presença de no mínimo 10% de plasmócitos na medula óssea ou plasmocitoma extramedular, acompanhado de alteração orgânica, sendo a anemia (ocorrendo em 75% dos pacientes) e as lesões osteolíticas (ocorrendo em 75% dos pacientes) as mais sintomáticas, pois contribuem para uma fadiga e dores ósseas, respectivamente. Uma vez suspeitado da presença do MM, o paciente deverá identificar a proteína monoclonal através da combinação dos testes de eletroforese de proteínas séricas, imunofixação sérica e cadeia leve livre. Os exames de imagem vão possibilitar avaliar lesões ósseas e a punção da medula óssea permitirá realizar os testes de imunofenotipagem, mielograma, citogenética clássica e FISH. Os critérios atualizados representam uma mudança de paradigma, uma vez que permitem o diagnóstico precoce e o início da terapia antes da lesão de órgãos terminais (20,21).

2.4 PROGNÓSTICO E CLASSIFICAÇÃO DE RISCO

Mieloma Múltiplo é uma neoplasia hematológica heterogênea envolvendo a proliferação de células plasmáticas derivadas de diferentes alterações genéticas, apresentando características distintas com relação à patogênese, prognóstico e progressão da doença. Estas características permitem a estratificação de risco do MM e a conduta terapêutica mais adaptada para o subtipo neoplásico (22).

O conhecimento dos fatores prognósticos no MM tem grande importância para a identificação da taxa de sobrevida dos pacientes e o aconselhamento de estratégias terapêuticas com a finalidade de aumentar a sobrevida global e a sobrevida livre de progressão dos pacientes (23). Os fatores prognósticos mais utilizados se baseiam em parâmetros de dosagens laboratoriais, características genéticas da doença, o monitoramento da resposta terapêutica e o perfil imunofenotípico dos plasmócitos neoplásicos (24).

Existem diversos sistemas de estadiamento para avaliar o prognóstico do MM, sendo os mais utilizados o Sistema de Estadiamento Internacional Revisado (Quadro 01) e a Estratificação Clínica da Clínica Mayo (Quadro 02).

Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3
Albumina sérica $\geq 3,5$ g/dL e β -2- microglobulina sérica $< 3,5$ mg/L e Ausência de alterações citogenéticas de alto risco e Níveis séricos de LDH normais	Os critérios que não se encaixam no estágio 1 e estágio 3	β -2- microglobulina sérica $\geq 5,5$ mg/L e Alto risco citogenético – t(4;14). T(14;16) ou del(17p) e/ou Níveis séricos de LDH elevados

Quadro 1: Sistema de estadiamento internacional revisado (R-ISS).

Fonte: Adaptado de Palumbo *et al.* (25)

	Alterações citogenéticas	Porcentagem de pacientes recém diagnosticados com estas anormalidades
Risco padrão	Trissomias, t(11;14) e t(6;14)	75%
Alto risco	t(4;14), t(14;16), t(14;20), del(17p), gain(1q), Double-hit (2 alterações de alto risco) e Triple-hit (3 ou mais alterações de alto risco)	25%

Quadro 2: Estratificação de risco da clínica Mayo para MM (mSMART) baseada nas alterações citogenéticas.

Fonte: Adaptada de Rajkumar *et al.* (21).

2.5 TRATAMENTO

Apesar de o mieloma múltiplo ser considerado uma doença incurável até o presente momento, esta doença oncohematológica foi uma das que mais obteve evolução terapêutica nos últimos anos (Quadro 03). Com a introdução de novas drogas de maior efetividade e menor toxicidade, permitiu que alguns pacientes conseguissem o aumento de sobrevida global e sobrevida livre de progressão, atingindo uma "cura operacional", termo designado ao paciente que apresenta resposta terapêutica estável e baixos níveis de doença detectáveis (21,26).

Os pacientes com MM podem ser divididos, em relação à conduta terapêutica, em elegíveis ou não elegíveis ao TACTH. Os pacientes elegíveis são tratados, em geral, com 3 a 4 ciclos de terapia de indução para coleta das células-tronco hematopoiética (CTH). Após a coleta das CTHs, poderá iniciar o TACTH em primeira linha ou retomar a terapia de indução e aguardar uma primeira recidiva para realizar o TACTH. Mesmo com diversos protocolos terapêuticos disponíveis para o esquema de indução, ainda permanece limitada a combinação de drogas utilizadas no sistema público de saúde (27).

Existem diversos protocolos de tratamento para o MM, combinando drogas imunomoduladoras e potencializando a resposta através imunoterapia com anticorpo monoclonal humanizado para pacientes refratários ou recidivados (14,28). No Brasil, o tratamento de primeira linha mais elegível pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o MM era a combinação das drogas Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona (CTd), seguido de TACTH para os pacientes elegíveis. A imunoterapia com anticorpo monoclonal humanizado não é acessível para os usuários do sistema público de saúde (29).

Tipos de drogas	Mecanismo de ação
Drogas alquilantes	
Melfalan	Induz a ligação cruzada do DNA e quebras de dupla fita de DNA
Ciclofosfamida	Formação de ligação cruzada do DNA que levam à apoptose. Em doses baixas, também possui atividade imunoestimuladora e efeitos antiangiogênicos
Esteroides	
Dexametasona	Antagonista do receptor de glicocorticoide
Prednisolona	Antagonista do receptor de glicocorticoide
Antraciclinas	
Doxorrubicina	Inibidor da Topoisomerase II
Inibidores de proteassoma	

Bortezomib	Primeira geração de ácido borônico reversível, inibidor de proteassoma
Carfilzomib	Segunda geração de epoxicetona, inibidor do proteasoma que se liga seletivamente e irreversivelmente ao proteassoma constitutivo e ao imunoproteassoma
Ixazomib	Ácido borônico reversível, inibidor de proteassoma
Drogas imunomodulatórias	
Talidomida	Liga-se ao gene <i>CRBN</i> e desencadeia assim a degradação proteasomal dos genes <i>IKZF1</i> e <i>IKZF3</i> , conduzindo a uma ação direta contra a atividade do mieloma múltiplo, efeitos imunomoduladores e efeitos sobre as células estromais
Lenalidomida	Modo de ação semelhante à talidomida, mas com diferente afinidade e propriedades de ligação ao gene <i>CRBN</i>
Pomalidomida	Semelhante à lenalidomida, mas degrada as proteínas alvo proteínas alvo <i>IKZF1</i> e <i>IKZF3</i> de forma mais potente.
Inibidor das histonas deacetilase	
Panobinostat	Inibidor pan-deacetilase
Anticorpos monoclonais	
Elotuzumabe	Anticorpo monoclonal humanizado contra <i>SLAMF7</i> , com ação anti-mieloma múltiplo através de CCDA e FCDA; também ativa diretamente as células matadoras naturais (células NK)
Daratumumabe	Anticorpo totalmente humano anti-CD38, que tem mecanismos imunoefetores dependentes de Fc, tais como CDC, CCDA, e FCDA, mas também efeitos imunomoduladores através da eliminação de Tregs CD38-positivas, Bregs, e MDSCs
Isatuximabe	Anticorpo quimérico anti-CD38 que pode induzir diretamente a apoptose e também possui mecanismos imunoefetores dependentes de Fc, como o CCDA e o FCDA e efeitos imunomoduladores e imunomoduladores
Anticorpo monoclonal conjugado com fármaco	

Belantamab mafodotin	Anticorpo monoclonal humanizado anti-BCMA afucosilado conjugado com um agente citotóxico, maleimidocaproil monometilauristatina F, por um ligante resistente às proteases para interromper as redes de microtúbulos
Inibidor seletivo da exportação nuclear	
Selinexor	Inibidor seletivo de XPO1, biodisponível para uso via oral

Quadro 3: Classes de medicamentos licenciados para uso no tratamento do mieloma múltiplo

Fonte: adaptado de Niels *et al.* (6)

2.5.1 Protocolo Ciclofosfamida-Talidomida-Dexametasona

A talidomida é um derivado do ácido glutâmico e tem sido amplamente utilizada na terapia do mieloma em combinação com diversas drogas. Possui entre os seus mecanismos de ação, atividade imunomodulatória tanto na produção de citocinas quanto em ativação dos linfócitos T. Outros efeitos da Talidomida incluem a inibição da adesão celular, propriedades antiangiogênicas e inibição direta do crescimento tumoral (30).

A ciclofosfamida é uma das drogas mais antigas para o tratamento de câncer, sendo introduzida em 1959 e permanecendo até hoje nos protocolos terapêuticos das doenças oncohematológicas, como exemplo dos linfomas e mieloma múltiplo. Esta droga é um agente alquilante e atua no sistema imune promovendo imunossupressão, através da diminuição das células linfóides (31).

A Dexametasona (d) é um glicocorticoide sintético amplamente utilizado no tratamento de condições inflamatórias graves e doenças autoimunes. Seu mecanismo de ação está relacionado à sua capacidade de se ligar ao receptor intracelular de glicocorticoides, presente no citoplasma da maioria das células, e modular a resposta inflamatória. Este fármaco também tem sido utilizado nos tratamentos oncológicos, devido ao fato de interferir na produção de IL-1 e TNF- α diminuindo a resposta inflamatória secundária e reduzindo os efeitos colaterais de quimioterapias, radioterapias e imunoterapias (32).

2.5.2 Imunoterapia com anticorpo monoclonal Daratumumabe

Daratumumabe é um anticorpo monoclonal humano da classe IgG1, com especificidade para a molécula CD38, que tem sido amplamente utilizado no tratamento do MM, tanto como monoterapia quanto em combinação com diversos protocolos de tratamento. A terapia anti-CD38 elimina as células neoplásicas através de ação direta, influenciada pela sinalização celular, conduzindo à morte devido à apoptose por ligação cruzada ou por mecanismos efetores imunodependentes da porção Fc, como exemplo de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpos (CCDA) e fagocitose celular dependente de anticorpos (FCDA). A adição do Daratumumab nos protocolos de tratamento tem se demonstrado muito efetiva, com aumento da sobrevida global e a livre de eventos dos pacientes refratários e recidivados (33,34).

O marcador CD38 está presente na diferenciação da célula B na medula óssea normal, apresentando alta expressão nos precursores iniciais e diminuição da expressão em células B maduras (35).

2.5.3 Células CAR-T

As células CAR-T (*Chimeric antigen receptor*) constituem uma nova e promissora terapia contra linfomas e leucemias de células B e MM, envolvendo a alteração genética das células T autólogas para que elas exibam na superfície um receptor quimérico específico. Esse receptor é programado para reconhecer e atacar um antígeno-alvo, levando assim à destruição do tumor graças à ação citotóxica das células T (36,37).

Atualmente, o antígeno de maturação de células B (BCMA) é o alvo mais utilizado para terapia com células CAR-T em MM, alcançando respostas excelentes em pacientes com MM recidivado e refratário a várias linhas de tratamento (37,38). Entretanto, o alto custo da produção desta terapia ainda é um limitante para ampla utilização nos pacientes com MM. Outro ponto que tem sido destacado é que novos estudos têm demonstrado recidiva em parte dos pacientes com MM em terapia com as células CAR-T, devido ao escape de antígenos, à baixa persistência das células CAR-T no paciente e ao microambiente tumoral complexo (39,40).

2.5.4 Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) modalidade autólogo, em que o paciente assume papel de doador e receptor das CTH, é uma importante ferramenta terapêutica para o tratamento do mieloma múltiplo recém diagnosticado, sendo associado ao aumento da taxa de resposta ao tratamento, melhor sobrevida global e livre de progressão. Contudo, a elegibilidade do transplante depende de algumas condições, como ausência de comorbidades, performance clínica e idade do paciente não tão avançada. Tipicamente, nos EUA, a idade adotada é abaixo de 75 anos, enquanto na Europa é adotada idade inferior a 65 anos (41).

2.6 DOENÇA RESIDUAL MENSURÁVEL

A doença residual mensurável (DRM) ou doença residual mínima se refere à pequena quantidade de células neoplásicas residuais que não foram erradicadas durante ou após o tratamento adotado. Desta forma, é possível avaliar o prognóstico e a eficácia terapêutica da doença. No MM, essa resposta é determinada pela dosagem da proteína monoclonal no soro e na urina, combinada com avaliação de plasmócitos monoclonais na medula óssea (6).

Pelas definições do International Myeloma Working Group (IMWG) em 2016, a DRM de MM é definida como a persistência ou ressurgimento de níveis muito baixos de células mielomatosas, em pacientes com remissão completa, com sensibilidade de detecção de 1 célula em pelo menos 100.000 células normais da medula óssea por citometria de fluxo de nova geração (NGF) ou sequenciamento de nova geração (NGS) para avaliação de remissão completa (42). A avaliação extramedular da DRM de MM é realizada por exames de imagem, dentre eles a tomografia computadorizada com tomografia de emissão de pósitrons (PET/CT) e ressonância magnética nuclear (43).

2.7 CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

Os linfócitos são células singulares da imunidade adaptativa, expressando receptores antigênicos clonalmente distribuídos, cada um dos quais específicos para um determinante antigênico diferente (44).

Os linfócitos T são células integrantes da imunidade adaptativa e têm importante papel na formação e manutenção da resposta imunológica e controle da homeostase. Este tipo celular possui receptores que são capazes de não apenas reconhecer antígenos patogênicos e de células tumorais, como também controlar a tolerância imunológica por antígenos próprios e não próprios. Os linfócitos T são produzidos inicialmente na medula óssea, onde iniciam o processo maturativo e, posteriormente, migram para o timo com a finalidade de complementar a sua maturação e seleção para serem exportados para o sangue periférico como células virgens (45).

Os linfócitos B e seus anticorpos produzidos são elementos centrais da imunidade humoral. Em adultos, os linfócitos B são produzidos a partir de uma célula precursora hematopoiética na medula óssea, onde ocorre a diferenciação das células B em vários estágios de desenvolvimento, por ação de rearranjos funcionais em segmentos gênicos da imunoglobulina (46).

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de respostas por anticorpos de curto e longo prazo, na proteção contra patógenos e, também, na função de alvos terapêuticos. Além disso, participa de outras funções que não dependem diretamente de anticorpos, como apresentação de antígenos, modulação da diferenciação de linfócitos T e produção de citocinas regulatórias e proinflamatórias. (47,48).

De acordo com o fenótipo e suas funções específicas, os linfócitos B maduros podem ser classificados como linfócitos B transicionais, naive, de memória com mudança e sem mudança de isotipo e os linfócitos B que não expressam os marcadores IgD e CD27, sendo também denominados de linfócitos B duplo negativos(48).

Os linfócitos B naives expressam altos níveis de marcação para a IgD e IgM e ausência de expressão de CD27. Eles podem ser diferenciados das células transicionais pela baixa ou ausência de expressão dos marcadores CD24 e CD38. Os LB naives são células virgens, que não identificaram nenhum antígeno estranho, permanecendo em repouso, sem estarem ativamente em divisões celulares ou exercendo funções efetoras (44).

As células B de memória diferem das células B *naive* por diversas características, como a mudança de classe de isotipo, mutações no gene IgV, afinidade ao antígeno aumentada dos receptores de células B, maior longevidade e alta capacidade de proliferação (49). Os linfócitos B de memória são definidos pela expressão dos marcadores CD19 e CD27 positivos no sangue

periférico, podendo ainda ser subdivididos em linfócitos B de memória com e sem mudança de isotipo pela expressão da imunoglobulina IgD (48).

Existe um subtipo de linfócitos B caracterizado pela ausência dos marcadores convencionais tanto para linfócitos B *naive* quanto para linfócitos B de memória. São os linfócitos B denominados IgD-CD27- (25), com atividade proinflamatória. Estes linfócitos aumentam em indivíduos com idades mais avançadas, sendo células associadas à senescência (50).

Os plasmoblastos e plasmócitos compõe o grupo das células secretoras de anticorpos, que são derivadas de três tipos de linfócitos B maduros e ativados: Linfócitos B foliculares, linfócitos B de zona marginal e linfócitos B1. Cada um desses linfócitos atua em locais distintos executando funções especializadas. Os linfócitos B foliculares são os subtipos mais numerosos e estão presentes nos folículos linfoides dos linfonodos e baço, sendo mais especializadas em respostas a antígenos T dependentes. Os linfócitos B de zona marginal estão presentes no baço, local que possibilita identificar patógenos pela corrente sanguínea e também partículas antigênicas. Os linfócitos B1 estão localizados em mucosas, como cavidade peritoneal e pleural. Os linfócitos B1 e de zona marginal respondem a antígenos T independentes, produzindo respostas mais rápidas em locais específicos que residem (51).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar subpopulações linfocitárias em pacientes com Mieloma Múltiplo elegíveis ao TCTH, com terapia de primeira linha, utilizando CTd-Dara.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de subpopulações de linfócitos B em tempos diferentes de diagnóstico e terapia.
2. Identificar marcadores prognósticos para a terapia do estudo.
3. Quantificar células tumorais circulantes em sangue periférico.
4. Avaliar a intensidade de expressão de CD38 nas células NK, linfócitos B e T no diagnóstico.
5. Avaliar a intensidade de expressão de CD38 na superfície dos plasmócitos no diagnóstico e correlacionar com a resposta à terapia.

4 CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO

Perfil e valor prognóstico de subpopulações linfocitárias em pacientes recém diagnosticados com Mieloma Múltiplo submetidos à terapia de primeira linha com ciclofosfamida, talidomida, dexametasona e daratumumabe.

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is the second most common hematological malignancy, resulting from the proliferation of monoclonal protein-producing plasma cells, predominantly affecting the elderly population. In the last decade, therapeutic advances have led to an increase in the overall survival of patients, however the disease remains incurable. Therapeutic protocols combining alkylating agents, immunomodulators, immunosuppressants, and immunotherapy induce an immunological shift that is still not fully understood. The aim of this study was to characterize lymphocyte subsets in patients with Multiple Myeloma eligible for Autologous Stem Cell Transplant (ASCT) using first-line therapy with cyclophosphamide, thalidomide, dexamethasone combined with daratumumab (CTd-Dara), an anti-CD38 monoclonal antibody. Between 2018 and 2022, 23 newly-diagnosed MM patients had their lymphocyte profiles analyzed at five distinct time points, and the therapeutic response was monitored by Next-Generation Flow (NGF), through the detection of measurable residual disease (MRD). It was observed that the treatment induced significant changes in the lymphocyte profile, with emphasis on the decrease in B cells and NK cells. The composition of the B cell subsets changed significantly throughout the treatment. When evaluating prognostic variables, the expression of the CD38 molecule on the surface of plasma cells emerged as a promising marker, correlating with lower MRD levels for this therapy and the R-ISS system. Although the lymphocyte subpopulations and Circulating Tumor Cells (CTCs) did not achieve statistical significance in prognostic terms, they indicate a pattern warranting further investigation. These findings enhance our understanding of the immunomodulatory effects of therapies in MM and signal ways to optimize treatments and patient monitoring.

Keywords: Multiple Myeloma. CTd. Daratumumab. CD38. Plasma Cell. Immunomodulators.

INTRODUÇÃO

Mieloma Múltiplo (MM) é a segunda doença oncohematológica mais comum, caracterizada por infiltração de plasmócitos clonais na medula óssea, produção de imunoglobulinas monoclonais, anemia, hipercalcemia e danos orgânicos como lesões líticas e insuficiência renal (1). É conhecido que o MM é uma doença progressiva, com alguns estágios assintomáticos precedentes, como gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) e frequentemente seguido por um estágio intermediário, denominado de Mieloma Múltiplo smoldering (SMM). A partir disso, uma progressão leva para a fase sintomática do Mieloma Múltiplo recém diagnosticado (NDMM) e finalizando com a evolução da doença para Mieloma Múltiplo refratário/recidivado (2,3).

O tratamento do MM envolve a combinação de drogas como quimioterapia, imunomoduladores, inibidores de proteassoma e imunoterapias. No entanto, apesar dos avanços terapêuticos, a heterogeneidade do MM continua a apresentar desafios, levando a falhas terapêuticas e instigando à busca constante por novas opções de tratamento (4,5).

O tratamento para o MM tem efeitos diretos nas células do sistema imunológico. Os agentes imunomoduladores, como a talidomida, atuam como co-estimuladores de linfócitos T, sendo significativos para a estimulação e expansão de clones de células T (6). Por outro lado, drogas imunossupressoras, como a dexametasona (glicocorticoide) e a ciclofosfamida (agente alquilante), são amplamente usadas no tratamento do MM. Estas provocam depleção de linfócitos, além dos seus efeitos anticancerígenos (7,8). Já o daratumumabe, além da sua ação alvo específica direcionada ao plasmócito, também possui alguns efeitos imunomoduladores como depleção de células imunes supressoras CD38 positivas levando a expansão e ativação de células T (9,10).

Devido à incurabilidade da doença e à baixa sobrevida global, torna-se essencial a avaliação inédita da combinação das drogas Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona, Transplante Autólogo de Células Tronco Hematopoiéticas (TACTH) associados ao anticorpo monoclonal anti-CD38 (Daratumumabe) em primeira linha. A adição da imunoterapia específica, em conjunto com essas drogas imunomodulatórias e o transplante, pode induzir respostas imunológicas ainda desconhecidas. Portanto, o objetivo principal é contribuir para um maior entendimento das bases imunológicas do MM, identificar as alterações linfocitárias

induzidas por este esquema terapêutico, visando potencialmente auxiliar no desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e personalizados para os pacientes afetados por essa neoplasia.

METODOLOGIA

Entre dezembro de 2018 a setembro de 2022, vinte e três pacientes recém diagnosticados com MM, elegíveis ao transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas, submetidos à terapia de primeira linha com CTd-Dara, tiveram o perfil de linfócitos avaliados ao diagnóstico e em quatro outros diferentes tempos. Também foi avaliado a resposta terapêutica através do exame de doença residual mensurável (DRM) para MM. A mediana do acompanhamento foi de 2 anos. O comitê de ética em pesquisa aprovou o protocolo e o termo de consentimento livre e esclarecido, que foram informados antes da inclusão do paciente neste estudo (CAAE 96591818.0.0000.0048) e todos os procedimentos foram performados em acordo com declaração de Helsinki para pesquisa em humanos.

Critérios de inclusão no estudo

Paciente com idade igual ou superior a 18 anos, índice de status de desempenho do Grupo de Oncologia Cooperativa Oriental de 0, 1 ou 2 e definição documentada de mieloma múltiplo: Células plasmocitárias clonais na medula óssea $\geq 10\%$ ou plasmocitoma ósseo ou extramedular comprovado por biópsia e qualquer um ou mais dos seguintes eventos definidores de mieloma: CRAB (elevação de cálcio sérico maior do que limite normal ($>11\text{mg/dL}$), insuficiência renal (depuração de creatinina $< 40\text{mL}$ por minuto ou creatinina sérica ($> 2\text{mg/dL}$), anemia (hemoglobina com 2g/dL abaixo do limite inferior da normalidade ou valor de hemoglobina $<100\text{g/L}$) e lesões ósseas (uma ou mais lesões osteolíticas na radiografia esquelética, TC ou PET-CT), lesões focais em estudos de ressonância magnética (RMN) total do corpo ou o equivalente (análise de espinha dorsal total e pelve) ou achado de algum biomarcador positivo.

Foram considerados aptos, os pacientes sem presença de condição de comorbidade importante que possa ter um impacto negativo na tolerabilidade de quimioterapia de alta dose com TACTH.

Esquema terapêutico e coletas:

Daratumumabe foi administrado por via intravenosa na concentração de 16mg/Kg, semanalmente, durante os dois primeiros ciclos, a cada duas semanas durante os ciclos 3 e 4, combinado com ciclofosfamida oral 500mg no dia 1, 8 e 15 de cada ciclo, talidomida oral 100-200mg diariamente, continuamente e via oral e a dexametasona 40mg semanalmente. Daratumumabe foi administrado nos dias +30 e +60 após o transplante autólogo de células-tronco hematopoiéticas. E então, na fase de consolidação, daratumumabe foi administrado a cada duas semanas combinado com uma dose fixa de talidomida 100mg/dia durante 28 dias por quatro ciclos. Depois disso, o daratumumabe foi mantido uma vez por mês até a progressão ou limitação da toxicidade. Conforme demonstrado na Figura 1.

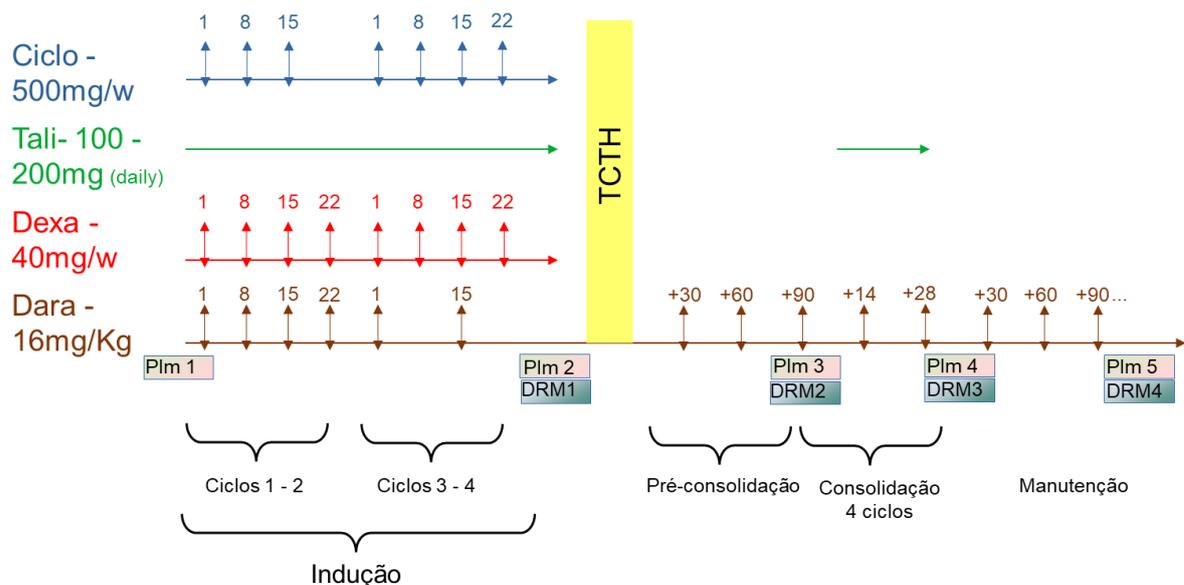


Figura 1: Esquema terapêutico do estudo e pontos de coleta para monitoramento do perfil imunológico e doença residual.

Legenda: Ciclo- Ciclofosfamida; Tali- Talidomida; Dexa- Dexametasona; Dara- Daratumumabe; TCTH- Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas; Plm- Perfil Imune; DRM- Doença Residual Mensurável.

Processamento das amostras e controle de qualidade

Foi coletado 10mL de sangue periférico em tubos contendo o anticoagulante EDTA, processados imediatamente após a coleta, utilizando o método de plataforma dupla (11) e marcados com anticorpos monoclonais conforme protocolo de marcação (material suplementar)

para a quantificação de linfócitos T, linfócitos B, células NK e células tumorais circulantes (CTC). Para a quantificação das subpopulações de linfócitos B foi realizada a separação de células mononucleares por gradiente de densidade (protocolo CMSP). Foram adquiridos 300 mil eventos para quantificação de linfócitos T, linfócitos B e células NK e cerca de 1 milhão de eventos de células mononucleares para a quantificação de subpopulações de linfócitos B. A contagem de leucócitos foi realizado por contador hematológico automatizado Abbott CELL-DYN Emerald (Abbott Diagnostics, Illinois, USA), a aquisição das amostras foi realizada no FACSCanto II (BD Biosciences, USA) e a análise dos dados foi feita no INFINICYT versão 2.0.3 (Cytognos S.L, Salamanca, Spain).

Para a investigação de DRM foi coletada de 2 a 4mL de medula óssea na região da crista ilíaca, em tubos contendo o anticoagulante EDTA, e processadas imediatamente após a coleta. A avaliação da DRM foi realizada utilizando o método de citometria de fluxo de nova geração (NGF), desenvolvido pelo Euroflow (12), para detecção de DRM de alta sensibilidade e padronizada em MM. O kit de marcação celular foi o MM MRD - Multiple Myeloma Minimal Residual Disease (Cytognos S.L, Salamanca, Spain), a aquisição das amostras foi realizada no FACSCanto II (BD Biosciences, USA) e a análise dos dados foi feita no INFINICYT versão 2.0.3 (Cytognos S.L, Salamanca, Spain).

A calibração e o controle de qualidade dos equipamentos foram realizados diariamente durante o estudo, utilizando o Cytometer Setup and Tracking Beads (BD Biosciences, USA) para o citômetro de fluxo e o CELL-DYN 18 Plus Control (Abbott Diagnostics, Illinois, USA) para o contador hematológico automatizado.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 20.0 (IBM, EUA) e os gráficos foram criados com o GraphPad PRISM versão 10.0 (GraphPad Software— San Diego, CA, EUA). A evolução das subpopulações linfocitárias foi comparada utilizando o teste de Friedman. Para as comparações entre variáveis qualitativas, foi empregado o teste exato de Fisher; para dados não paramétricos, utilizamos o teste de Mann-Whitney, e para variáveis quantitativas, aplicamos a correlação de Spearman. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Ao longo de quatro anos, entre dezembro de 2018 a setembro de 2022, pacientes recém-diagnosticados com MM foram acompanhados em cinco momentos distintos para avaliar o perfil das subpopulações linfocitárias e doença residual mensurável. Os dados demográficos e a avaliação dos pacientes, divididos em dois grupos para a intensidade de expressão do CD38 na superfície do plasmócitos, estão resumidos na Tabela 01.

Tabela 01: Características da população de estudo de acordo com a intensidade de expressão do CD38.

	Todos (n = 23)	MIF CD38		p- Value
		≤ 31.743 (n = 12)	> 31.743 (n = 11)	
Idade ao diagnóstico (mediana e faixa de variação)	58 (37-67)	61 (37-67)	54 (37-66)	0.254*
Sexo (n)				
Masculino	10(43,5%)	8	2	0.036†
Feminino	13(56,5%)	4	9	
Raça (n)				
Branco	2	1	1	0.525†
Pardo	13	6	7	
Preto	7	4	3	
R-ISS (n)				
Estágio I	5	0	5	0.018†
Estágio II	14	8	6	
Estágio III	3	3	0	
Óbito (n)				
Sim	5	4	1	0.317†
Não	18	8	10	
DRM 1 (% , mediana e range)	21	0,39 (0,005-6,55)	0,003 (0,0-0,12)	0.001*
DRM 2 (% , mediana e range)	20	0 (0 - 1,32)	0 (0-0)	0.017*
DRM 3 (% , mediana e range)	20	0 (0 - 1,1)	0 (0-0)	0.017*
DRM 4 (% , mediana e range)	19	0 (0 - 0,41)	0 (0-0)	0.032*

DRM: Doença Residual Mensurável. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência

* Teste de Mann-Whitney (amostras independentes) † Teste exato de Fisher

Avaliação das subpopulações linfocitárias durante o tratamento com CTd-Dara

Foi avaliada a composição linfocitária do sangue periférico dos pacientes recém diagnosticados com MM, antes do início terapêutico, e em mais quatro tempos durante o tratamento. O perfil de linfócitos em contagens absolutas está detalhado na Figura 02.

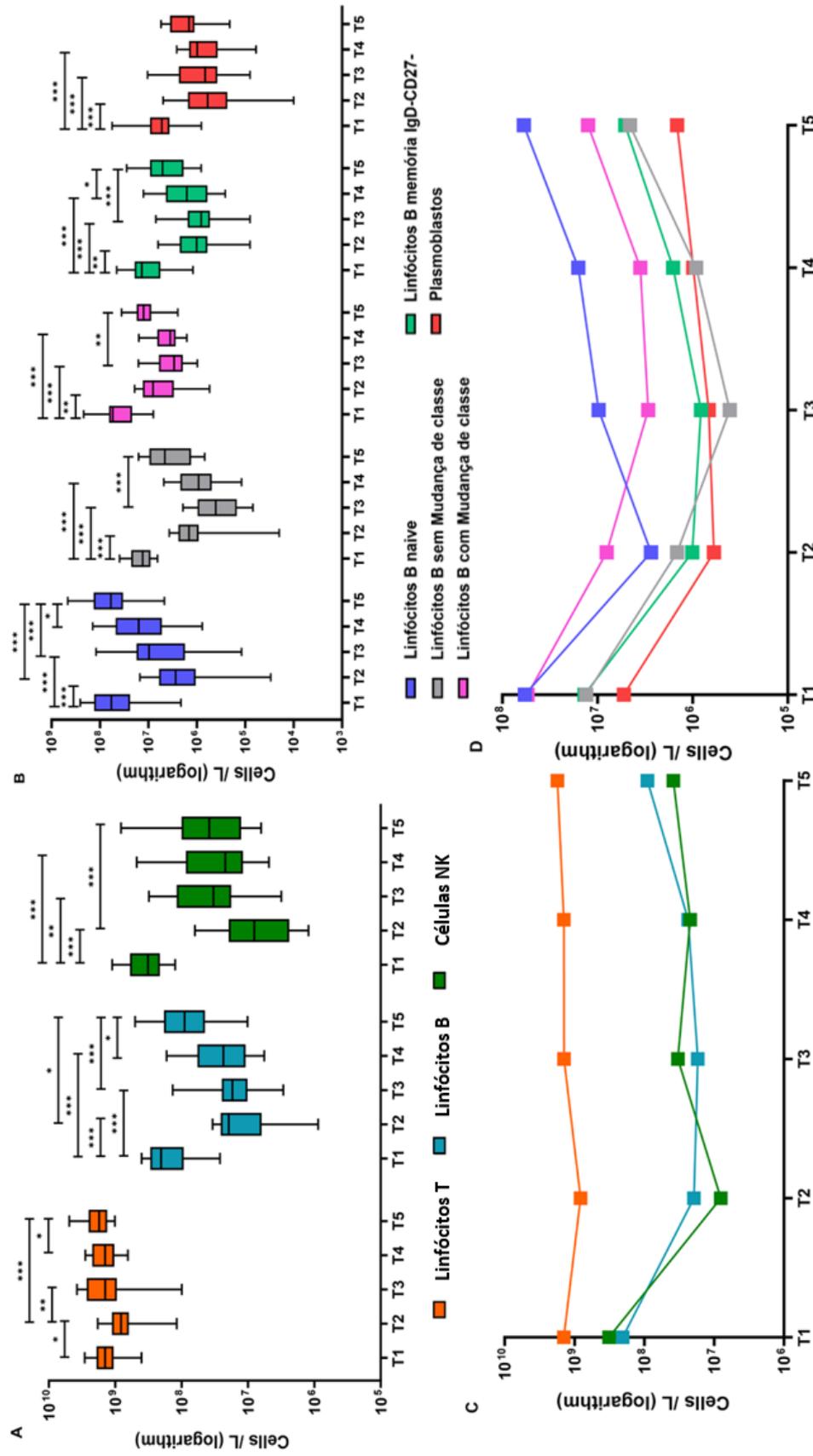


Figura 02: Caracterização do perfil de linfócitos ao longo dos diferentes pontos temporais do estudo. (A – B) BoxPlots apresentam a distribuição das células nos cinco tempos estudados. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$ Teste de Friedman. (C – D) Gráficos de linha representam a mediana de cada população linfocitária.

T1: Ao diagnóstico; T2: Pós Indução; T3: D+90 após TCTH; T4: após terapia de consolidação; T5: Um ano após manutenção.

A contagem dos três principais grupos linfocitários (linfócitos T, linfócitos B e células NK) nos pacientes recém-diagnosticados com MM, antes de começarem o tratamento (figura 2A), estava dentro dos valores padrão de indivíduos saudáveis. Os valores de referência utilizados foram: $7,2 \times 10^8$ a $2,49 \times 10^9$ células/L para os linfócitos T, $1,1 \times 10^8$ a $6,1 \times 10^8$ células/L para os linfócitos B e $8,2 \times 10^7$ a $7,6 \times 10^8$ células/L para as células NK(11). Os valores das medianas e intervalos das variações celulares nos cinco tempos avaliados podem ser visualizados na Tabela 02.

Após serem submetidos a quatro ciclos de terapia de indução com Ctd-Dara, o perfil linfocitário dos pacientes sofreu alteração. Todas as subpopulações celulares tiveram uma queda significativa (Linfócitos T com $P < 0,05$ e Linfócitos B e Células NK com $P < 0,005$). Contudo, o valor de linfócitos T ainda se manteve dentro dos valores de referência, enquanto os linfócitos B e células NK ficaram fora da faixa de normalidade dos indivíduos saudáveis.

Após isso, os pacientes foram encaminhados para o procedimento de TACTH. No 90º dia após o TACTH, a população de linfócitos T apresentou rápida recuperação ($P < 0,01$), enquanto os linfócitos B e células NK apresentaram recuperação muito lenta, se mantendo em níveis baixos durante toda a vigência terapêutica. A mediana da contagem absoluta de linfócitos B e células NK apresentou níveis mais altos só após um ano do início da fase de manutenção.

Todas as subpopulações de linfócitos B apresentaram redução significativa após a fase da terapia de indução com CTd-Dara (figura 2B). No momento do diagnóstico, os linfócitos B *naive* e os linfócitos B de memória com mudança de isotipo apresentaram as medianas das contagens absolutas semelhantes, entretanto após o quarto ciclo da terapia de indução com CTd-Dara, os linfócitos B *naive* sofreram maior depleção. Após o TACTH, os linfócitos B *naive* obtiveram recuperação mais rápida do que as outras subpopulações, enquanto os linfócitos de memória sem mudança de isotipo foram os menos frequentes na composição linfocitária B. Após um ano do início da terapia de manutenção, apenas os linfócitos B *naive* retornaram aos valores semelhantes ao diagnóstico.

Tabela 02: Valores das medianas e a faixa de variação dos linfócitos nos cinco momentos da avaliação.

n	Linfócitos T	Linfócitos B	Células NK	Linfócitos B <i>naive</i>	Linfócitos B de memória IgD-CD27-	Linfócitos B sem mudança de classe	Linfócitos B com mudança de classe	Plamoblastos	
	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	
T1	23	1425,0 (404-2893)	205,6 (26,5-401,9)	321,6 (125,8-1113,2)	58,3 (2,1-256,8)	13,8 (1,2-45,4)	27,6 (3,1-88,5)	54,7 (8,0-217,9)	5,3 (0,8-56,6)
		820,2 (118,5-1840,1)	19,5 (0,9-34,3)	8,0 (1,2-63,2)	2,8 (0,0-15,1)	1,0 (0,1-6,4)	1,5 (0,0-3,7)	8,1 (0,6-19,4)	0,6 (0,0-5,0)
T2	22	1418,3 (99,8-3784,0)	15,0 (0,0-136,6)	33,2 (3,2-312,6)	8,2 (0,0-121,5)	0,8 (0,0-7,0)	0,4 (0,0-2,0)	2,8 (0,0-16,2)	0,6 (0,0-10,5)
		1425,3 (649,0-2824,8)	23,6 (5,7-168,6)	22,0 (4,9-477,0)	16,0 (0,8-142,5)	1,6 (0,3-12,8)	0,9 (0,1-4,8)	3,6 (1,6-15,9)	1,0 (0,1-2,6)
T3	20	1758,4 (1014,6-4937,9)	90,4 (10,2-502,7)	38,5 (6,4-821,7)	59,7 (4,7-466,8)	5,1 (0,8-28,1)	4,6 (0,7-16,0)	10,4 (3,0-30,5)	1,5 (0,2-5,5)

T1: Ao diagnóstico; **T2:** Pós Indução; **T3:** D+90 após TCTH; **T4:** Após terapia de consolidação; **T5:** Um ano após manutenção

A figura 3 exibe as frequências relativas das populações de células do sistema imunológico, incluindo linfócitos T, linfócitos B e células NK. A análise desses dados revela uma tendência ao longo do tratamento: a proporção de linfócitos T aumenta progressivamente. Inicialmente, ao diagnóstico (T1), os linfócitos T representam 70% das células, e essa proporção cresce de forma constante ao longo do tratamento. Por outro lado, as células NK e os linfócitos B mostram flutuações menores em suas frequências relativas durante o mesmo período. Quando avaliado as subpopulações de linfócitos B, ao diagnóstico (T1), as células *naive* representam 39% da população de linfócitos B. Após a terapia de indução (T2), ocorre uma diminuição na proporção de células *naive* para 20%, mas nos tempos subsequentes, após o TACTH (T3), essa proporção aumenta progressivamente, atingindo 52%, 62% e, finalmente, 70% no Tempo 5.

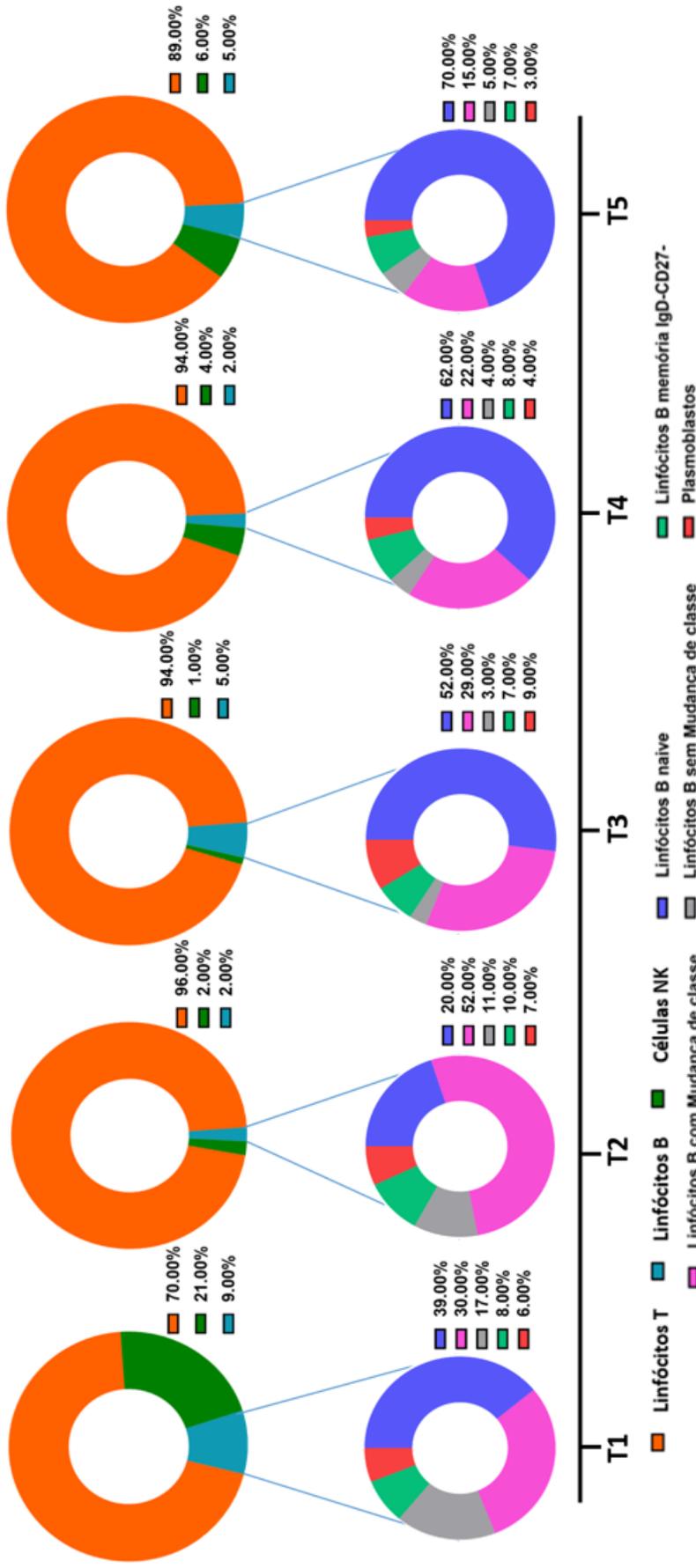


Figura 03: Composição relativa do perfil de linfócitos do grupo dos pacientes ao longo dos diferentes pontos do estudo. Os gráficos inferiores representam a composição da subpopulação de linfócitos B. T1: Ao diagnóstico; T2: Pós Indução; T3: D+30 após TCTh; T4: D+90 após TCTh; T5: Um ano após manutenção.

Avaliação prognóstica

Os resultados revelaram diferenças significativas na expressão da média de intensidade de fluorescência (MIF) do CD38 na superfície dos plasmócitos e diversos parâmetros ao longo do estudo de acompanhamento, incluindo a pesquisa de DRM em quatro tempos distintos e a estratificação de risco de acordo com o R-ISS.

Especificamente, ao analisar a MIF da expressão do CD38 no diagnóstico, observamos uma correlação inversa com a presença de plasmócitos monoclonais residuais na medula óssea. Desta forma, quanto maior a expressão do marcador anti-CD38, menor era a quantidade de plasmócitos monoclonais detectados na medula óssea durante a terapia, podendo até mesmo alcançar níveis indetectáveis (Figura 4A).

Além disso, a mesma correlação inversa foi observada entre a MIF do CD38 e a estratificação de risco de acordo com o sistema R-ISS. Isso implica que pacientes com níveis mais elevados de expressão do CD38 podem estar associados a um melhor prognóstico, de acordo com o R-ISS (Figura 4B). A MIF do CD38 também foi avaliada no momento do diagnóstico nas células NK, linfócitos B e Linfócitos T e apresentou médias de 2778, 402 e 141, respectivamente.

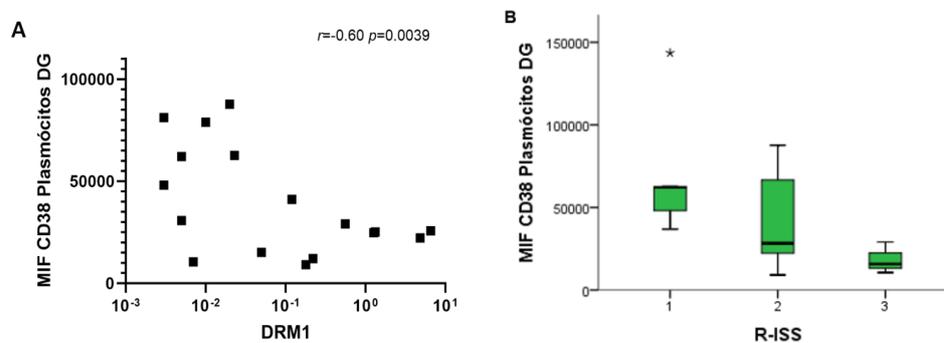


Figura 04: Intensidade de expressão do CD38 nos plasmócitos ao diagnóstico em relação aos valores de DRM1. Correlação de Spearman $p=0.0039$ (A) e R-ISS. Kruskal-Wallis $p=0.069$ (B).

As medianas das contagens absolutas de linfócitos no diagnóstico foram analisadas e estratificadas em grupos de acordo com algumas variáveis que podem inferir o prognóstico, como faixa etária e R-ISS, e variáveis que podem indicar resposta à terapia, como ocorrência de óbito e DRM positiva (Tabela 03). A variável etnia não parece exercer impacto nas contagens absolutas linfocitárias. Entretanto, foi possível observar algumas diferenças interessantes nas

contagens de linfócitos, como mediana de linfócitos T e células NK mais elevada na faixa etária de 50 a 60 anos, medianas de linfócitos T em indivíduos classificados com R-ISS de prognóstico favorável (estágio I), e o grupo de indivíduos que não foram a óbito apresentou uma mediana de linfócitos T maior. Quando agrupados em DRM positiva e negativa, foi possível verificar aumento das medianas tanto em linfócitos T quanto em linfócitos B e células NK no grupo de pacientes com DRM negativa.

Tabela 03: Valores das medianas das subpopulações linfocitárias ao diagnóstico.

	n	Linfócitos T	Linfócitos B	Células NK	Linfócitos B naive	Linfócitos B de memória IgD-CD27-	Linfócitos B sem mudança de classe	Linfócitos B com mudança de classe	Plasmoblastos	p-Value
		Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	Células/ μ L	
Idade ao diagnóstico	23									
<50 anos	7	1528,8	257,9	321,6	109,8	27,6	59,9	14,7	5,7	
50 - 60 anos	7	1750,8	244,2	601,2	54,4	21,8	59,3	18,8	5,3	ns
>60 anos	9	1138,5	154,8	264,5	36,8	34,0	40,7	8,6	4,8	
Raça										
Branco	2	1120,1	112,5	225,4	30,4	28,6	38,2	3,5	7,4	
Pardo	13	1138,5	204,6	264,5	121,4	28,8	33,4	9,0	4,8	ns
Preto	7	1818,9	244,2	601,2	54,4	21,8	59,3	14,3	7,0	
ISS										
Estágio I	5	1915,6	277,8	321,6	121,4	25,6	61,8	18,8	5,7	
Estágio II	14	1112,9	140,1	321,3	34,2	27,3	31,7	9,9	5,2	ns
Estágio III	3	1389,7	256,9	264,5	129,9	28,8	40,7	14,0	4,6	
Óbito										
Sim	5	1212,1	204,6	324,9	75,7	27,0	55,7	14,0	4,8	ns
Não	18	1476,9	212,6	319,7	56,4	28,2	47,7	13,2	5,4	
DRM 1	21									
Positiva	4	1212,1	154,8	317,7	36,2	28,8	33,4	9,0	4,6	ns
Negativa	17	1587,9	223,1	461,4	94,0	24,4	60,8	18,3	8,8	
DRM 4	19									
Positiva	3	771,8	93,6	317,7	19,2	21,8	29,9	9,0	8,2	ns
Negativa	16	1476,9	230,8	370,6	89,8	27,3	47,7	13,9	4,5	

DRM: Doença Residual mensurável

* Teste de Mann-Whitney (amostras independentes)

As Células Tumorais Circulantes (CTCs) foram avaliadas no momento do diagnóstico, revelando uma média de frequência de 0,64% entre os 21 pacientes analisados, com uma variação de 0% até 4,19%. Adicionalmente, efetuou-se uma comparação entre a distribuição das CTCs e a avaliação da expressão do marcador CD38, contudo, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre essas variáveis. Os resultados dessa avaliação das CTCs estão apresentados de forma detalhada na Tabela 04. A análise da imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias, bem como da identificação das CTCs está exemplificada na Figura 01 suplementar (materiais suplementares).

Tabela 04: Valores das medianas das Células Tumorais Circulantes ao diagnóstico.

	Todos (n = 23)	Mediana de CTCs %	Faixa de variação	p-Value
Idade ao diagnóstico	23	0,03	0 - 4,19	
<50 anos	7	0,007	0 - 0,07	
50 - 60 anos	7	0,030	0 - 1,35	0,114£
>60 anos	9	0,370	0 - 4,19	
R-ISS				
Estágio I	5	0,010	0 - 1,35	
Estágio II	14	0,030	0 - 4,19	0,407£
Estágio III	3	0,680	0,65 - 0,71	
Óbito (n)				
Sim	5	0,080	0,02 - 0,71	
Não	18	0,030	0 - 4,19	0,638*
DRM 1				
Positiva	4	0,030	0 - 4,19	
Negativa	17	0,005	0 - 0,07	0,136*
DRM 4				
Positiva	3	0,060	0 - 4,19	0,303*
Negativa	16	0,250	0,03 - 3,07	

DRM: Doença Residual Mensurável. CTC: Células Tumorais Circulantes.

* Teste de Mann-Whitney (Amostras independentes). £ Teste de Kruskal-Wallis

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a avaliar o perfil linfocitário de pacientes recém diagnosticados com MM, submetidos à terapia de primeira linha com CTd combinada com um agente imunoterápico, o daratumumabe, em pacientes elegíveis ao TCTH. Daratumumabe tem demonstrado boas respostas como monoterapia e em combinações com outras drogas em diversos estudos em pacientes refratários e recidivados (10,13) Outros estudos também demonstraram que o daratumumabe exerce não apenas função antimieloma, como também efeitos imunomoduladores (14).

Diversos estudos demonstraram que a linfopenia é um efeito adverso comum dos protocolos com adição de daratumumabe (15,16). No nosso estudo observamos linfopenia na fase de indução, quando o Dara estava em combinação com CTd. Após o transplante e com a permanência da administração contínua de daratumumabe foi observado recuperação dos linfócitos totais. Isso pode se justificar pelo fato dos linfócitos T serem menos sensíveis a este imunoterápico.

Em relação aos linfócitos T totais, demonstramos neste estudo que o daratumumabe não provocou diminuição destas células. Os linfócitos T foram pouco depletados quando em combinação com as drogas CTd na fase de indução. Na continuidade terapêutica, com administração apenas de daratumumabe, nas fases de pré consolidação e de manutenção, observamos aumento progressivo de linfócitos T. As medianas de linfócitos T permaneceram estáveis entre o terceiro e o quarto tempo. No entanto, observou-se uma expansão dos linfócitos T do quarto para o quinto tempo, quando houve com a administração de Talidomida. O que pode sugerir que a administração de Dara isoladamente não favoreceu a expansão dos linfócitos T, como descrito em estudo anterior(14), estando mais alinhado com o que foi identificado por Brown Ross e colaboradores(6) que demonstraram a expansão de células T em paciente tratados com talidomida.

Diferente dos linfócitos T, as células NK e os linfócitos B foram muito afetados pela terapia de indução com CTd-Dara. Após o TCTH, essas células tiveram recuperação muito lenta, com níveis baixos durante os dois anos de acompanhamento terapêutico, demonstrando que a ação do daratumumabe influencia na expansão destes grupos celulares. Em consonância com o nosso trabalho, outros estudos (17,18) já haviam demonstrado tanto em testes *in vitro* quanto em pacientes submetidos ao daratumumabe, a diminuição das células NK durante a

terapia com anticorpos monoclonais anti-CD38, com rápida diminuição após a primeira dose, permanecendo em baixos níveis durante todo o curso terapêutico. Esse efeito imunomodulador sobre os linfócitos B e as células NK não é uma exclusividade do Dara. Pacientes submetidos ao isatuximabe (19), outro anticorpo monoclonal direcionado a molécula CD38, tiveram depleção das células NK e das células precursoras B. Esse fato pode ser justificado pela alta expressão da molécula CD38 nestas células (14).

Estudos destacam o papel importante das células NK no combate às células tumorais (20,21). Um estudo conduzido por Rueff e colaboradores (22), avaliou que uma reconstituição rápida de células NK após TCTH está associada a uma melhor taxa de Sobrevida Livre de Progressão (PFS). Eles relataram que pacientes submetidos ao TCTH autólogo e a diferentes combinações de quimioterapia, que possuíam valores mais elevados de células NK logo após o transplante, tiveram um impacto positivo na SLP. Em nosso estudo, os pacientes apresentaram mediana de células NK no D+90 após o transplante, abaixo do *cutoff* proposto pelos autores como bom prognóstico, só atingindo o *cutoff* após 120 meses do TCTHa.

Protocolos terapêuticos com inclusão de daratumumabe apresentaram diminuição da contagem de células NK, tanto em estudos que utilizaram a droga como monoterapia quanto utilizado em terapias combinadas (23). O efeito negativo da depleção de células NK (principalmente as células NK CD38^{bright}) foi minimizado pelo uso do IMiD, que potencializa o CCDA mediado pelas células NK remanescentes, aumentando o número e a atividade de células NK CD16+ ativadas(24,25).

As diferenças das medianas de linfócitos em relação às variáveis apontadas na tabela 03, embora não tenham alcançado significância estatística, são interessantes e parecem sugerir um valor prognóstico favorável associado a contagens mais elevadas de linfócitos T, linfócitos B e células NK. Estudos anteriores podem reforçar esses resultados, demonstrando que níveis mais altos de linfócitos B estão associados com maior sobrevida livre global e sobrevida livre de progressão em pacientes com MM (26,27). As células NK também apresentam características semelhantes, em que tanto em contagem mais alta (22,28) quanto maior atividade dessas células estão associadas com melhor prognóstico (29).

Na presente análise, foi notado um aumento na mediana de linfócitos T entre pacientes com potencial prognóstico favorável - especificamente, aqueles no estágio 1 do R-ISS, abaixo de 60 anos e com DRM negativa. Contudo, esta observação não alcançou significância estatística. Isso é consistente com descobertas anteriores, como as de Brown e colaboradores

(6), que também demonstraram que a presença de expansões de linfócitos T, independentemente do tratamento adotado, estava associada a uma mediana de SLP significativamente mais longa.

Na avaliação das subpopulações linfocitárias, os linfócitos B *naive* mostraram-se bem sensíveis à fase de indução. No entanto, após o TACTH há uma forte recuperação dessas células e um aumento constante ao longo do tratamento. Este padrão sugere uma adaptação imunológica específica em resposta à terapia, onde o crescimento das células *naive* pode ser um componente chave da resposta imunológica. Existe uma lacuna na literatura sobre como o tratamento de MM influencia as subpopulações de linfócitos B (30). Portanto, interpretar nossos resultados torna-se desafiador, mas destaca a originalidade e relevância deste estudo.

Pacientes com MM apresentam um número inferior de linfócitos B totais em comparação com pacientes com MGUS ou indivíduos saudáveis. No entanto, exibem um aumento significativo nos níveis de linfócitos B de memória, particularmente aqueles com mudança de classe (31). Esse aumento de células B de memória em pacientes com MM sugere que os precursores dos plasmócitos malignos podem ter origem na população de células de memória, como destacado em pesquisas anteriores (32). Aqui, observou-se que após a intervenção terapêutica, houve uma transformação expressiva na composição dessas subpopulações nos pacientes estudados. Ao diagnóstico, havia uma predominância de células de memória e menor frequência de linfócitos *naive*. No entanto, após um ano de manutenção, observou-se um aumento de linfócitos *naive*, representando 70% das células B, e uma retração da população de linfócitos de memória.

Essa expressiva modificação na composição das subpopulações B pode estar relacionada com ação do daratumumabe, uma vez que outros estudos comprovaram (33) que o tratamento com anti-CD38 *in vitro* reduziu a proliferação e diferenciação de células B de memória com mudança de classe. Este fato pode implicar diretamente na capacidade imune humoral e provocar maior grau de imunoparesia. A imunoparesia tem sido associada a um indicador de pior prognóstico em pacientes com MM (34).

Nossa pesquisa sugere que a expressão do CD38 tem potencial como biomarcador prognóstico, dada sua correlação com o R-ISS. Quando separamos os pacientes com MM, ao diagnóstico em dois grupos, conforme a MIF de CD38, encontramos uma associação significativa, indicando diferenças nos estágios R-ISS entre pacientes baseados em um limite MIF de 31.744. Contudo, ao tratar a MIF como uma variável contínua, o valor de p foi de 0,069.

Embora essa diferença não seja estatisticamente significativa no limiar convencional de 0,05, o valor sugere uma tendência que não pode ser ignorada. Tais observações ressaltam a necessidade de estudos com número maior de pacientes para validar a relação entre a expressão de CD38 e os estágios indicados pelo R-ISS.

Identificamos uma correlação significativa entre o MIF de CD38 no momento do diagnóstico e a DRM na medula óssea durante o tratamento. Esse achado fortalece a hipótese de que a MIF do CD38 pode atuar como um biomarcador de relevante valor prognóstico em terapias anti-CD38.

Em nosso estudo, observamos também uma diferença significativa da MIF do CD38 entre gêneros, com mulheres apresentando níveis mais elevados do que os homens. É conhecido que terapias com anticorpos monoclonais anti-CD38 apresentam melhor eficácia em células que possuem maior expressão desta molécula (35,36), levantando a possibilidade da necessidade de novos estudos com administração de drogas imunomodulatórias para aumentar a expressão da molécula CD38, em grupos específicos com baixa expressão de CD38, como exemplo de lenalidomida (37), inibidores da panobinostat (38), inibidores seletivos de JAK (39) e ácido all-trans retinoico (ATRA) (40), antes do início da terapia de indução, poderia melhorar a eficiência terapêutica com drogas anti-CD38.

A quantidade de células circulantes tumorais também constitui uma ferramenta importante para avaliação de progressão do MM (41,42). Aqui, evidenciamos que a CTC parece ter uma importância em pacientes com piores prognósticos, com contagens maiores em pacientes com R-ISS estágio 3 e em pacientes com permanência de doença residual após a fase de indução. Contudo, não foi demonstrado significância estatística para estes resultados. Isso poderia ser justificado pelo número amostral pequeno deste estudo, sendo recomendado uma avaliação com um grupo maior de pacientes para confirmação desses achados.

A idade constitui um fator prognóstico para os pacientes com MM, na qual quanto mais avançada for a idade, pior prognóstico e, conseqüentemente, menor tempo de sobrevivência global (43). Em nosso estudo, apesar de não ter apresentado significância estatística para a idade, demonstramos que pacientes com idades mais avançadas apresentaram maiores frequências de células tumorais circulantes no momento do diagnóstico.

CONCLUSÃO

O tratamento com CTd-Dara impactou significativamente o perfil linfocitário dos pacientes com MM, especialmente linfócitos B e células NK. A expressão do marcador CD38 na superfície dos plasmócitos emergiu como um potencial biomarcador prognóstico, onde níveis mais elevados de expressão indicaram melhores resultados clínicos e menos doença residual mensurável. Entretanto, a correlação entre CTCs e expressão do CD38 não foi estabelecida. Esses resultados contribuem para uma compreensão mais abrangente dos efeitos imunológicos dessas abordagens terapêuticas em pacientes com mieloma múltiplo, fornecendo insights valiosos para a otimização do prognóstico, tratamento e monitoramento desses indivíduos a longo prazo.

MATERIAIS SUPLEMENTARES

Separação celular das células mononucleares

Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas através de gradiente de centrifugação, utilizando a solução FICOLL-PAQUE (densidade 1,077 g/mL), em tubos de 15mL com tampa. Sobre 3mL de FICOLL-PAQUE foram adicionados, vagarosamente, 9,5mL da amostra de sangue total e centrifugado durante 20 minutos a 500G. As células mononucleares (camada de interface entre FICOLL e plasma) foram retiradas e submetidas a lavagem com o tampão salino fosfatado (PBS).

Painéis de Citometria de fluxo

Para a marcação dos linfócitos totais e subpopulações de linfócitos B foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com isotianato de fluorosceína (FITC), ficoeritrina (PE),

ficoeritrina in tandem (PE-Cy7), proteína Piridina de clorofila (PerCP 5.5), Aloficocianina (APC), Aloficocianina in tandem (APC-Cy7), V450 e V500, conforme a tabela abaixo.

Painel para detecção das subpopulações dos linfócitos totais							
FITC	PE	PerCP	PC7	APC	APC-Cy ⁷	V450	V500
CD38ME	CD16+CD56 (3GO) + (Ncam16.2)	CD5 (F17F12)	CD19 (J3-119)	CD8 (RPA-T8)	CD3 (SK7)	CD4+CD20 (RPA-T4) + (B9E9)	CD45 (HI30)

Painel para detecção das subpopulações dos linfócitos B						
FITC	PE	PerCP	PC7	APC	V450	V500
CD38ME	IgD (IA6-2)	CD27 (M-T271)	CD19 (J3-119)	CD24 (ALB9)	CD20 (B9E9)	CD45 (HI30)

Tabela suplementar 01: Painéis com anticorpos monoclonais e seus respectivos clones.

Identificação de subpopulações linfocitárias:

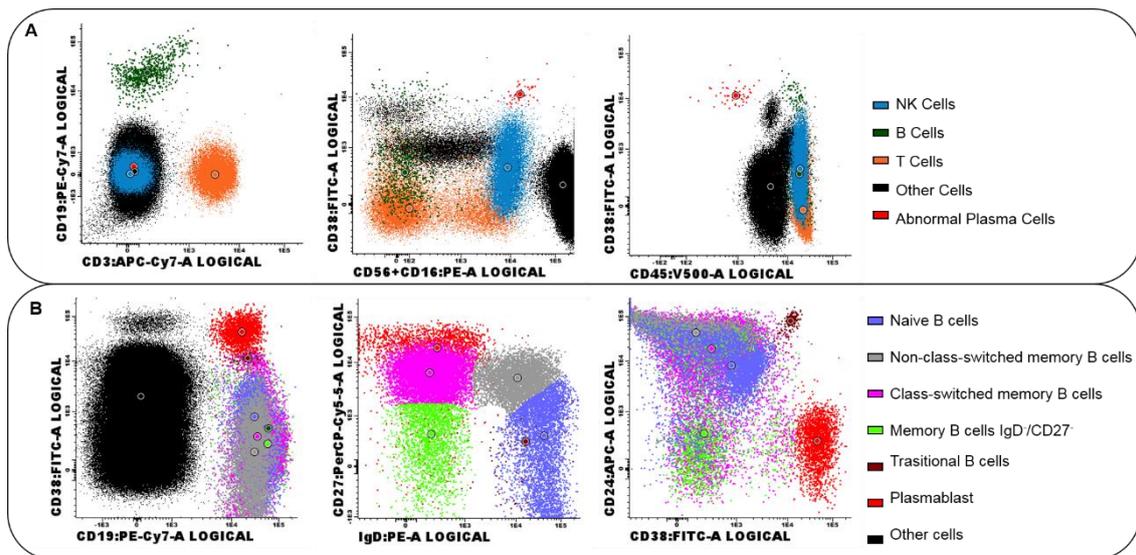


Figura suplementar 01: Imunofenotipagem por citometria de fluxo das subpopulações linfocitárias. (A) Subpopulações de linfócitos totais em sangue periférico. (B) Subpopulações de linfócitos B em amostra de CMSP.

REFERÊNCIAS

1. Kyle R, Rajkumas S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1).
2. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: A prospective study. *Blood*. 2009;113(22):5412–7.
3. Weiss BM, Abadie J, Verma P, Howard RS, Kuehl WM. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood*. 2009;113(22):5418–22.
4. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2021;397(10272):410–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
5. Bergsagel PL. Where we were, where we are, where we are going: Progress in Multiple Myeloma. *Anesth Analg*. 2014;199–203.
6. Brown RD, Spencer A, Joy Ho P, Kennedy N, Kabani K, Yang S, et al. Prognostically significant cytotoxic T cell clones are stimulated after thalidomide therapy in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2009 Nov 3;50(11):1860–4. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/10428190903216804>
7. Fauci AS. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations II. DIFFERENTIAL EFFECTS OF IN VIVO HYDROCORTISONE, PREDNISONE AND DEXAMETHASONE ON IN VITRO EXPRESSION OF LYMPHOCYTE FUNCTION. Vol. 24, *Clin. exp. Immunol*. 1976.
8. Emadi A, Jones RJ, Brodsky RA. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 2009 Nov 29;6(11):638–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2009.146>
9. Lejeune M, Duray E, Peipp M, Clémenceau B, Baron F, Beguin Y, et al. Balancing the CD38 Expression on Effector and Target Cells in Daratumumab-Mediated NK Cell ADCC against Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Jun 20;13(12):3072. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/12/3072>
10. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(8):754–66. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1606038>
11. Rudolf-Oliveira RCM, Gonçalves KT, Martignago ML, Mengatto V, Gaspar PC, de Moraes ACR, et al. Determination of lymphocyte subset reference ranges in peripheral blood of healthy adults by a dual-platform flow cytometry method. *Immunol Lett* [Internet]. 2015 Jan;163(1):96–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247814002570>

12. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia*. 2017;31(10):2094–103.
13. Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ, Singhal S, Chari A, Bahlis NJ, et al. Daratumumabe monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* [Internet]. 2016 Apr;387(10027):1551–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615011204>
14. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, et al. Daratumumabe depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384–94.
15. Al Hadidi S, Miller-Chism CN, Kamble R, Mims M. Safety Analysis of Five Randomized Controlled Studies of Daratumumabe in Patients With Multiple Myeloma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* [Internet]. 2020;20(9):e579–89. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.04.004>
16. Cottini F, Huang Y, Williams N, Bumma N, Khan AM, Chaudhry M, et al. Real World Experience of Daratumumabe: Evaluating Lymphopenia and Adverse Events in Multiple Myeloma Patients. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Feb 15;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.575168/full>
17. Naeimi Kararoudi M, Nagai Y, Elmas E, de Souza Fernandes Pereira M, Ali SA, Imus PH, et al. CD38 deletion of human primary NK cells eliminates daratumumabe-induced fratricide and boosts their effector activity. *Blood* [Internet]. 2020 Nov 19;136(21):2416–27. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/136/21/2416/461232/CD38-deletion-of-human-primary-NK-cells-eliminates>
18. Zambello R, Barilà G, Manni S, Piazza F, Semenzato G. NK cells and CD38: Implication for (Immuno) Therapy in Plasma Cell Dyscrasias. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 21;9(3):768. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/3/768>
19. Moreno L, Perez C, Zabaleta A, Manrique I, Alignani D, Ajona D, et al. The mechanism of action of the anti-CD38 monoclonal antibody isatuximab in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(10):3176–87.
20. Swift BE, Williams BA, Kosaka Y, Wang X-H, Medin JA, Viswanathan S, et al. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica* [Internet]. 2012 Jul 1;97(7):1020–8. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2011.054254>
21. El-Sherbiny YM, Meade JL, Holmes TD, McGonagle D, Mackie SL, Morgan AW, et al. The Requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the Natural Killer Cell-Mediated Killing of Myeloma Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Sep 15;67(18):8444–9. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/18/8444/533652/The-Requirement-for-DNAM-1-NKG2D-and-NKp46-in-the>

22. Rueff J, Medinger M, Heim D, Passweg J, Stern M. Lymphocyte Subset Recovery and Outcome after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Plasma Cell Myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014 Jun;20(6):896–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1083879114001566>
23. Adams HC, Stevenaert F, Krejcik J, Van der Borght K, Smets T, Bald J, et al. High-Parameter Mass Cytometry Evaluation of Relapsed/Refractory Multiple Myeloma Patients Treated with Daratumumabe Demonstrates Immune Modulation as a Novel Mechanism of Action. *Cytom Part A*. 2019;95(3):279–89.
24. Casneuf T, Xu XS, Adams HC, Axel AE, Chiu C, Khan I, et al. Effects of daratumumabe on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Adv* [Internet]. 2017 Oct 24;1(23):2105–14. Available from: <https://ashpublications.org/bloodadvances/article/1/23/2105/15720/Effects-of-daratumumabe-on-natural-killer-cells-and>
25. van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI, et al. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumabe. *Haematologica* [Internet]. 2011 Feb 1;96(2):284–90. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.030759>
26. Kay NE, Leong T, Kyle RA, Greipp P, Billadeau D, Van Ness B, et al. Circulating blood B cells in multiple myeloma: Analysis and relationship to circulating clonal cells and clinical parameters in a cohort of patients entered on the eastern cooperative oncology group phase III E9486 clinical trial. *Blood* [Internet]. 1997;90(1):340–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V90.1.340>
27. Ho CM, McCarthy PL, Wallace PK, Zhang Y, Fora A, Mellors P, et al. Immune signatures associated with improved progression-free and overall survival for myeloma patients treated with AHSCT. *Blood Adv*. 2017;1(15):1056–66.
28. de Magalhães RJP, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, García-Sanz R, Mateos MV, et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. 2013;98(1):79–86.
29. Jurisic V, Srdic T, Konjevic G, Markovic O, Colovic M. Clinical stage-depending decrease of NK cell activity in multiple myeloma patients. *Med Oncol*. 2007;24(3):312–7.
30. Pojero F, Casuccio A, Giambanco C, Bulati M, Buffa S, Di Bassiano F, et al. Bone marrow B lymphocytes in multiple myeloma and MGUS: Focus on distribution of naïve cells and memory subsets. *Leuk Res* [Internet]. 2016 Oct;49:51–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0145212616301722>
31. Všíanská P, Říhová L, Varmužová T, Suská R, Kryukov F, Mikulášová A, et al. Analysis of B-Cell Subpopulations in Monoclonal Gammopathies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2015 Apr;15(4):e61–71. Available from:

- <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265014005382>
32. Matsui W, Wang Q, Barber JP, Brennan S, Smith BD, Borrello I, et al. Clonogenic Multiple Myeloma Progenitors, Stem Cell Properties, and Drug Resistance. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jan 1;68(1):190–7. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/68/1/190/540521/Clonogenic-Multiple-Myeloma-Progenitors-Stem-Cell>
 33. Verhoeven D, Grinwis L, Marsman C, Jansen MH, Van Leeuwen EM, Kuijpers TW. B-cell targeting with anti-CD38 daratumumabe: implications for differentiation and memory responses. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2023 Sep;6(9):e202302214. Available from: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.202302214>
 34. Geng C, Yang G, Wang H, Wu Y, Leng Y, Zhou H, et al. Deep and partial immunoparesis is a poor prognostic factor for newly diagnosed multiple myeloma patients. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2021 Mar 21;62(4):883–90. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2020.1855345>
 35. Nijhof IS, Casneuf T, Van Velzen J, Van Kessel B, Axel AE, Syed K, et al. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumabe therapy in myeloma. *Blood* [Internet]. 2016;128(7):959–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2016-03-703439>
 36. Lejeune M, Duray E, Peipp M, Beguin Y, Caers J. Balancing the CD38 Expression on Effector and Target Cells in Daratumumabe-Mediated NK Cell ADCC against Multiple Myeloma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3072).
 37. Fedele PL, Willis SN, Liao Y, Low MS, Rautela J, Segal DH, et al. IMiDs prime myeloma cells for daratumumabe-mediated cytotoxicity through loss of ikaros and aiolos. *Blood* [Internet]. 2018;132(20):2166–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2018-05-850727>
 38. García-Guerrero E, Gogishvili T, Danhof S, Schreder M, Pallaud C, Pérez-Simón JA, et al. Panobinostat induces CD38 upregulation and augments the antimyeloma efficacy of daratumumabe. *Blood*. 2017;129(25):3386–8.
 39. Ogiya D, Liu J, Ohguchi H, Kurata K, Samur MK, Tai Y-T, et al. The JAK-STAT pathway regulates CD38 on myeloma cells in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *Blood* [Internet]. 2020 Nov 12;136(20):2334–45. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/136/20/2334/461276/The-JAKSTAT-pathway-regulates-CD38-on-myeloma>
 40. Nijhof IS, Groen RWJ, Lokhorst HM, Van Kessel B, Bloem AC, Van Velzen J, et al. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumabe. *Leukemia* [Internet]. 2015;29(10):2039–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2015.123>
 41. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Garcés JJ, Paiva B, Puig N, García-Mateo A, et al. Next generation flow for minimally-invasive blood characterization of MGUS and multiple myeloma at diagnosis based on circulating tumor plasma cells (CTPC). *Blood Cancer J* [Internet]. 2018;8(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41408-018->

- 0153-9
42. Sanoja-Flores L, Flores-Montero J, Pérez-Andrés M, Puig N, Orfao A. Detection of Circulating Tumor Plasma Cells in Monoclonal Gammopathies: Methods, Pathogenic Role, and Clinical Implications. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Jun 8;12(6):1499. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1499>
 43. Qian J, Jin J, Luo H, Jin C, Wang L, Qian W, et al. Analysis of clinical characteristics and prognostic factors of multiple myeloma: a retrospective single-center study of 787 cases. *Hematology* [Internet]. 2017;22(8):472–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1309493>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2014;15(12):e538–48. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70442-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70442-5)
2. Rodriguez-Otero P, Paiva B, San-Miguel JF. Roadmap to cure multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2021 Nov;100:102284. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737221001328>
3. Curado MP, Oliveira MM, Silva DRM, Souza DLB. Epidemiology of multiple myeloma in 17 Latin American countries: an update. *Cancer Med*. 2018;7(5):2101–8.
4. Gozzetti A, Ciofini S, Simoncelli M, Santoni A, Pacelli P, Raspadori D, et al. Anti CD38 monoclonal antibodies for multiple myeloma treatment. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2022 Nov 30;18(5). Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21645515.2022.2052658>
5. Bergsagel PL. Where we were, where we are, where we are going: Progress in Multiple Myeloma. *Anesth Analg*. 2014;199–203.
6. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2021;397(10272):410–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
7. Firth J. Haematology: multiple myeloma. *Clin Med (Northfield Il)* [Internet]. 2019 Jan 16;19(1):58–60. Available from: <https://www.rcpjournals.org/lookup/doi/10.7861/clinmedicine.19-1-58>
8. Kaur J, Valisekka SS, Hameed M, Bandi PS, Varma S, Onwughalu CJ, et al. Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance: A Comprehensive Review. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2023 May;23(5):e195–212. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265023000605>
9. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2008 Mar 15;111(6):2962–72. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/111/6/2962/24148/Multiple-myeloma>
10. Cowan AJ, Allen C, Barac A, Basaleem H, Bensenor I, Curado MP, et al. Global burden of multiple myeloma: A systematic analysis for the global burden of disease study 2016. *JAMA Oncol*. 2018;4(9):1221–7.
11. Lyon. Global Cancer Observatory: Cancer Today [Internet]. International Agency for Research on Cancer. [cited 2023 Jan 4]. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>
12. Fairfield H, Falank C, Avery L, Reagan MR. Multiple myeloma in the marrow: Pathogenesis and treatments. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1364(1):32–51.
13. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, Van Duin M, Sonneveld P, Mateos MV, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Prim* [Internet]. 2017;3:1–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
14. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, et al. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2016;375(8):754–66. Available from:

<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1606038>

15. de Magalhães RJP, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, García-Sanz R, Mateos MV, et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. 2013;98(1):79–86.
16. Všianská P, Říhová L, Varmužová T, Suská R, Kryukov F, Mikulášová A, et al. Analysis of B-Cell Subpopulations in Monoclonal Gammopathies. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* [Internet]. 2015 Apr;15(4):e61–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2152265014005382>
17. Shevra C, Singh S, Singh N, Kumar S, Rai M, Singh U. Interleukin-6 and interleukin-4 levels in multiple myeloma and correlation of interleukin-6 with β 2 microglobulin and serum creatinine. *Clin Cancer Investig J*. 2015;4(2):211.
18. Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2007;138(5):563–79.
19. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2022 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2022 Aug 23;97(8):1086–107. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.26590>
20. Kyle R, Rajkumar S. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009;23(1).
21. Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020;95(5):548–67.
22. Hanbali A, Hassanein M, Rasheed W, Aljurf M, Alsharif F. The Evolution of Prognostic Factors in Multiple Myeloma. *Adv Hematol*. 2017;2017.
23. Rajkumar SV, Greipp PR. Prognostic factors in multiple myeloma. *Monoclon GAMMOPATHIES Relat Disord*. 1999;13(6):1295–314.
24. Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB, Lahuerta JJ, Mateos M V., Gutiérrez N, et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: A study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol*. 2008;26(16):2737–44.
25. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol*. 2015;33(26):2863–9.
26. Dadzie TG, Green AC. The role of the bone microenvironment in regulating myeloma residual disease and treatment. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Aug 22;12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2022.999939/full>
27. Ntanasis-Stathopoulos I, Gavriatopoulou M, Kastiris E, Terpos E, Dimopoulos MA. Multiple myeloma: Role of autologous transplantation. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2020 Jan;82:101929. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305737219301501>
28. Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T, Bahlis NJ, Belch A, Lonial S, et al. Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(1):34–44.

29. Crusoe E de Q, Higashi F, Padilha MPNC, Miranda ECM, Quero AA, Almeida M de SS, et al. Outcomes of autologous transplantation for multiple myeloma according to different induction regimens. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2014;36(1):19–24.
30. Kastiris E, Dimopoulos MA. Thalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2007;20(4):681–99.
31. Ahlmann M, Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2016 Oct 19;78(4):661–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00280-016-3152-1>
32. Madamsetty VS, Mohammadinejad R, Uzieliene I, Nabavi N, Dehshahri A, García-Couce J, et al. Dexamethasone: Insights into Pharmacological Aspects, Therapeutic Mechanisms, and Delivery Systems. *ACS Biomater Sci Eng* [Internet]. 2022 May 9;8(5):1763–90. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsbiomaterials.2c00026>
33. de Weers M, Tai Y-T, van der Veer MS, Bakker JM, Vink T, Jacobs DCH, et al. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *J Immunol*. 2011;186(3):1840–8.
34. Van De Donk NW CJ, Usmani SZ. CD38 antibodies in multiple myeloma: Mechanisms of action and modes of resistance. *Front Immunol*. 2018;9(SEP):1–12.
35. Lúcio P, Parreira A, Van Den Beemd MWM, Van Lochem EG, Van Wering ER, Baars E, et al. Flow cytometric analysis of normal B cell differentiation: A frame of reference for the detection of minimal residual disease in precursor-B-ALL. *Leukemia*. 1999;13(3):419–27.
36. Srivastava S, Riddell SR. Engineering CAR-T Cells: Design Concepts Shivani. *Trends Immunol*. 2015;36(8).
37. Zhang X, Zhang H, Lan H, Wu J, Xiao Y. CAR-T cell therapy in multiple myeloma: Current limitations and potential strategies. *Front Immunol*. 2023;14(February):1–13.
38. Xu J, Chen LJ, Yang SS, Sun Y, Wu W, Liu YF, et al. Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(19):9543–51.
39. Zhang M, Wei G, Zhou L, Zhou J, Chen S, Zhang W, et al. GPRC5D CAR T cells (OriCAR-017) in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (POLARIS): a first-in-human, single-centre, single-arm, phase 1 trial. *Lancet Haematol* [Internet]. 2023 Feb;10(2):e107–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352302622003726>
40. Abecassis A, Roders N, Fayon M, Choisy C, Nelson E, Harel S, et al. CAR-T cells derived from multiple myeloma patients at diagnosis have improved cytotoxic functions compared to those produced at relapse or following daratumumab treatment. *eJHaem*. 2022;3(3):970–4.
41. Dimopoulos MA, Moreau P, Terpos E, Mateos M V., Zweegman S, Cook G, et al. Multiple myeloma: EHA-ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol* [Internet]. 2021;32(3):309–22. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.11.014>

42. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016;17(8):e328–46. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30206-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30206-6)
43. Zamagni E, Tacchetti P, Barbato S, Cavo M. Role of imaging in the evaluation of minimal residual disease in multiple myeloma patients. *J Clin Med*. 2020;9(11):1–9.
44. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. ELSEVIER. 2008.
45. Kumar B V, Connors T, Farber DL. Human T cell development, localization, and function throughout life. 2018;48(2).
46. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013;131(4):959–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>
47. Lino AC, Dörner T, Bar-Or A, Fillatreau S. Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases. *Immunol Rev* [Internet]. 2016 Jan 19;269(1):130–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/imr.12374>
48. Sanz I, Wei C, Jenks SA, Cashman KS, Tipton C, Woodruff MC, et al. Challenges and opportunities for consistent classification of human b cell and plasma cell populations. *Front Immunol*. 2019;10(OCT):1–17.
49. Seifert M, Küppers R. Human memory B cells. *Leukemia*. 2016;30(12):2283–92.
50. Nevalainen T, Autio A, Kummola L, Salomaa T, Junttila I, Jylhä M, et al. CD27-IgD-B cell memory subset associates with inflammation and frailty in elderly individuals but only in males. *Immun Ageing*. 2019;16(1):1–9.
51. Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(3):160–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3795>