

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Marianna Licati Calado

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CITOLÍTICAS E MOLÉCULAS
INIBITÓRIAS NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM PACIENTES
COM LINFOMA NÃO-HODGKIN E MIELOMA MÚLTIPLO

Uberaba/Brasil

2019

Marianna Licati Calado

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CITOLÍTICAS E MOLÉCULAS
INIBITÓRIAS NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM PACIENTES
COM LINFOMA NÃO-HODGKIN E MIELOMA MÚLTIPLO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada (IBA)”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadora: Dra. Fernanda Bernadelli De Vito

Uberaba/Brasil

2019

Marianna Licati Calado

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS CITOLÍTICAS E MOLÉCULAS
INIBITÓRIAS NA REGULAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA EM PACIENTES
COM LINFOMA NÃO-HODGKIN E MIELOMA MÚLTIPLO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração “Imunologia Básica e Aplicada (IBA)”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Coorientadora: Dra. Fernanda Bernadelli De Vito

14 de março de 2019

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcos Vinícius da Silva

Prof. Dra. Evandra Strazza Rodrigues Sandoval

Prof. Dr. Helio Moraes de Souza

Dedicatória

Dedico este trabalho a eles: meus pais, a quem eu amo profundamente.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus por me guiar em todos os momentos da minha vida, dando saúde e força não só a mim como a meus pais.

Agradeço aos meus pais, Justiniano e Rosemeire, que sempre me apoiaram de forma incondicional, por todos os momentos durante a minha vida: pessoal, acadêmica e de pós-graduação. Sem eles, nada teria sido possível.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Moraes de Souza, por me aceitar como sua orientanda, desde a iniciação científica até a pós-graduação. Obrigada por todos os conselhos, oportunidades e ensinamentos transmitidos que serão de grande valia à minha vida profissional.

Agradeço à minha coorientadora, Dra Fernanda Bernadelli De Vito e à Ms Bruna Maria Bereta de Souza, por tudo o que pude aprender com vocês e por toda a força que me deram, em todos os momentos difíceis que apareceram nesta jornada. Obrigada por me receber nos laboratórios e por confiar em mim. Obrigada pelas conversas, dicas, ensinamentos, ajuda, pela excelente convivência e por me permitir acompanhar todas as suas trajetórias na pós-graduação.

Agradeço aos médicos do serviço de onco-hematologia do HC-UFTM, em especial ao Dr. Leonardo Rodrigues de Oliveira, por comunicar a chegada de novos pacientes para a realização do projeto, às enfermeiras, por coletar as amostras dos pacientes, aos funcionários da Central de Quimioterapia por sempre me ajudar a encontrar as datas corretas das consultas/retornos dos pacientes. Agradeço ainda aos funcionários do laboratório de Controle de Qualidade do Hemocentro Regional de Uberaba, por permitirem a realização do hemograma automatizado nos aparelhos do laboratório.

Agradeço aos indivíduos saudáveis e pacientes selecionados para a realização deste projeto, por aceitarem doar suas amostras com a intenção de auxiliar no avanço científico da pesquisa brasileira.

Agradeço ao Prof Dr. Marcos Vinícius da Silva e ao Prof Dr. Virmondos Rodrigues Junior, por sempre estarem disponíveis a nos auxiliar, principalmente na fase final do mestrado para a criação de um novo projeto em tão pouco tempo para ser realizado. Sem a sua ajuda, este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço aos professores Dr. Paulo Roberto Juliano Martins e Dra. Sheila Soares Silva, pelas palavras sábias que foram passadas durante as reuniões de revista de nosso grupo de pós-graduação. E também agradeço a todo o grupo de pós-graduação, Gláucia Aparecida Domingos Resende, Aline Menezes Carlos, Loren Queli Pereira, Stella Borges Silva e Alexandra Silva Leal, pelos momentos em grupo durante as reuniões de revista e as viagens para congressos.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por financiar minha bolsa de Iniciação Científica, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar minha bolsa de pós-graduação e à Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) por me proporcionar o ambiente profissional para me aproximar da pesquisa científica.

Obrigada a todos!

RESUMO

A ativação da imunidade adaptativa mediada por linfócitos T citotóxicos (LTC) e células *natural killer* (NK) é controlada pela expressão de receptores e moléculas inibitórias, que atuam prevenindo a exacerbação imunológica e apoptose por excesso de ativação. As células tumorais são capazes utilizar estes mesmos ligantes como mecanismo de escape tumoral, inibindo o reconhecimento e ativação das células efetoras, levando-as ao estado de irresponsividade. Alterações no funcionamento do sistema imune podem interferir diretamente na sobrevida do paciente. Por isso, informações a respeito do perfil imunológico são necessários para o desenvolvimento de uma terapia individualizada para o tratamento destas doenças. Neste estudo foi avaliada a expressão gênica de receptores e moléculas inibitórias e de proteínas citolíticas em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e mieloma múltiplo (MM) em comparação a indivíduos saudáveis. O aumento na expressão gênica de granzima B associado a redução na expressão de Fas-L e PD-L1 demonstrou a ativação do sistema imunológico em pacientes com LNH. A redução dos níveis das moléculas inibitórias atuou como fator ativador da resposta imune, que poderia acarretar na inibição da autorregulação das células efetoras, levando-as a maior ativação e atividade citotóxica do sistema imunológico. Por sua vez, na ausência de expressões significativas, a redução do sistema imunológico em pacientes com MM pode ser comprovada pelas correlações inversamente proporcionais entre as proteínas citolíticas e receptores ou moléculas inibitórias. Neste cenário, o aumento na expressão das moléculas inibitórias atua simultaneamente às células tumorais, promovendo uma regulação negativa do sistema imunológico, auxiliando no processo de imunorregulação. A próxima etapa deste estudo é correlacionar a expressão destes fatores tanto no sangue periférico quanto no microambiente tumoral, em conjunto com a análise de sobrevida, para um melhor entendimento destes mecanismos na resposta imune.

Palavras-Chave: Perforina, granzima B, Fas, Fas-L, CD86, PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1, linfoma não-Hodgkin, mieloma múltiplo, receptores inibitórios de células T, qPCR.

ABSTRACT

The activation of adaptive immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer (NK) is controlled by expression of inhibitory receptors and molecules, which act by preventing exacerbation and immune activation by excessive apoptosis. Tumor cells are able to use these same ligands as a mechanism of tumor escape, by inhibiting the recognition and activation of effector cells, leading to the state of irresponsiveness. Changes in the functioning of the immune system can directly interfere with therapeutic response and / or prognosis of the disease. Therefore, information regarding the immunological profile is necessary for the development of an individualized therapy for the treatment of these diseases. In this study, we evaluated the gene expression of cytolytic protein and inhibitory receptors or molecules in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and multiple myeloma (MM) compared to healthy individuals. The increase in granzyme B gene expression associated with reduced expression of Fas-L and PD-L1 demonstrated the activation of the immune system in patients with NHL. The reduction in the levels of inhibitory molecules served as activating factor immune response, which could result in inhibition of self-regulation of effector cells, leading to greater activation and the cytotoxic activity of the immune system. In turn, in the absence of significant expressions, the reduction of the immune system in MM patients can be proved by the inversely proportional correlations between cytolytic proteins and inhibitory receptors or molecules. In this scenario, the increase in the expression of the inhibitory molecules acts simultaneously to the tumor cells, promoting a negative regulation of the immune system, aiding in the process of immunoregulation. The next step of this study is to correlate the expression of these factors in both peripheral blood and in the tumor microenvironment in conjunction with survival analysis for a better understanding of these mechanisms in the immune response.

Key Words: perforin, granzyme B, Fas, Fas-L, CD86, PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1, non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, T cell inhibitory receptors, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 01 - Mecanismo de ação das células NK e LTC contra uma célula tumoral ou infectada por vírus, pela exocitose dos grânulos citolíticos e/ou via Fas/Fasp.25
- Figura 02 - Expressão de receptores “checkpoints imunológicos” e apresentação de sinais estimulatórios (verde) e inibitórios (vermelho)p.26
- Figura 03 - Formação dos poros de perforina na membrana citoplasmática das células tumorais (adaptado)p.28
- Figura 04 - Mecanismo de ação da granzima B na apoptose das células tumorais ou infectadas por vírus p. 29
- Figura 05 - Via extrínseca de apoptose por ativação dos receptores Fas/Fas-L ...p.31
- Figura 06 - Expressão do receptor CTLA-4 e seu mecanismo de açãop.33
- Figura 07 - Mecanismo de atuação dos receptores PD-1/PD-L1p.34
- Figura 08 - Receptor TIM-3 e seus ligantes (adaptado)p.35
- Figura 9 - Expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB) Fas, Fas-L e CD86 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e indivíduos saudáveisp.47
- Figura 10 - Expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 e MARCH-1 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e indivíduos saudáveisp.48
- Figura 11 - Correlações entre a expressão de perforina (PRF), granzima B (GZMB) e Fas com PD-L1, Fas-L, CD86 com MARCH-1 e CTLA-4 e PD-1 com PD-L1 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH)p.49
- Figura 12a - Níveis de expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB), Fas, Fas-L e CD86 em pacientes linfoma não-Hodgkin (LNH) agressivo, linfoma não-Hodgkin (LNH) indolente e indivíduos saudáveisp.51
- Figura 12b - Níveis de expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 e MARCH-1 em pacientes linfoma não-Hodgkin (LNH) agressivo, linfoma não-Hodgkin (LNH) indolente e indivíduos saudáveisp.52

Figura 13 – Análise de sobrevida dos pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH), de acordo com a expressão de proteínas citolíticas, receptores e moléculas inibitórias	p.53
Figura 14 - Expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB), Fas, Fas-L e CD86 em pacientes com mieloma múltiplo (MM) e indivíduos saudáveis	p.56
Figura 15 - Expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 e MARCH-1 em pacientes com mieloma múltiplo (MM) e indivíduos saudáveis	p.57
Figura 16 – Correlação da expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB) e Fas com PD-L1, Fas-L e MARCH-1, CD86 com MARCH-1 e CTLA-4 e PD-1 com PD-L1 em pacientes com mieloma múltiplo (MM)	p.58
Figura 17 – Análise de sobrevida dos pacientes com mieloma múltiplo (MM), de acordo com a expressão de proteínas citolíticas, receptores e moléculas inibitórias	p.60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01 - Caracterização de linfoma não-Hodgkin indolente e agressivop.21
- Tabela 02 - Lista de códigos das sondas TaqMan utilizadas no experimentop.43
- Tabela 03 - Caracterização da população avaliada no estudop.45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: adenosina trifosfato

CAD: do inglês *cleavage of activated deoxyribonuclease* – clivagem da desoxirribonuclease ativada

Ceacam 1: do inglês *carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1* – molécula de adesão celular antígeno carcinoembrionário

Células *NK*: células *Natural Killer*

CD: do inglês *cluster of differentiation*

cDNA: DNA complementar

CTLA-4: do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* – proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4

°C: graus centígrados

DD: do inglês *death domains* – domínios de morte

DED: do inglês *death effector domain* – domínio efetor de morte

DISC: do inglês *death inducing signaling complex* – complexo de sinalização indutora de morte

DNA: do inglês *deoxyribonucleic acid* – ácido desoxirribonucleico

$\Delta\Delta$ CT: do inglês *$\Delta\Delta$ cycle threshold*

EDTA: do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid* – ácido etilendiamino tetraacético

FADD: do inglês *Fas-associated death domain* – domínio de morte associado a Fas

Fas (CD95): do inglês *apoptosis antigen 1 (APO-1 or APT), cluster of differentiation 95 (CD95) or tumor necrosis factor receptor superfamily* – receptor de morte celular

Fas-L: do inglês *Fas ligand, apoptosis antigen 1 (APO-1 or APT), cluster of differentiation 95* – ligante do receptor de morte celular

Gal-9: galactina 9

GZMB: granzima B

HC-UFTM: Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

HMGB1: do inglês *high mobility group protein B1* – grupo de alta mobilidade de proteína B1

IFN- γ : interferon gama

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ITIM: do inglês *immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif* – motivo inibidor baseado em imunoreceptor de tirosina

LH: linfoma de Hodgkin

LNH: linfoma não-Hodgkin

LNH AG: linfoma não-Hodgkin agressivos

LNH BG: linfoma não-Hodgkin indolentes

LTC: do inglês *cytotoxic T lymphocyte* – linfócito T citotóxico

MARCH-1: do inglês *membrane-associated RING-CH family of E3 ubiquitin ligases* – família RING-CH associada à membrane de ligases de ubiquitina E3

MHC: do inglês *major histocompatibility complex* - complexo principal de histocompatibilidade

mL: mililitros

μ L: microlitro

M: molar

mM: milimolar

MM: mieloma múltiplo

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCR: do inglês *polymerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase

PD-1: do inglês *programmed death-1* – receptor de morte programada 1

PD-L1: do inglês *programmed death-ligand 1* – ligante do receptor de morte programada

PRF: perforina

PtdSer: fosfatidilserina

qPCR: do inglês *quantitative polymerase chain reaction* - PCR em tempo real quantitativa

RQ: do inglês *relative quantification* – quantificação relativa

TCR: do inglês *T cell receptor* –receptores de células T

TIM-3: do inglês *T cell immunoglobulin and mucin-domain containing 3* – domínios de mucina e imunoglobulina de células T

TNF- α : do inglês *tumor necrosis factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa

TRADD: do inglês *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain* – Domínio DEATH associado ao receptor do fator de necrose tumoral tipo 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	p.17
2. DESENVOLVIMENTO	p.21
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	p.21
2.1.1 Neoplasias linfoproliferativas	p.21
2.1.2 Resposta imune contra as células tumorais	p.23
2.1.3 Perforina, granzima B e ligação Fas/Fas-L	p.27
2.1.4 Mecanismos de escape tumoral: receptores inibitórios	p.32
2.2 JUSTIFICATIVA	p.37
2.3 HIPÓTESES	p.38
2.4 OBJETIVOS	p.38
2.4.1 Objetivo geral	p.38
2.4.2 Objetivos específicos	p.38
2.5 METODOLOGIA	p.39
2.5.1 Casuística	p.39
2.5.1.1 Critérios de inclusão para pacientes	p.39
2.5.1.2 Critérios de exclusão para pacientes	p.39
2.5.1.3 Critérios de inclusão para grupo controle	p.39
2.5.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle	p.39
2.5.2 Considerações éticas	p.40
2.5.3 Coleta de sangue periférico e preparação das amostras	p.40
2.5.4 Avaliação da expressão gênica	p.40
2.5.4.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)	p.40
2.5.4.2 Transcrição reversa	p.42
2.5.4.3 PCR quantitativa (qPCR)	p.43
2.5.4.4 Análise estatística	p.44
2.6 RESULTADOS	p.45
2.6.1 Caracterização da população avaliada	p.45
2.6.2 Expressão gênica em LNH e indivíduos saudáveis	p.46
2.6.3 Expressão gênica em MM e indivíduos saudáveis	p.55
2.7 DISCUSSÃO	p.62
3.0 CONCLUSÃO	p.68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p.70
APÊNDICES	
ANEXOS	

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Durante o século XX, o desenvolvimento gerado pela globalização industrial foi responsável por induzir mudanças das características dos perfis demográficos e epidemiológicos da sociedade. Consequentemente, essas mudanças promoveram o declínio das taxas de mortalidade ocasionadas por doenças infecciosas e o aumento da expectativa de vida da população, gerando uma maior incidência de doenças crônicas até então pouco conhecidas, como as neoplasias. Dessa forma, desde o ano de 2000, as neoplasias correspondem à segunda principal causa de morte da população brasileira (INCA, 2006).

As neoplasias hematológicas, são tumores malignos originados das células do sangue periférico, da medula óssea e do sistema linfático. Nos Estados Unidos, foi estimado para o ano de 2018 174.250 pessoas diagnosticadas com neoplasias hematológicas, sendo aproximadamente 35% com leucemia, 48% com linfoma e 18% com mieloma múltiplo (MM), representando 10% de todos os novos casos de câncer (THE LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2018). Para o Brasil, as estimativas para 2018 foram de 23.510 novos casos de leucemias e linfomas (3,7% dos 634.880 cânceres previstos) (INCA, 2017).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) considera uma expectativa de incidência superior a 10.000 novos casos de linfoma não-Hodgkin (LNH) somente no ano de 2018, sendo aproximadamente 5.370 casos em homens e 4.810 casos em mulheres (INCA, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os LNH podem ser classificados em mais de 20 subtipos conforme o grau de severidade da doença associada à capacidade proliferativa das células tumorais (SWERDLOW et al, 2008), sendo reagrupados em dois: agressivos e indolentes.

O MM é considerado o terceiro tipo de câncer hematológico mais frequente na população mundial, sendo responsável por 1% de todos os casos de câncer diagnosticados. A 'American Cancer Society', estimou que a incidência para o ano de 2018 fosse superior a 30.000 novos casos na população norte-americana, com aproximadamente 16.400 casos em homens e 14.370 casos em mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

O aumento da expectativa de vida associado às elevadas taxas de incidência e mortalidade relacionadas com às neoplasias indica a necessidade de se realizar

pesquisas e ações para o melhor entendimento do desenvolvimento destas doenças, assim como melhor compreender os mecanismos imunológicos de resposta contra as células tumorais de forma individualizada.

A ocorrência de neoplasias tem relação estreita com defeitos genéticos que, associados ou não à imunodeficiência, são capazes de promover a proliferação celular anormal e descontrolada. Em contrapartida, o sistema imunológico atua por diferentes meios na tentativa de promover a morte das células tumorais.

O principal mecanismo de morte utilizado tanto pelos linfócitos T citotóxicos (LTC) como pelas células *Natural Killer* (NK) emprega a exocitose de proteínas citolíticas, como a perforina, uma proteína disruptora de membrana, e da proteína granzima B, uma serino-protease que promovem a apoptose das células tumorais. Outro mecanismo de ação dos LTC e células NK utiliza a ativação de receptores e moléculas expressos na superfície das células efectoras e das células tumorais, como Fas e Fas-L (VILLA-MORALES et al, 2010; MARTÍNEZ-LOSTAO et al, 2015).

É sabido que a funcionalidade citotóxica dos LTC e células NK frente às células tumorais varia conforme mecanismos de escape que as células tumorais utilizam para evitar a apoptose e evadir do sistema imune. A presença de alguns receptores e moléculas (“checkpoints”) imunes pode induzir a liberação de sinais que atuam diretamente sobre as células de defesa, tanto de forma positiva (sinal estimulatório) favorecendo a apoptose, como de forma negativa (sinal inibitório) favorecendo o escape da célula alvo.

Uma vez que as células tumorais passam a expressar moléculas inibitórias a estes receptores comumente expressos nas células efectoras, ocorre à liberação de sinais capazes de bloquear o processo de ativação destas células, reduzindo ou até impossibilitando a exocitose das proteínas citolíticas ou a ativação do receptor Fas e da molécula Fas-L, favorecendo assim o desenvolvimento e manutenção das células tumorais (YANG et al, 2006; VERHAGE e SORENSEN, 2008).

Apesar do grande número de trabalhos já publicados avaliando a expressão de alguns destes receptores inibitórios em pacientes com outros tipos de neoplasias (HORLAD et al, 2016; REN, 2018; CHANG et al, 2018), ainda são escassos aqueles que avaliam essa expressão simultaneamente à expressão gênica das proteínas citolíticas. Tais estudos poderiam permitir a identificação de fatores que possam afetar e influenciar os mecanismos imunológicos frente às células tumorais de indivíduos com neoplasias linfoproliferativas. Em vista disso, este estudo teve como

objetivo avaliar e comparar a expressão gênica de proteínas citolíticas e receptores e moléculas inibitórias presentes na superfície celular dos LTC e células NK de pacientes diagnosticados com LNH e MM e em indivíduos saudáveis.

Desenvolvimento

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 *Neoplasias linfoproliferativas*

As neoplasias linfoproliferativas, são neoplasias hematológicas originadas a partir da proliferação anormal e malignizada de uma célula linfoide, como os linfócitos T, linfócitos B ou células NK. A malignização destas células pode ocorrer em qualquer ponto durante seu processo de diferenciação e maturação e, considerando a sua capacidade proliferativa, pode ocasionar o desenvolvimento de um quadro clínico agudo ou crônico. As linfoproliferações agudas são caracterizadas pelas leucemias agudas e os linfomas agressivos, enquanto que as crônicas compreendem às leucemias crônicas, os linfomas indolentes e o MM (ARMITAGE, 2005).

O linfoma foi inicialmente descrito como um tumor do tecido linfático em 1832, pelo médico inglês Dr. Thomas Hodgkin. Nos anos posteriores, percebeu-se que a doença de Hodgkin, como também era conhecida, apresentava algumas diferenças quanto às características morfológicas das células tumorais. Essas diferenças foram responsáveis pela subdivisão desta doença em linfoma de Hodgkin (LH), que compreendem 10% dos casos e o LNH, responsável pelos 90% restantes de linfomas (AISENBERG, 2000; SHANKLAND et al, 2012).

O LH é caracterizado pela presença de células multinucleadas de Reed-Sternberg e/ou mononucleares de Hodgkin, regularmente originárias da malignização dos linfócitos B, que se encontram imersas em um infiltrado de células inflamatórias e reativas, cuja principal característica é a presença de diferentes tipos celulares não neoplásicos, como linfócitos, eosinófilos, histiócitos, neutrófilos, plasmócitos e monócitos. Segundo a OMS, os LH podem ser subdivididos em 2 grupos: LH clássicos (esclerose nodular, celularidade mista, linfocítico predominante e depleção linfocitária) e LH com predomínio linfocitário nodular (ANSELL, 2015).

Por sua vez, o LNH pode se desenvolver pela malignização dos linfócitos T, B ou células NK, sendo que em 85% a 90% dos casos são associados à malignização dos linfócitos B, com ausência de células mononucleares de Hodgkin ou células multinucleares de Reed-Sternberg e redução no número de células inflamatórias

reativas e não neoplásicas presentes no tecido linfoide malignizado. De acordo com a OMS, esse subtipo de linfoma pode ainda ser subdividido em mais de 20 subtipos, conforme as características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genéticas (ARMITAGE et al, 2017; SWERDLOW et al, 2008).

Os LNH podem ser classificados clinicamente de acordo com a capacidade da proliferação da célula malignizada como indolente ou agressivo. O LNH indolente é caracterizado por apresentar células tumorais associadas a um baixo índice proliferativo, possibilitando a estes pacientes uma maior sobrevida quando comparados aos pacientes com LNH agressivo, cuja principal característica é o alto índice proliferativo das células neoplásicas associado a um pior prognóstico e evolução ao óbito se não diagnosticados e tratados imediatamente. Contudo, estes últimos apresentam melhor resposta ao tratamento e maior possibilidade de cura quando precocemente diagnosticados e/ou adequadamente tratados (SÁNCHEZ-BEATO et al, 2003). A tabela 01 apresenta as principais características destes dois tipos de LNH.

Tabela 01 - Caracterização de linfoma não-Hodgkin indolente e agressivo

LNH indolente	LNH agressivo
Quadro clínico crônico	Quadro clínico agudo
Baixo índice proliferativo	Alto índice proliferativo
Células neoplásicas pequenas	Células neoplásicas grandes
Formação de grandes massas tumorais nos linfonodos ou regiões extranodais	Linfonodomegalias localizadas
Baixa agressividade	Alta agressividade

Fonte: ZAGO et al, 2014

Fonte: Modificado pela autora, 2018

O MM, por sua vez, é uma neoplasia caracterizada pela proliferação anormal e desregulada de plasmócitos produtores e secretores de imunoglobulinas, originários dos linfócitos B da medula óssea. Estes plasmócitos anormais secretam imunoglobulinas monoclonais anômalas e em excesso, e promovem a ativação de osteoclastos. Uma vez ativados, os osteoclastos causam destruição óssea e outras

alterações fisiopatológicas, como: falência renal, supressão da hematopoese e maior risco de infecções (KYLE et al, 2003; PAULA e SILVA et al, 2009).

Sua incidência é mais prevalente em indivíduos com idade superior a 50 anos. Ao contrário do LH e LNH, cujos pacientes podem obter a cura da doença após a realização de tratamentos quimioterápicos, não existe cura para o MM. Estes pacientes são submetidos a diversas formas de tratamento, como a quimioterapia e transplante de medula óssea, para promover o aumento da sobrevida e melhorar a qualidade de vida (ÁSTER, 2005; THE LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY, 2018).

2.1.2 Resposta imune contra as células tumorais

A imunidade mediada por células é o principal mecanismo de ação do organismo contra as células tumorais e/ou infectadas por vírus. As principais células envolvidas neste processo são os LTC e as células NK. Ambas são capazes de reconhecer as células tumorais através de receptores expressos em suas membranas citoplasmáticas, tornando-se ativadas e capazes de induzir sua morte por apoptose (KONJEVIC et al, 1999; ALMEIDA-OLIVEIRA e DIAMOND, 2008; MALMBERG et al, 2017).

Os LTC são capazes de reconhecer as células tumorais, após a formação da sinapse imunológica, por meio de um complexo de receptores específicos expressos em sua superfície, denominado complexo de receptores de células T (TCR, do inglês *T complex receptor*). Este complexo é capaz de reconhecer as moléculas formadoras do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) que são expressos na superfície celular, inclusive de algumas células tumorais, iniciando assim, a liberação de sinais estimulatórios que atuarão sobre os LTC. Simultaneamente à ligação dos receptores TCR e MHC, ocorre a liberação de um segundo sinal inespecífico e necessário, resultante da ligação entre os receptores CD86 e CD28, expressos respectivamente na superfície das células tumorais ou apresentadoras de antígenos e LTC, para que o reconhecimento e ativação dos LTC sejam completos. Este segundo par de receptores coestimulatórios atuará promovendo a liberação de sinais estimulatórios secundários que intervêm diretamente sobre os LTC, favorecendo estas células a

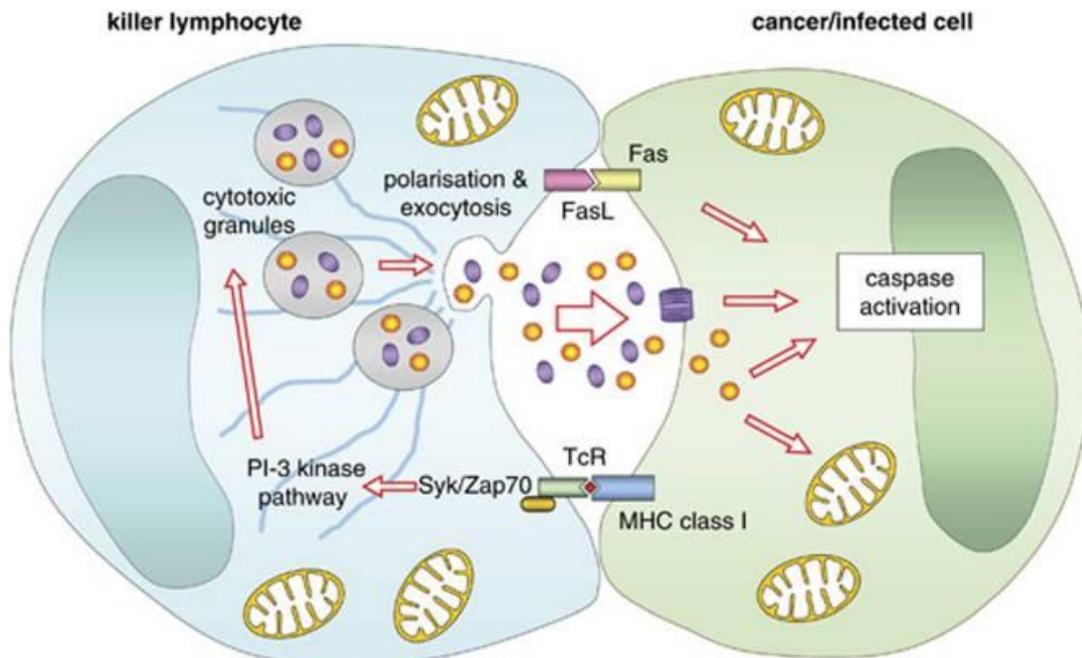
produzirem fatores de crescimento e citocinas necessárias para o seu processo de ativação (GREENFIELD et al, 1998; WANG, 2004).

Por sua vez, devido à ausência dos receptores TCR na superfície das células NK e da não necessidade destas células serem sensibilizadas previamente, o processo de reconhecimento das células tumorais por estas últimas ocorre por intermédio de diferentes receptores de células assassinas semelhantes a imunoglobulinas (KIR, do inglês *killer immunoglobulin-like receptors*). Estes receptores serão ativados ou inibidos de acordo com a ausência ou presença dos receptores MHC na superfície das células tumorais, apresentando assim função estimulatória ou inibitória, variável conforme o subtipo do receptor que foi ativado. Em condições normais, as células expressam em sua superfície o complexo MHC-I que se liga aos receptores KIR de ação inibitória expressos na superfície das células NK. Esta ligação promove a liberação de sinais inibitórios que atuam diretamente sobre as células NK, impedindo que estas se tornem ativadas.

Em contrapartida, as células tumorais por apresentarem baixa expressão ou expressão ausente do complexo MHC-I em sua superfície como um possível mecanismo de evasão tumoral contra a resposta de LTC, promovem a ativação dos receptores KIR estimulatórios expressos nas células NK favorecendo a ativação destas células efectoras (TORREZINI e ANTHONAZIO, 2008; COLUCCI e TRATHERNE, 2017).

Os LTC e as células NK possuem dois principais mecanismos de defesa contra as células tumorais. O primeiro mecanismo ocorre pela exocitose de proteínas citolíticas sobre as células tumorais, como a perforina, uma proteína disruptora de membrana e granzima B, uma serino-protease, presentes no interior de grânulos citolíticos, enquanto que o segundo mecanismo de ação envolve a ligação de receptores de morte celular, como Fas (CD95) e sua molécula ligante expressa na membrana das células efectoras (Fas-L) (VAN ELSAS et al, 2001; PIPKIN et al, 2010; VOSKOBOINIK et al, 2015) (Figura 01).

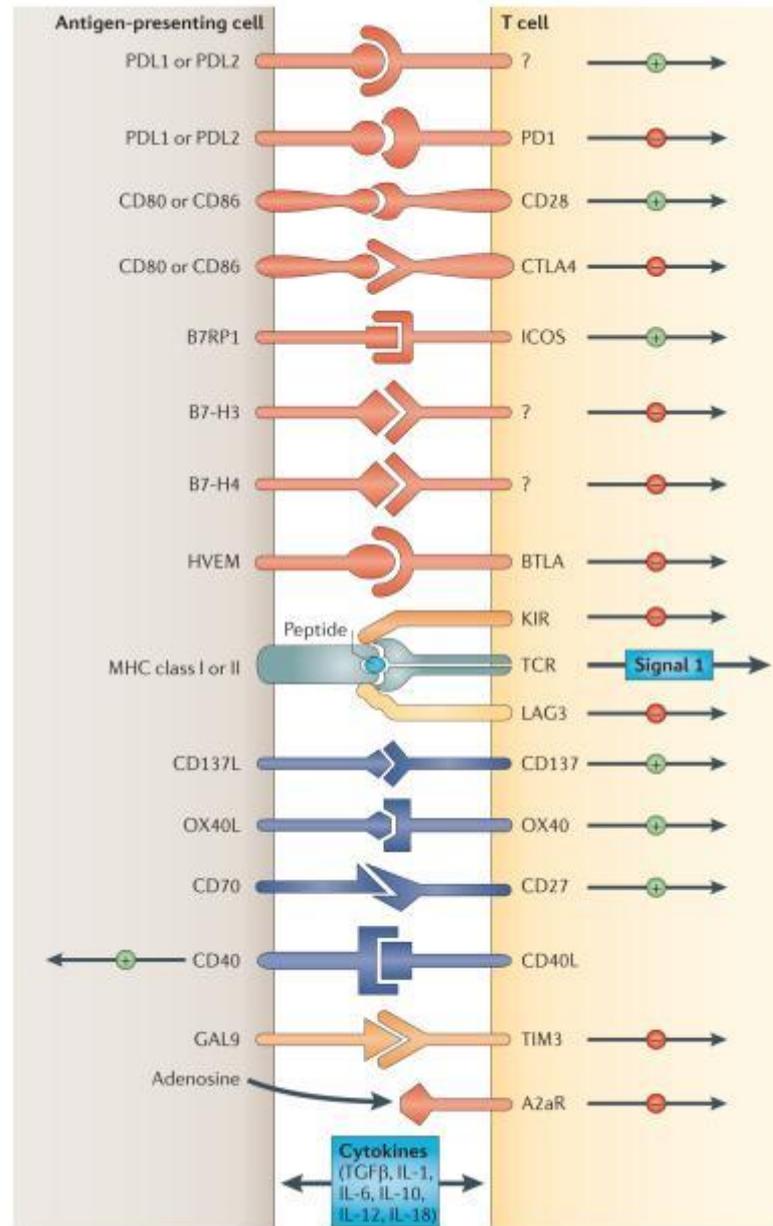
Figura 01 - Mecanismo de ação das células NK e LTC contra uma célula tumoral ou infectada por vírus, pela exocitose de grânulos citolíticos e/ou via Fas/Fas-L.



Fonte: TRAPANI, 2012.

Simultaneamente à expressão de receptores que atuam na ativação dos LTC e células NK, também são expressos um conjunto de receptores e outras moléculas que são responsáveis por induzir cascatas de sinalizações intracelulares positivas (estimulatórias) ou negativas (inibitórias), conforme a ausência ou presença das células tumorais, respectivamente. Estes receptores são conhecidos como “checkpoints imunológicos” (Figura 02).

Figura 02 - Expressão de receptores “checkpoints imunológicos” e apresentação de sinais estimulatórios (verde) e inibitórios (vermelho).



Fonte: PARDOLL, 2012.

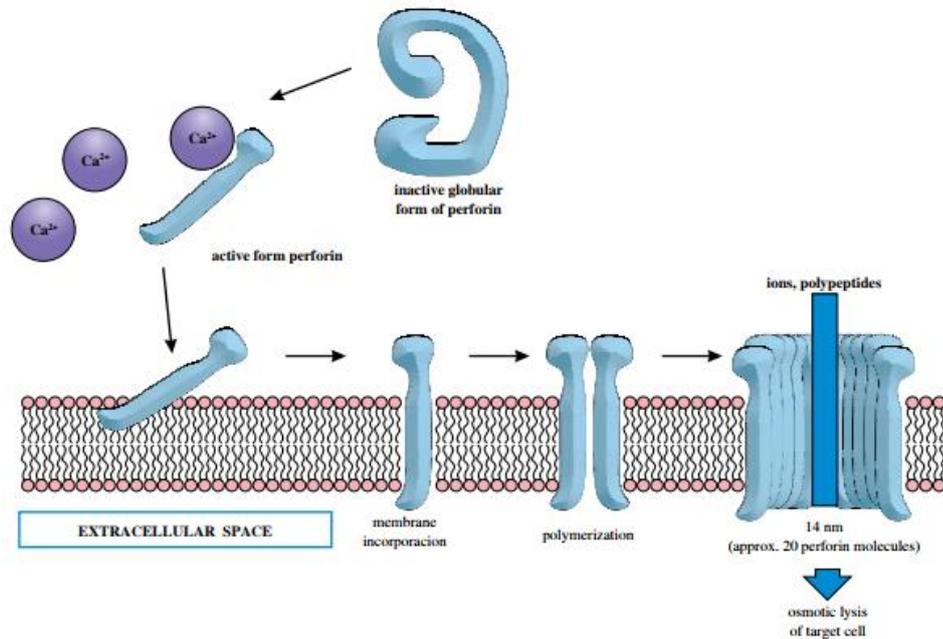
Na ausência de células tumorais, estes receptores têm como finalidade atuar na autorregulação, controlando o processo de ativação celular para eliminar as células T autoreativas e evitar a destruição de células saudáveis. Para tal, estes receptores são capazes de promover uma regulação negativa, a partir da liberação de sinais inibitórios, que ao se associarem aos receptores ligantes em simultâneo à

ativação dos LTC e células NK. Em contrapartida à regulação da ativação das células efectoras, esses receptores podem atuar de forma negativa sobre as células efectoras. Esse é um dos mecanismos utilizados pelas células tumorais como um mecanismo de evasão do sistema imunológico, a fim de promover a manutenção destas células no organismo e conseqüentemente favorecer o processo de metástases (KIM e KIM, 2018). Neste cenário, as células tumorais passam a expressar em sua superfície receptores e moléculas ligantes que são capazes de se associar aos receptores inibitórios dos LTC e células NK. Uma vez que ocorre esta ligação, esses receptores promovem a liberação de sinais inibitórios que atuam diretamente sobre os LTC e células NK, impedindo que estas células tornem-se capazes de reconhecer as células tumorais e de se tornarem ativas para induzir a apoptose das mesmas.

2.1.3 *Perforina, granzima B e ligação Fas/Fas-L*

A perforina, proteína descrita pela primeira vez em 1984, é considerada uma ferramenta essencial para a resposta citotóxica das células efectoras frente às células-alvo. Esta proteína é encontrada na forma de monômeros no interior de grânulos citolíticos presentes no citoplasma de diferentes células, como LTC e células NK de camundongos, ratos e seres humanos, e quando liberadas na fenda sináptica estes monômeros sofrem polimerização devido às altas concentrações de cálcio extracelulares, favorecendo a formação de poros na membrana das células tumorais. Os poros recém-formados permitirão a entrada de granzima B no citoplasma das células-alvo, favorecendo também a entrada de outros compostos, como íons e polipeptídeos (PODACK e KONIGSBERG, 1984; TSCHOPP e NABHOLZ, 1990). Por fim, a presença de vários poros de perforina promove a perda da integridade da membrana da célula tumoral, facilitando o processo de morte da célula alvo por desequilíbrio osmótico (Figura 03) (OSINSKA et al, 2014; WILLENBRING e JOHNSON, 2017).

Figura 03 - Formação dos poros de perforina na membrana citoplasmática das células tumorais (adaptado).



Fonte: OSÍNSKA, 2014.

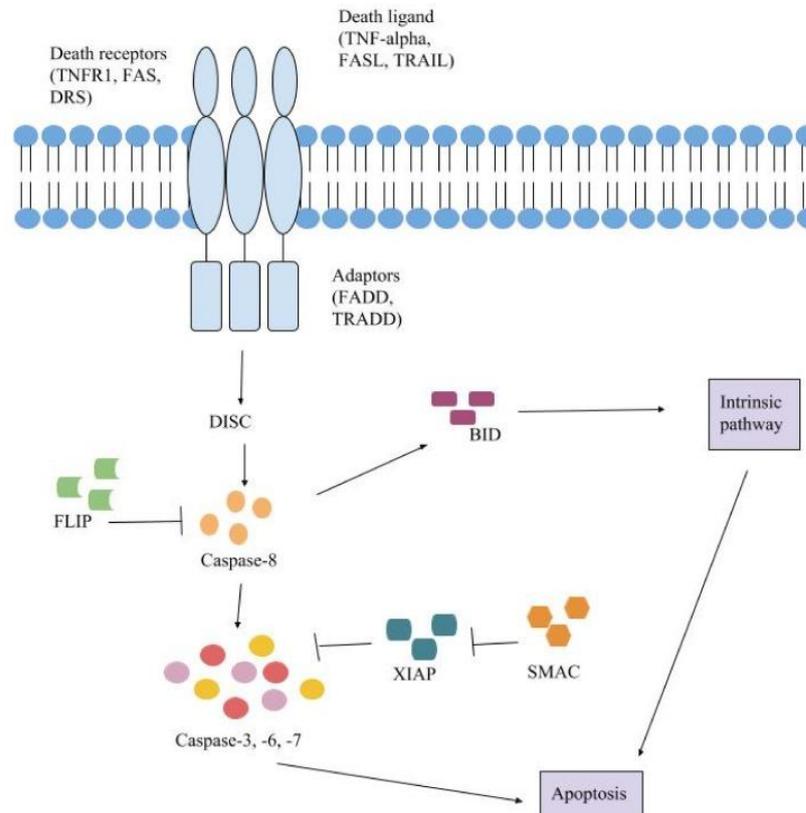
A proteína perforina é considerada essencial para imunidade contra o câncer, uma vez que foi observado o desenvolvimento de células tumorais pela inibição ou pela mutação dos genes responsáveis pela produção de perforina. Estudos em camundongos nocaute para o gene que codifica esta proteína demonstraram que estes animais foram até 1.000 vezes mais susceptíveis do que os animais imunocompetentes para malignidades transplantadas e induzidas, predominantemente as de origem hematológica (VAN DEN BROEK et al, 1996; SMYTH et al, 2000; DADI et al, 2016).

A granzima B, uma das cinco proteínas da família de serino proteases, tem como principal mecanismo de ação induzir o processo de clivagem do DNA e condensação da cromatina da célula tumoral, por meio da ativação da via das caspases clássicas, dos tipos dependente e independente (Figura 04). Na via dependente, a granzima B promove a ativação direta das caspases 3 e 7 após a clivagem das suas pró-caspases. Uma vez ativadas, serão responsáveis pela clivagem da desoxirribonuclease ativada (CAD) que atuará na fragmentação do DNA, levando a célula à apoptose. Na via independente, a granzima B atua na

transplantados (HEUSEL et al, 1994; SHRESTA et al, 1999; MULLBACHER et al, 1999; REVELL et al, 2005; VOSKOBOINIK et al, 2015). Em humanos, nenhuma doença encontra-se associada à deficiência de granzima B.

O segundo mecanismo para a indução da apoptose das células tumorais ocorre pela ativação do receptor de morte celular, Fas (CD95) e de sua molécula ligante Fas-L (Figura 05). O Fas é uma glicoproteína transmembrana tipo 1, expresso em diversas células do organismo, inclusive em células tumorais, caracterizado por apresentar três domínios extracelulares de cisteína e um domínio intracelular. Sua expressão pode ser induzida pela secreção de citocinas, como o IFN- γ e TNF- α , ou pela ativação dos linfócitos. Por sua vez, a molécula Fas-L é uma proteína transmembrana classificada como proteína tipo II da família TNF, podendo ser encontrada sob a forma solúvel e também expresso na superfície celular de células citotóxicas, como os LTC, as células NK e os macrófagos. Na ausência das células tumorais, estes receptores são capazes de induzir a homeostasia por meio da apoptose de linfócitos T autorreativos. Porém, na presença das células tumorais, estes receptores atuam promovendo a apoptose destas células através da via extrínseca (KIM et al, 2004; PFEFFER e SINGH, 2018).

Figura 05 - Via extrínseca de apoptose por ativação dos receptores Fas/Fas-L.



Fonte: PFEFFER e SINGH, 2018

Nesta via, a interação entre os receptores Fas e Fas-L induz o recrutamento e interação de proteínas adaptadoras FADD (do inglês, *Fas-associated death domain*) ou TRADD (do inglês, *TNF receptor-associated death domain*) a partir dos domínios DD (do inglês, *death domain*) presentes em ambas as moléculas. Subsequentemente, as proteínas adaptadoras promovem o recrutamento das pró-caspases 8 e 10 que interagem com o domínio DED (do inglês, *death-effector domain*), formando o complexo DISC (do inglês, *death-inducing signaling complex*). Este complexo é responsável pela ativação e clivagem destas pró-caspases e posteriormente pela ativação de uma cascata de sinalização intracelular, induzindo a apoptose da célula (PFEFFER e SINGH, 2018).

Em relação à essa via de morte celular, foi observado que pacientes com câncer de mama em estágios precoces da doença apresentam elevados níveis de expressão gênica de Fas em comparação a mulheres saudáveis (JABERIPOUR et al, 2010).

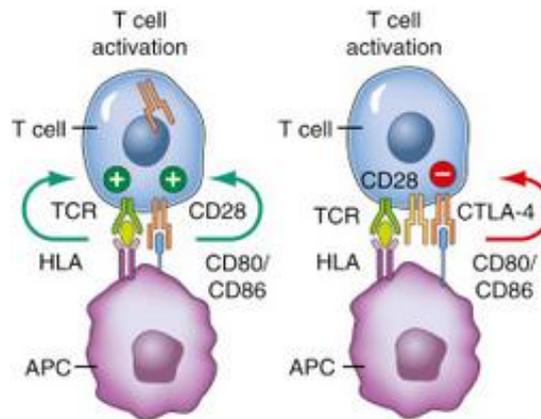
2.1.4 Mecanismos de escape tumoral: receptores inibitórios

Estudos recentes demonstram que as células tumorais são capazes de modificar a resposta imune através da expressão e ativação de receptores inibitórios, os “checkpoints imunológicos”, que induzem as células efectoras à exaustão funcional e irresponsividade, favorecendo assim o desenvolvimento e manutenção das células tumorais (BAITSCH et al, 2012; KARACHALIOU et al, 2015).

A proteína associada a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4, do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*), também conhecido como CD152, que foi o primeiro *checkpoint* imunológico clinicamente avaliado, é uma proteína de membrana tipo I, expressa na superfície celular dos LTC e homóloga a CD28 (Figura 06). As células tumorais expressam ligantes para este receptor como um dos seus mecanismos de evasão, a fim de evitar a ativação das células efectoras, através de dois mecanismos distintos. Um dos mecanismos ocorre pela sinalização negativa em resposta à ativação do TCR nas fases iniciais da resposta imune, pelo processo de competição entre os receptores CTLA-4 e CD28 pela ligação ao receptor CD80/CD86. Em ambos os mecanismos, ocorre a liberação de sinais inibitórios que atuam na regulação negativa dos LTC em estágios precoces de proliferação, levando estas células a um processo de anergia e/ou baixa atividade proliferativa.

Estudos anteriores demonstram que as células tumorais CTLA-4 positivas de pacientes com câncer de mama são capazes de suprimir a maturação e a funcionalidade de células citotóxicas, prejudicando a resposta imune contra o tumor (LINSLEY et al, 1994; LINSLEY et al, 1996; CARRENO et al, 2000; CHEN et al, 2017).

Figura 06 - Expressão do receptor CTLA-4 e seu mecanismo de ação.

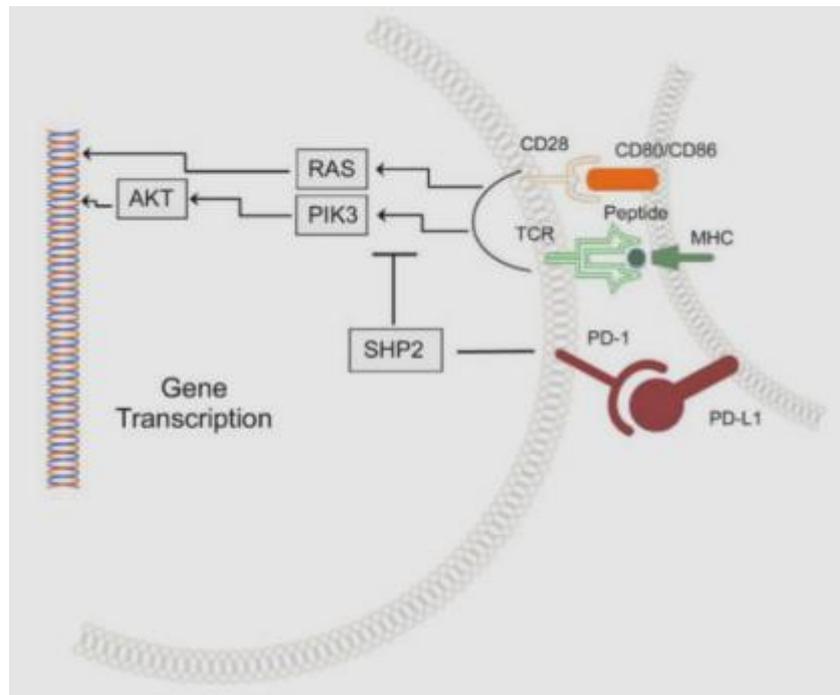


Fonte: BELL et al, 2018

Outro receptor com ação inibitória é o receptor de morte programada 1 (PD-1, do inglês *programmed death-1*). Este receptor é comumente expresso na superfície celular de linfócitos B, linfócitos T e células NK, atuando como um dos principais receptores inibitórios na regulação da ativação dos linfócitos T (Figura 07).

Assim como o receptor CTLA-4, o PD-1 também apresenta grande importância na resposta imune contra neoplasias. Sabe-se que as células tumorais são capazes de expressar em sua superfície moléculas ligantes a PD-1, conhecidos como ligante do receptor de morte programada 1 (PD-L1, do inglês *programmed death-ligand 1*), como um mecanismo de resposta às citocinas inflamatórias previamente secretadas pelas células efectoras. A associação deste receptor com o seu ligante promove o recrutamento das fosfatases SHP-1 e SHP-2, que atuam diminuindo o sinal do TCR e promovendo a liberação de sinais inibitórios que atuam diretamente sobre os LTC e células NK, inibindo sua ação citotóxica sobre as células tumorais. Este sistema já foi previamente descrito na literatura e associado com diversos tipos de câncer, inclusive os cânceres hematológicos, como os linfomas de células T e linfomas de células NK (SPRANGER e SPAAPEN, 2013; CHEN, 2014; TAUBE et al, 2014; BUCHBINDER e DESAIA, 2016; LIAO et al, 2018).

Figura 07 - Receptor PD-1/PD-L1 e seu mecanismo de atuação.



Fonte: MARGOLIN, 2014

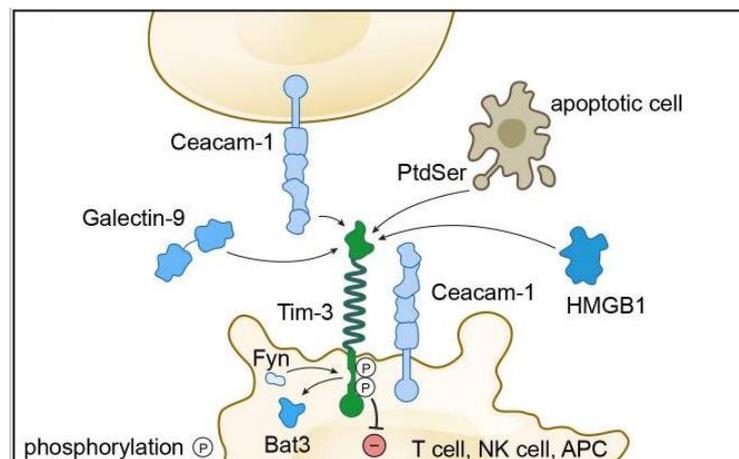
Estudos clínicos já foram bem caracterizados em relação ao bloqueio dos receptores de inibição CTLA-4 e PD-1 em pacientes oncológicos, permitindo inclusive o desenvolvimento de novas imunoterapias associadas a anticorpos monoclonais anti-CTLA-4 (Ipilimumab®) e anti-PD-1 (Nivolumab®), disponíveis a portadores de melanoma refratários aos tratamentos quimioterápicos de primeira linha.

Porém, mesmo após o desenvolvimento destas terapias que visam reestabelecer a função efetora de LTC e células NK, existem pacientes cuja resposta terapêutica não é satisfatória. Com isso, deve-se levar em consideração a presença de outros receptores inibitórios que podem atuar na manutenção das células tumorais no organismo.

A proteína TIM-3 (do inglês *T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*) é uma proteína de transmembrana do tipo I, constituída por um domínio variável de imunoglobulina intracelular, um domínio de mucina glicosilado extracelular e um domínio único de transmembrana (Figura 08). Este receptor é comumente expresso na superfície dos linfócitos T e seus subtipos, inclusive os LTC

e células NK e em células mieloides, sendo também encontrado na superfície celular de células tumorais, incluindo leucemias mieloides, sarcoma, câncer gástrico e osteossarcoma. Na presença das células tumorais, a ativação deste receptor promoverá a fosforilação em sua porção citoplasmática e acarretará na liberação de sinais inibitórios que bloqueiam a via de sinalização gerada pela ativação dos complexos TCR/MHC-II e CD28/CD86. Este receptor é relevante para o prognóstico de pacientes com linfomas de células B e leucemias mieloides agudas, uma vez que sua expressão está diretamente associada ao pior prognóstico destes pacientes. Além disso, pode atuar simultaneamente com o receptor PD-1, acentuando suas funções inibitórias, principalmente nos LTC (HUANG et al, 2010; ZHOU et al, 2011; ANDERSON, 2014; KONG et al, 2015; OCANÃ-GUZMAN et al, 2016).

Figura 08 – Receptor TIM-3 e seus ligantes (adaptado).



Fonte: ANDERSON et al, 2016

Por fim, existe ainda a proteína RING-CH-1 associado à membrana de ligase da ubiquitina (MARCH-1, do inglês *membrane associated RING-CH*), pertencente à família das ligases de ubiquitina E3 do tipo 3RING. Esta proteína é normalmente expressa na superfície de células linfoides e dendríticas, apresentando como principal função a regulação da expressão do complexo MHC-II, CD86 e outras glicoproteínas na superfície dessas células. Alterações na expressão desta proteína são capazes de modificar a expressão do complexo MHC-II na superfície de células apresentadoras de antígenos, ocasionando possíveis alterações na resposta imune. Estudos *in vivo*, mostraram que esta proteína é capaz de promover o processo de

ubiquitinização e down-regulation quando interage com o receptor CD86, favorecendo sua internalização e degradação, reduzindo conseqüentemente a resposta imune frente a células tumorais ou infectadas por vírus ou bactérias. A expressão desta proteína foi associada anteriormente a algumas doenças, como o diabetes tipo 2 e infecções bacterianas (BARTEE et al, 2004; CORCORAN et al, 2011; BOURGENOIS-DAIGNEAULT e THIBODEAU, 2012).

2.2 JUSTIFICATIVA

A importância da expressão gênica das proteínas citolíticas presentes no interior de grânulos dos LTC e células NK já foi bem caracterizada na atuação da resposta imunológica frente às células tumorais ou previamente infectadas por vírus (VOSKOBOINIK et al, 2015).

Estudos demonstram a baixa expressão de perforina e granzima B em tecidos tumorais de câncer de pulmão em comparação a tecidos saudáveis, enquanto que a elevada expressão destas proteínas foi associada a outras patologias como a linfocitose hemofagocítica (MELLOR-HEINEKE et al, 2013). Em estudo anterior realizado nos Laboratórios de Pesquisas Hematológicas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, foi observado que pacientes com LNH que possuíam maior expressão gênica granzima B e menor expressão proteica de perforina nas células NK quando comparados com indivíduos saudáveis. Pacientes com expressão gênica reduzida de perforina e granzima B apresentaram menores faixas de sobrevida (SOUZA et al, 2018).

A divergência da resposta imunológica frente ao câncer está associada à capacidade de ativação das células efectoras e aos diferentes mecanismos de escape pelo qual as células tumorais utilizam para evitar a apoptose. Atualmente, os receptores inibitórios tornaram-se alvo de diferentes estudos que avaliam a sua influência no desenvolvimento do tumor.

Estudo demonstra a elevada expressão destes receptores em células T no microambiente tumoral de LNH associada à capacidade das células tumorais na imunossupressão da resposta imunológica, favorecendo o desenvolvimento das células tumorais (JOSEFFERSON et al, 2019).

Considerando a importância das proteínas citolíticas e dos receptores inibitórios no processo de ativação de LTC e células NK, nota-se a importância de avaliar a expressão destes receptores inibitórios no sangue periférico e em simultâneo à expressão das proteínas citolíticas a fim de investigar todos os fatores que possam afetar os mecanismos imunológicos frente às células tumorais de pacientes com LNH e MM.

2.3 HIPÓTESES

Levantamos a hipótese de que os pacientes com neoplasias linfoproliferativas apresentam menor expressão gênica das proteínas citolíticas e dos receptores de ativação das células efectoras e maior expressão gênica dos receptores inibitórios quando comparados aos indivíduos saudáveis.

2.4 OBJETIVOS

2.4.1 Objetivo geral

Analisar a expressão de genes envolvidos na inibição e ativação de células NK e LTC e na produção de proteínas citolíticas utilizadas por estas células na defesa imunológica contra as células tumorais de pacientes com LNH e MM.

2.4.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- 1.) Quantificar e comparar a expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1, Fas, Fas-L e CD86 em pacientes com LNH e MM.
- 2.) Quantificar e comparar a expressão gênica de perforina e granzima B em pacientes com LNH e MM.
- 3.) Correlacionar a expressão gênica dos receptores inibitórios com a expressão gênica das proteínas citolíticas.
- 4.) Analisar a expressão gênica com a sobrevida nos pacientes com LNH e MM.

2.5 METODOLOGIA

2.5.1 Casuística

Este estudo analítico do tipo caso-controle, de caráter biológico e observacional, foi desenvolvido com a participação consciente e voluntária de 27 (vinte e sete) pacientes com LNH e 18 (dezoito) pacientes com MM atendidos no Serviço de Onco-Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM). Também foram incluídos no estudo 34 (trinta e quatro) indivíduos saudáveis para compor o grupo controle dos experimentos.

2.5.1.1 Critérios de inclusão para pacientes

- 1.) Diagnóstico de LNH ou MM no HC-UFTM.
- 2.) Possuir mais de 18 anos.

2.5.1.2 Critérios de exclusão para pacientes

- 1.) Ter realizado tratamento quimioterápico antes da abordagem pela equipe de pesquisadores.

2.5.1.3 Critérios de inclusão para grupo controle

- 1.) Possuir mais de 18 anos

2.5.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle

- 1.) Possuir histórico de neoplasias, doenças autoimunes ou infecciosas crônicas ou ativas no momento da inclusão no estudo.

2.5.2 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, via Plataforma Brasil sob o número de parecer 2.555.435 (CAAE 70610416.9.0000.5154) (Anexo 01).

2.5.3 Coleta de sangue periférico e preparação das amostras

Após a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido e sua aceitação pelos participantes selecionados, foram coletados 10mL de sangue periférico por meio de punção venosa em tubos de coleta contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A coleta da amostra biológica nos pacientes com LNH e MM foi realizada após a confirmação do diagnóstico e antes que os pacientes iniciassem o protocolo padrão de tratamento quimioterápico, caso este fosse solicitado pelo médico responsável.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisas Hematológicas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM para o seu processamento. No laboratório, os tubos de sangue foram centrifugados à 2.500g por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi coletado 500µL da camada de células intermediárias de *buffy coat* formada entre o plasma e as hemácias, que foi armazenada em freezer -80°C após a adição 500µL da solução estabilizadora RNA later solution (Ambion®, Austin, EUA).

2.5.4 Avaliação da expressão gênica

2.5.4.1 *Extração do ácido ribonucleico (RNA)*

A extração do RNA foi realizada utilizando o kit de extração SV Total RNA Isolation System® (Promega, Madison, EUA), seguindo as especificações do fabricante.

Para o protocolo de extração, inicialmente foi realizado o descongelamento das células previamente coletadas e armazenadas na solução estabilizadora. Em seguida, esse material foi centrifugado a 400g por 5 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Após a centrifugação, foi adicionado um volume de

1mL da solução “Red Blood Cell Lysis” e realizada novamente a etapa de centrifugação a 400g por 5 minutos.

Posteriormente, foi adicionado ao pellet residual pós-centrifugação 175µL da solução de “RNA Lysis Buffer” e 350µL de “RNA Dilution Buffer”. Em seguida, foi realizada uma homogeneização manual, com o auxílio de uma pipeta e inversão do tubo. Os tubos foram então mantidos em banho-maria a 70°C por 3 minutos e centrifugados a 12.000g por 10 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo sobrenadante transferido a novos tubos estéreis.

A seguir, foi realizada a transferência da solução recém lisada para tubos de microcentrífuga. Foram adicionados 200µL de etanol 95%, seguido de sucessivas homogeneizações manuais para promover o isolamento do RNA oriundo dos leucócitos totais. Após a homogeneização, o conteúdo dos tubos foi transferido para colunas de membrana de sílica que foram centrifugadas a uma velocidade de 12.000g por 1 minuto em temperatura ambiente. O eluato foi descartado e em seguida foram adicionados 600µL de “RNA Wash Solution” no interior da coluna para a realização de uma nova etapa de centrifugação nas mesmas condições da anterior. O eluato foi descartado e em seguida, foi adicionado 50µL da solução “DNase” composta de 40µL de “Yellow Core Buffer”, 5µL de “0,09M de $MnCl_2$ ” e 5µL de “enzima DNase I”, diretamente na membrana da coluna. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e após a incubação, foram adicionados 200µL “DNase Stop Solution” na coluna e este material centrifugado a 12.000g por 1 minuto em temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, todo o volume presente no interior dos tubos foi descartado.

Foi então realizada a adição de 250µL de “RNA Wash Solution”, seguida de uma etapa de centrifugação a 14.000g por 2 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as colunas utilizadas nesta metodologia foram transferidas para novos tubos de eluição estéreis e foram acrescentados 100µL de água livre de nuclease diretamente na membrana. Por fim, foi realizada uma última etapa de centrifugação a 12.000g por 1 minuto à temperatura ambiente. As colunas foram descartadas e as amostras de RNA extraído foram armazenadas em freezer -80°C.

2.5.4.2 *Transcrição reversa*

Posteriormente à extração do RNA dos leucócitos totais, foi realizado a transcrição reversa do material recém-obtido, utilizando-se o kit High-Capacity cDNA Archive Kit, seguindo as orientações do fabricante (Applied Biosystems®, Foster City, EUA).

A reação de transcrição reversa foi caracterizada pela formação de um mix incluindo 2µL de 10X RT Buffer, 0,8µL de 25X dNTP Mix (100mM), 2,0µL de 10X RT Random Primers, 1,0µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase e 4,2µL de Nuclease-free H₂O. Posteriormente, foram adicionados o volume de 10µL do mix recém preparado e 10µL de RNA total de cada amostra em tubos de PCR. Em seguida, os tubos foram alocados no interior do aparelho Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) nas seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C por tempo indeterminado.

2.5.4.3 *PCR quantitativa (qPCR)*

Após a extração do RNA e transcrição reversa desse material em DNA complementar (cDNA), foi realizada a quantificação dos genes de interesse utilizando-se sondas TaqMan (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) por PCR em tempo real. Também foi avaliada a expressão do gene de referência β-actina, com o objetivo de normalizar os valores obtidos, uma vez que este gene é constitutivamente expresso nas células humanas. A quantificação dos genes de interesse foi realizada conforme as orientações do fabricante e segundo as recomendações descritas na literatura (BUSTIN et al, 2009).

Tabela 02 - Lista de códigos das sondas TaqMan utilizadas no experimento.

Gene de interesse	Código das sondas TaqMan
Perforina	<i>Hs00169473_m1</i>
Granzima B	<i>Hs01554355_m1</i>
PD-1	<i>Hs01550088_m1</i>
PD-L1	<i>Hs00204257_m1</i>
Fas	<i>Hs00236330_m1</i>
Fas-L	<i>Hs00181226_g1</i>
CTLA-4	<i>Hs00175480_m1</i>
CD86	<i>Hs01567026_m1</i>
TIM-3	<i>Hs00958618_m1</i>
MARCH-1	<i>Hs00991123_m1</i>
β -actina	<i>Hs99999903_m1</i>

Fabricante Applied Biosystems®, Foster City, EUA

Em uma capela de fluxo laminar foi realizada a preparação do mix necessário para a quantificação gênica dos genes de interesse com a utilização do kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Em tubos estéreis específicos para cada sonda, foram adicionados 5,0 μ L de master mix e 0,5 μ L de sondas TaqMan (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) para a realização cada ensaio referente às sondas TaqMan de interesse. Em seguida, foi realizado a montagem das placas de qPCR, adicionando-se 4,5 μ L de cDNA diluídos em 1/30 de cada paciente e indivíduo saudável analisado e 5,5 μ L de mix recém produzido para cada gene de interesse.

Posteriormente, as placas foram seladas com selos adesivos transparentes MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) e levadas ao termociclador em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, EUA).

2.5.4.4 *Análise Estatística*

Os dados contendo os valores de CT das reações de amplificação gênica realizada pelo ensaio de qPCR foram organizados em planilha no software Excel (Microsoft, USA). Os valores de expressão gênica foram calculados pelo método de quantificação relativa (RQ) da transcrição do mRNA alvo e calculada por $2^{-\Delta CT}$, sendo $\Delta CT = CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{beta-actina}}$.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism, San Diego, EUA). Após a aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Simov e a observação de distribuição não-normal das amostras, os cálculos de comparação entre as medianas de ΔCT entre dois grupos foram realizados utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Os cálculos de comparação entre três grupos foram realizados pelo teste Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os cálculos de correlação realizados pelos testes de Spearman entre duas variáveis apresentaram distribuição não normal ($p \neq 0$). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Caracterização da população de pacientes e indivíduos saudáveis

A quantificação da expressão dos genes de interesse foi realizada em um grupo de 27 pacientes com LNH, sendo 13 do gênero masculino e 14 do gênero feminino, com idade variando de 23 a 97 anos (mediana de 67 anos) e em 18 pacientes com MM, sendo 09 do gênero masculino e 09 do gênero feminino, com idade de 38 a 83 anos (mediana de 68 anos). Ao considerar a capacidade proliferativa das células tumorais do LNH observamos que este grupo de pacientes foi composto por 08 pacientes com LNH indolente e 19 pacientes com LNH agressivo. Simultaneamente, foi avaliado um grupo de 34 indivíduos saudáveis, constituído por 17 homens e 17 mulheres, com idade de 28 a 76 anos (mediana de 60 anos) (Tabela 03).

Tabela 03 - Caracterização da população avaliada no estudo.

	LNH	MM	Indivíduos Saudáveis	Valor de p
Total	n (%) 27 (100%)	n (%) 18 (100%)	n (%) 34 (100%)	
Gênero				
- Feminino	14 (51,85%)	09 (50%)	17 (50%)	0,9879
- Masculino	13 (48,15%)	09 (50%)	17 (50%)	
Tipos de LNH				
- Indolente	08 (29,63%)	-	-	
- Agressivo	19 (70,37%)	-	-	
Idade (anos)				
Mediana (mín- máx)	67 (23-97)	68 (38-83)	60 (27-76)	0,0920

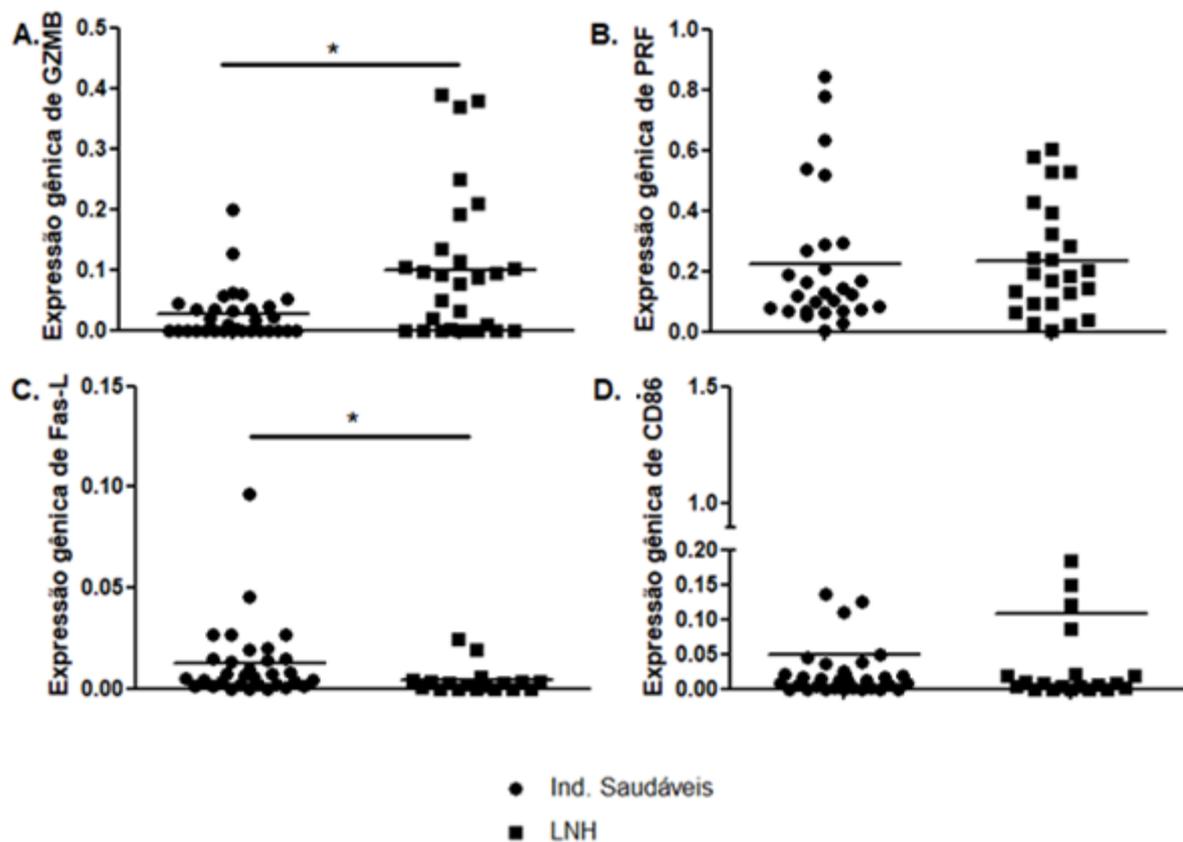
Legenda: LNH: linfoma não-Hodgkin; MM: mieloma múltiplo. Teste de Qui-Quadrado.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

2.6.2 Expressão gênica em LNH e indivíduos saudáveis

Os pacientes com LNH apresentaram níveis significativamente maiores de expressão gênica de granzima B ($p=0,0238$) e menores de Fas-L ($p=0,0066$), comparado aos indivíduos saudáveis. Não observamos diferenças significativas na expressão de perforina ($p=0,4684$) e CD86 ($p=0,6462$) entre os grupos (Figura 09).

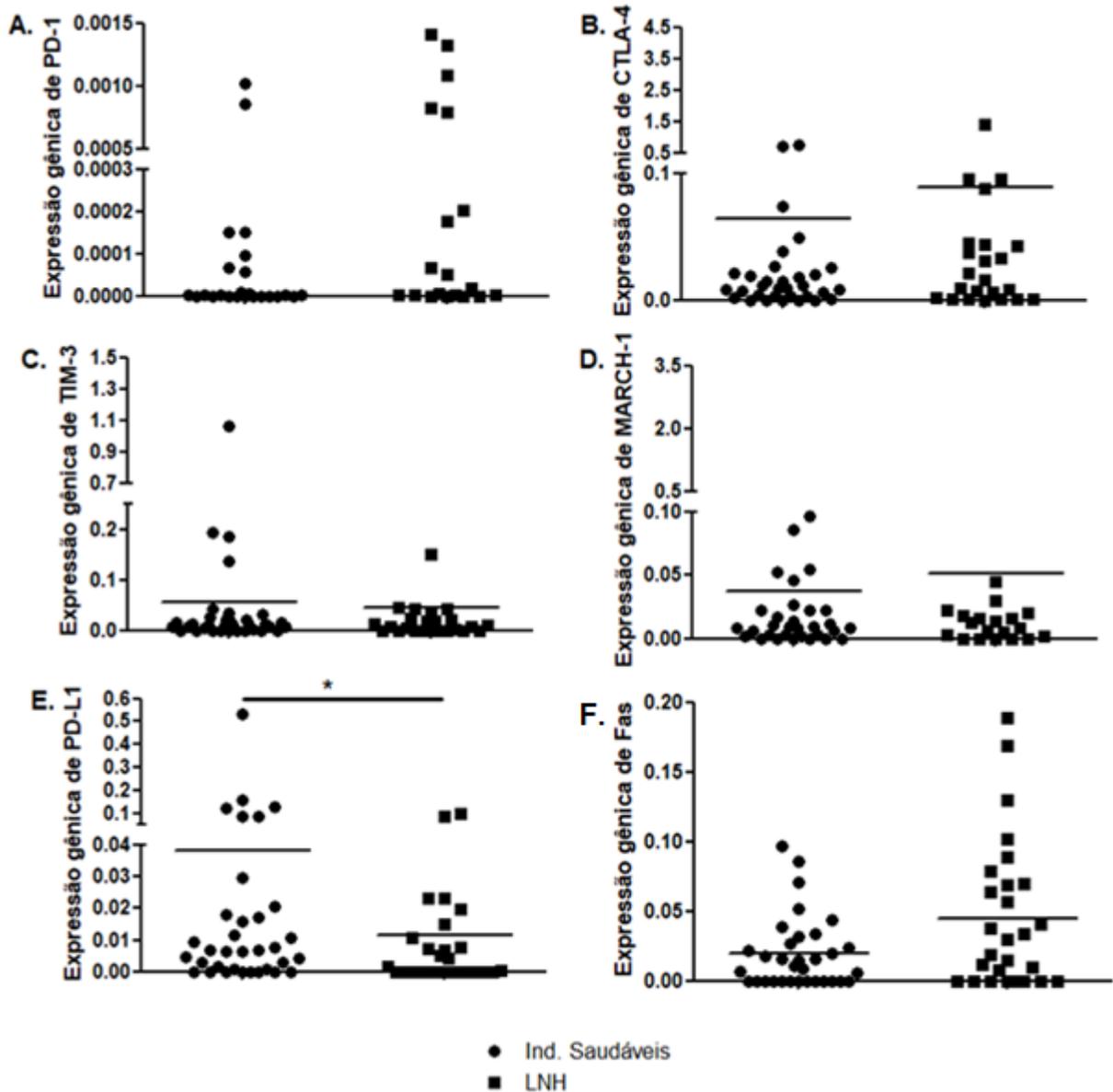
Figura 9 - Expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB), Fas-L e CD86 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e indivíduos saudáveis.



Teste Mann-Whitney. A. GZMB: $p=0,0238$; B. PRF: $p=0,4684$; C. Fas-L: $p=0,066$ e D. CD86: $p=0,6462$. Legenda: LNH – linfoma não-Hodgkin; PRF – perforina; GZMB – granzima B.
 Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

A avaliação da expressão gênica também demonstrou haver redução significativa na expressão de PD-L1 ($p=0,0423$). Em relação aos demais receptores avaliados, não foram encontrados diferenças significativas na expressão gênica de PD-1 ($p=0,3845$), CTLA-4 ($p=0,4904$), TIM-3 ($p=0,8638$), MARCH-1 ($p=0,8067$) e Fas ($p=0,0875$) entre os grupos (Figura 10).

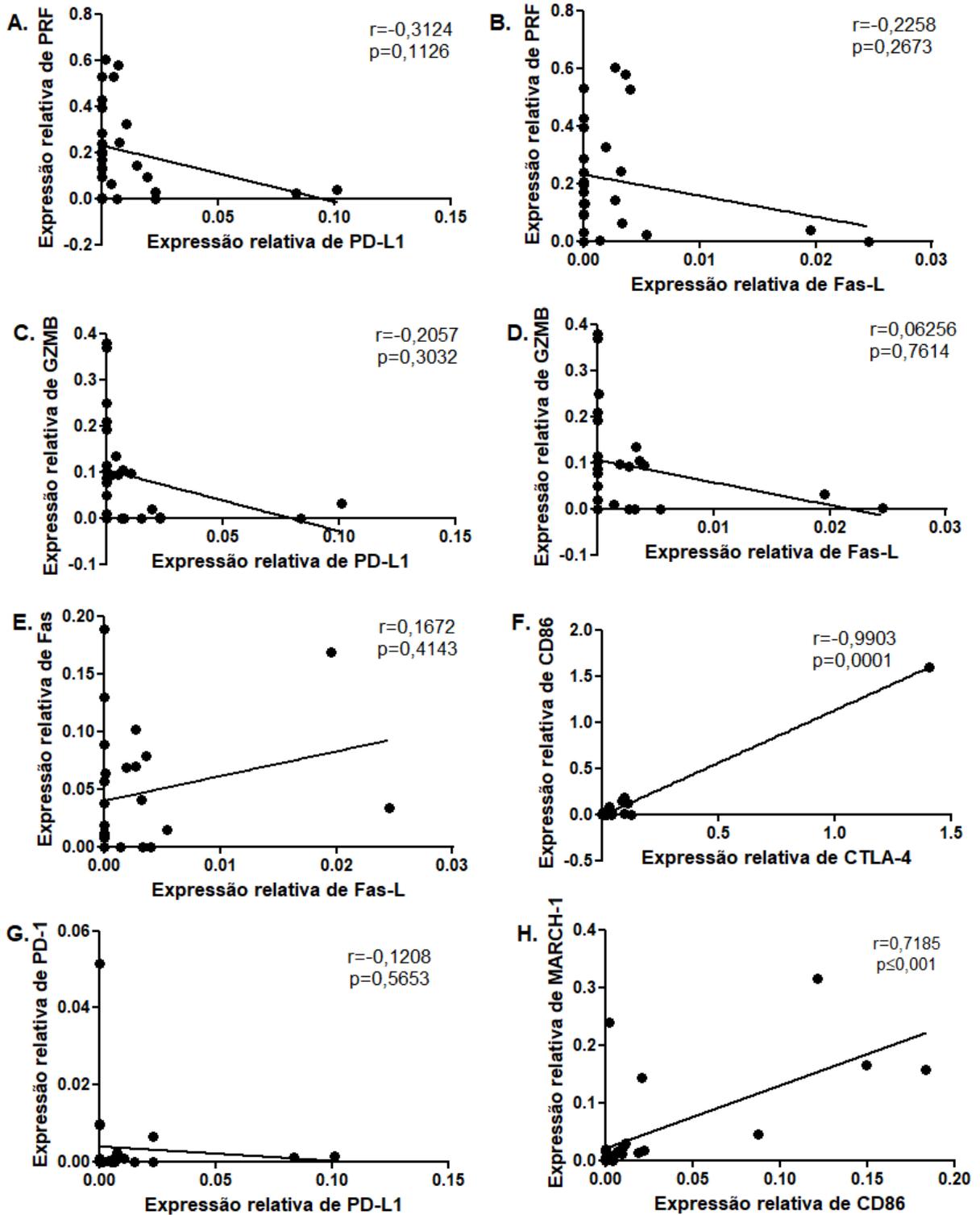
Figura 10 - Expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1 e Fas em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e indivíduos saudáveis.



Teste de Mann-Whitney. A. PD-1: $p=0,3845$; B. CTLA-4: $p=0,4904$; C. TIM-3: $p=0,8638$; D. MARCH-1: $p=0,8067$; E. PD-L1: $p=0,0423$ e F. Fas: $p=0,0875$. Legenda: LNH: linfoma não-Hodgkin
 Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Não observamos correlação significativa entre os níveis de expressão de perforina e granzima B com os níveis de PD-L1 ($p=0,1126/r=-0,3124$; $p=0,3032/r=-0,2057$, respectivamente) ou Fas-L ($p=0,2673/r=-0,2258$; $p=0,7614/r=0,06256$; $p=0,4143/r=0,1672$, respectivamente) e entre as expressões de PD-L1 e PD-1 ($p=0,5653/r=-0,1208$). Porém, foi observada correlação significativa entre as expressões gênicas de CD86 e MARCH-1 ($p=0,0010/r=0,6088$) e CTLA-4 e CD86 ($p<0,0001/r=0,9903$) (Figura 11).

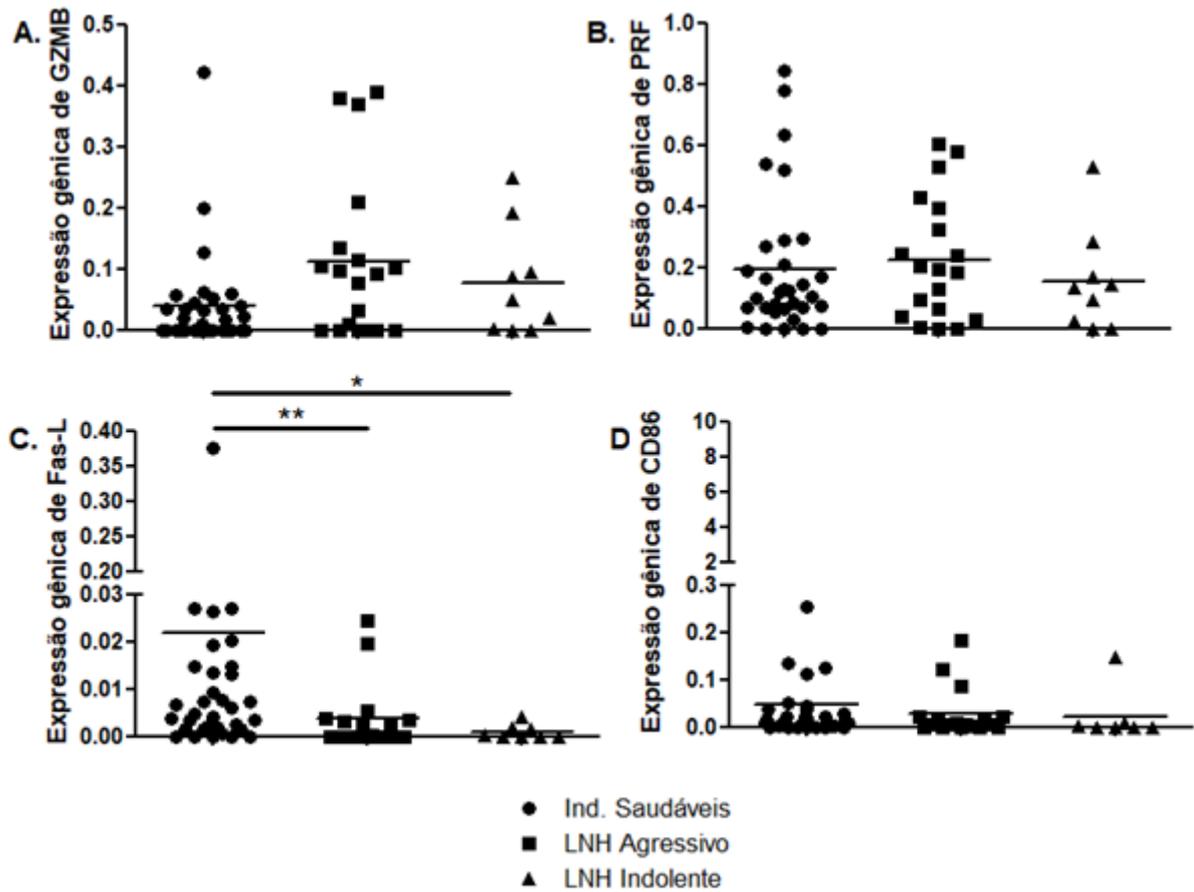
Figura 11 - Correlações entre a expressão de perforina (PRF), granzima B (GZMB) e Fas com PD-L1 e Fas-L, CD86 com MARCH-1 e CTLA-4 e PD-1 com PD-L1 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH).



Teste de regressão linear. Legenda: PRF – perforina; GZMB – granzima B. Teste de Spearman.
Fonte: Elaborado pela autora, 2018

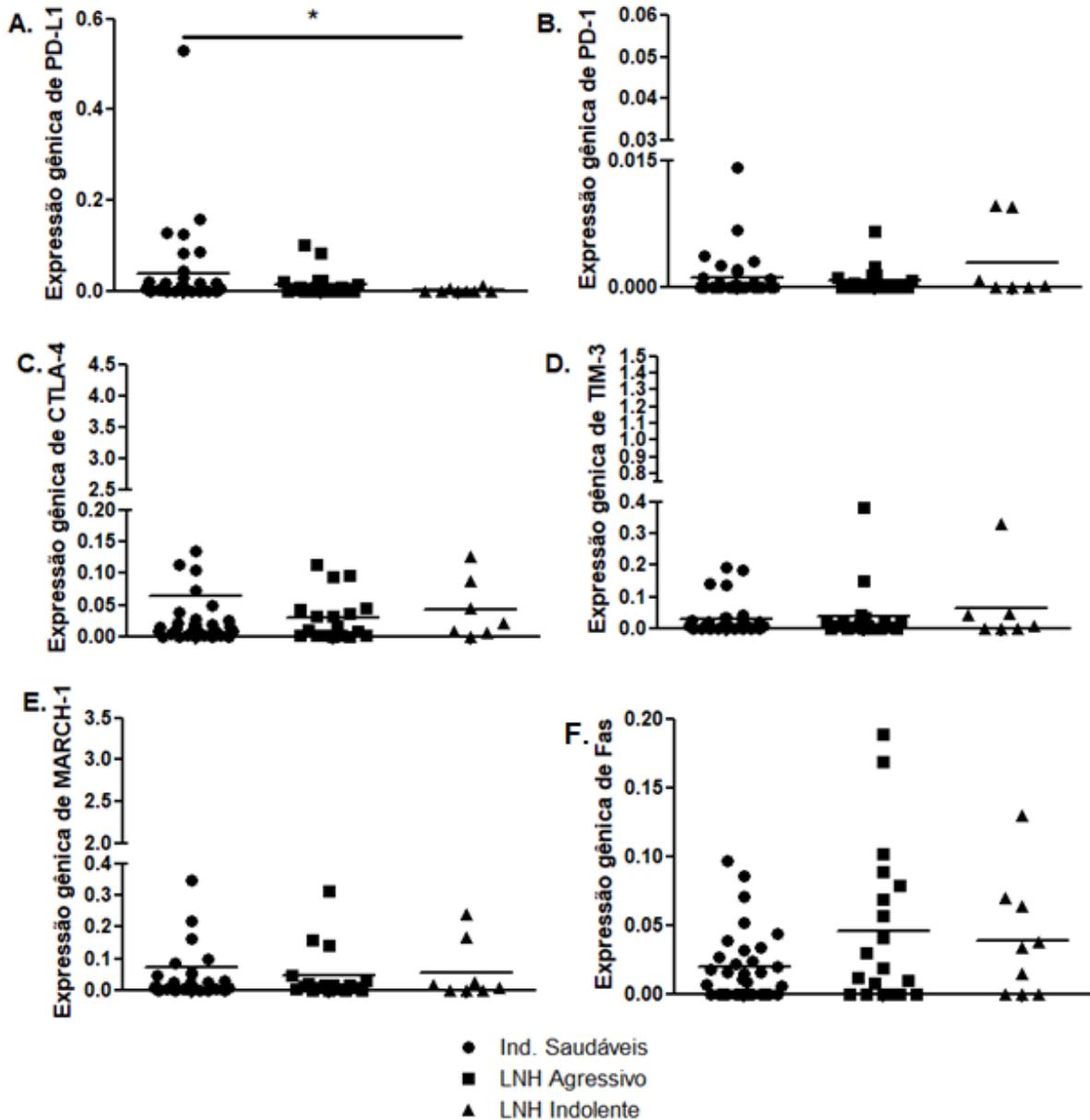
Ao subdividir os pacientes quanto à capacidade de proliferação da célula malignizada, não se observou diferença significativa na expressão gênica de perforina, granzima B, Fas, CD86, TIM-3, CTLA-4 e MARCH-1 em pacientes com LNH agressivos e indolentes quando comparados entre si e com os indivíduos saudáveis. No entanto, ao analisar a expressão dos receptores PD-1, PD-L1 e Fas-L, verificou-se que os pacientes com LNH indolente possuem redução significativa tanto na expressão de PD-L1 ($p=0,05$) quanto de Fas-L, ($p=0,05$) em relação aos indivíduos saudáveis. Contudo, os pacientes com LNH agressivo apresentam somente menor expressão de Fas-L ($p=0,001$) quando comparado com os indivíduos saudáveis (Figura 12a e Figura 12b).

Figura 12a - Níveis de expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB), Fas-L e CD86 em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) agressivo, LNH indolente e indivíduos saudáveis.



Teste de Kruskal-Wallis. $**p \leq 0,001$. Legenda: LNH – linfoma não-Hodgkin.
 Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Figura 12b - Níveis de expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1 e Fas em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) agressivo, LNH indolente e indivíduos saudáveis.

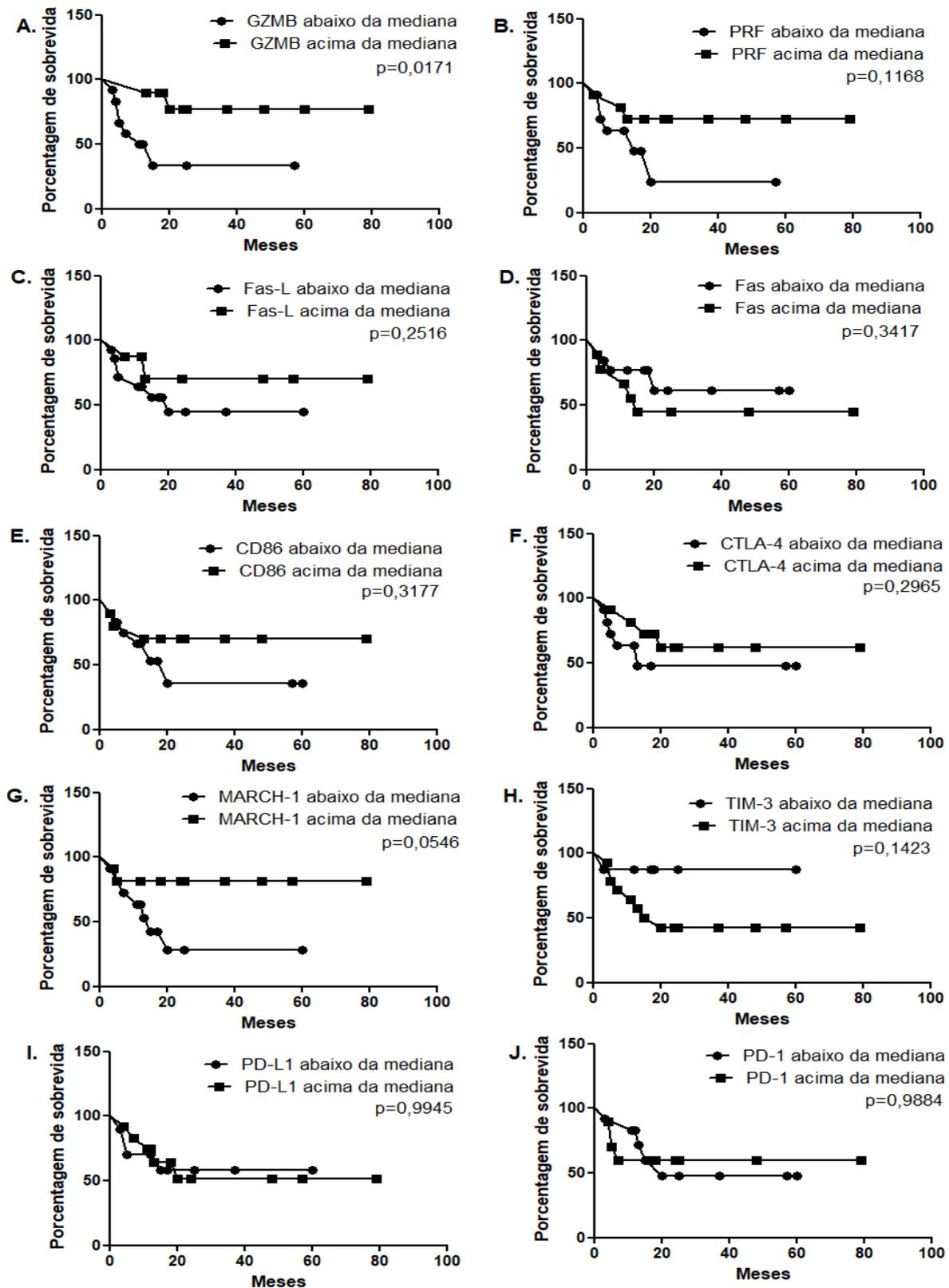


Teste de Kruskal-Wallis. * $p=0,05$; ** $p\leq 0,001$. Legenda: LNH – linfoma não-Hodgkin; PRF – perforina; GZMB – granzima B.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Em relação à análise de sobrevida dos pacientes com LNH, foi observada correlação significativa somente entre a porcentagem de sobrevida e a expressão gênica de granzima B ($p=0,0171$), do qual os pacientes com expressão deficiente para esta proteína citolítica apresentaram (Figura 13).

Figura 13 - Análise de sobrevivência dos pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH), de acordo com a expressão de proteínas citolíticas, receptores e moléculas inibitórias.



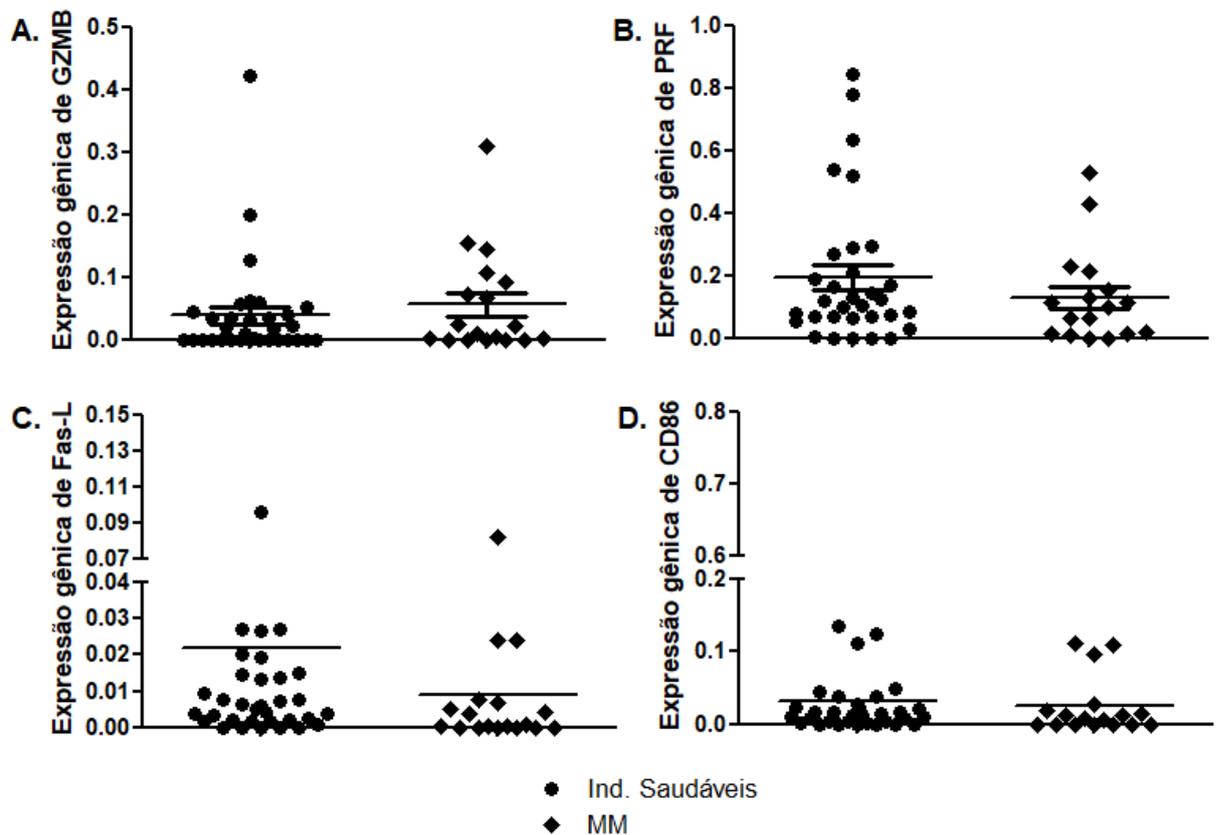
Teste de Log-Rank (Mantel-Cox). Legenda: PR - perforina; GZMB - granzima B.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018

2.6.3 Expressão gênica em MM e indivíduos saudáveis

A expressão desses genes também foi avaliada em um grupo de 18 pacientes com MM. Não foram observadas expressões gênicas significativas de perforina ($p=0,3720$), granzima B ($p=0,4134$), Fas-L ($p=0,0699$) e CD86 ($p=0,4011$) quando comparados aos indivíduos saudáveis (Figura 14).

Figura 14 - Expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB), Fas-L e CD86 em pacientes com mieloma múltiplo (MM) e indivíduos saudáveis.

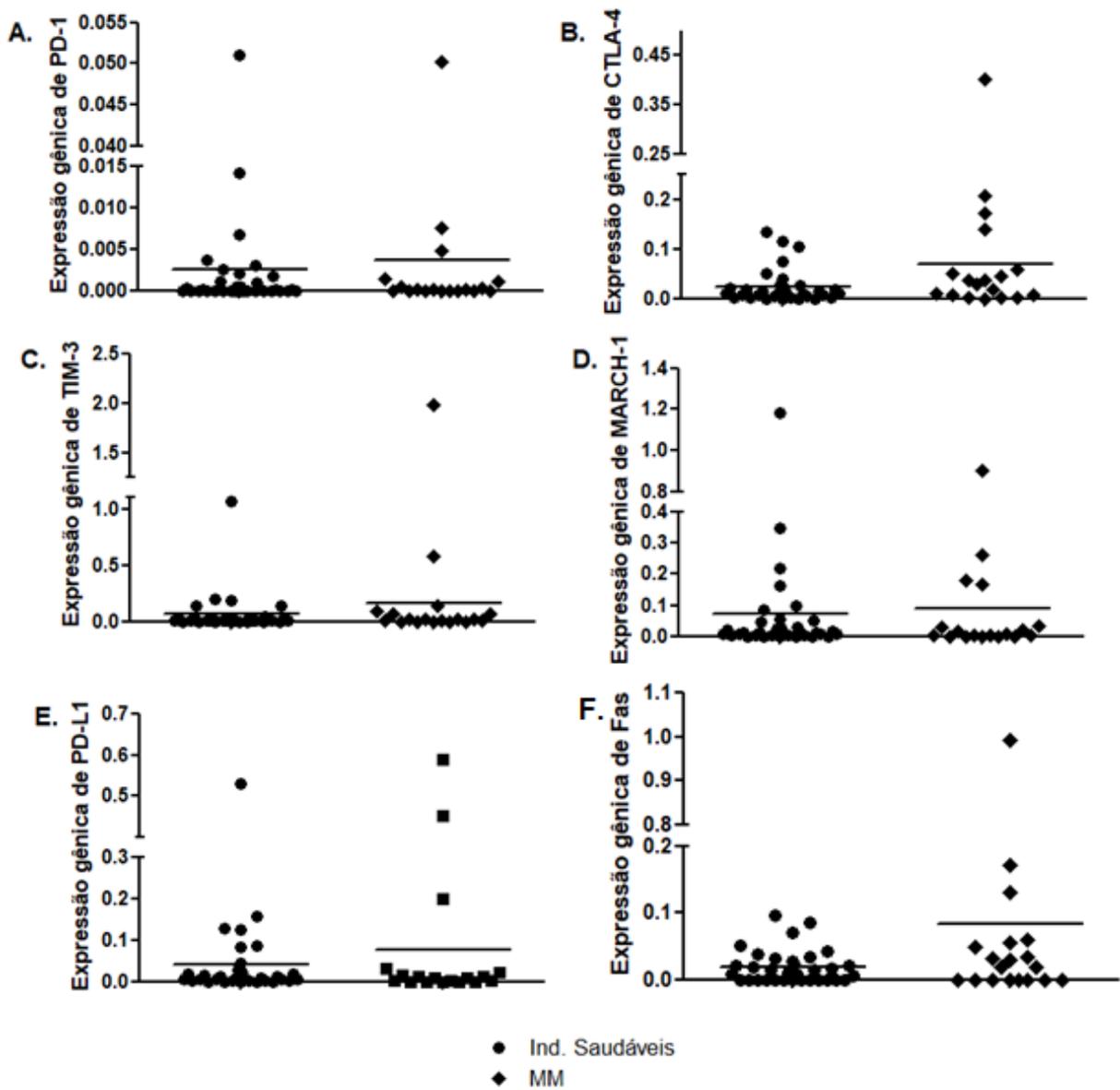


Teste de Mann-Whitney. A. GZMB: $p=0,4134$; B. PRF: $p=0,3720$; C. Fas-L: $p=0,0699$ e D. CD86: $p=0,4011$.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018

Também não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica de PD-1 ($p=0,5049$), PD-L1 ($p=0,7695$), CTLA-4 ($p=0,1037$), TIM-3 ($p=0,4841$), MARCH-1 ($p=0,6187$) e Fas ($p=0,3821$) entre estes grupos (Figura 15).

Figura 15 - Expressão gênica de PD-1, PD-L1, CTLA-4, TIM-3, MARCH-1 e Fas em pacientes com mieloma múltiplo (MM) e indivíduos saudáveis.

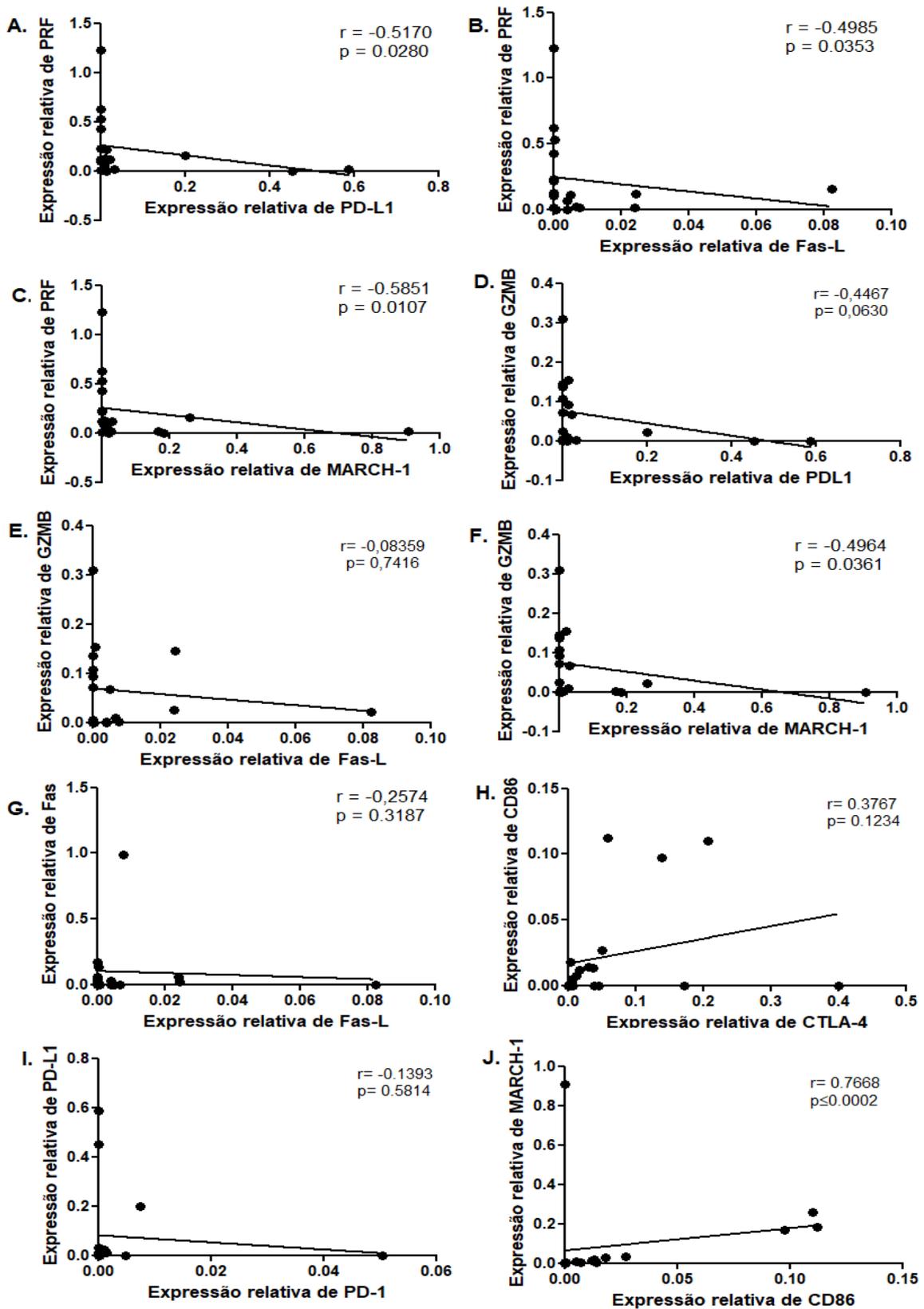


Teste de Mann-Whitney. A. PD-1: $p=0,5049$; B. CTLA-4: $p=0,1037$; C. TIM-3: $p=0,4841$; D. MARCH-1: $p=0,6187$; E. PD-L1: $p=0,7695$ e F. Fas: $p=0,3821$.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Foi observada correlação significativa de moderada a alta entre PRF com PD-L1, Fas-L e MARCH-1 ($p=0,0280/r=-0,5170$; $p=0,0353/r=-0,4985$ e $p=0,0107/r=-0,5851$, respectivamente), GZMB com MARCH-1 ($p=0,0361/r=-0,4964$) e CD86 com MARCH-1 ($p=0,0002/r=0,7668$) (Figura 16).

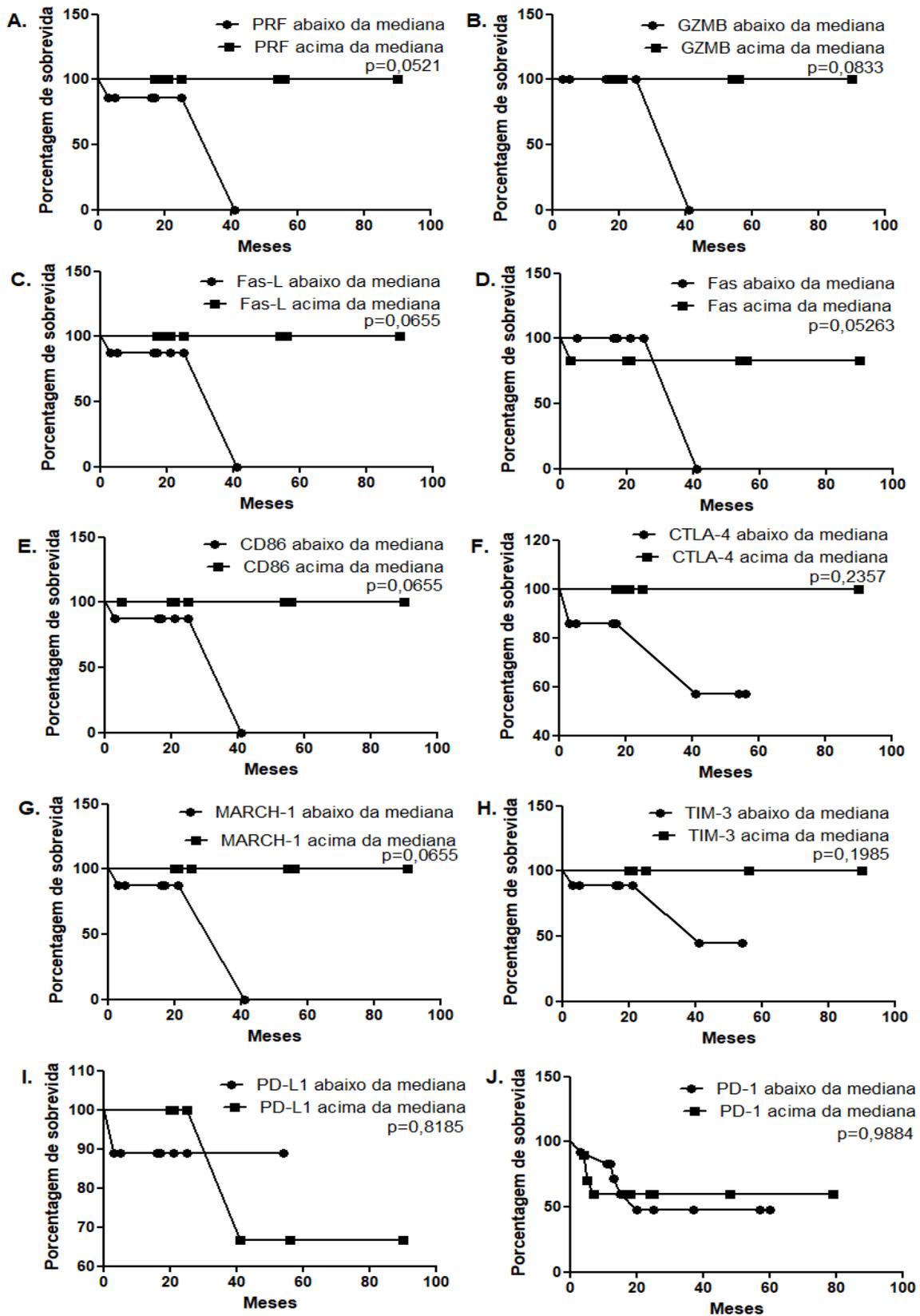
Figura 16 - Correlação da expressão gênica de perforina (PRF), granzima B (GZMB) e Fas com PD-L1, Fas-L e MARCH-1, CD86 com MARCH-1 e CTLA-4 e PD-1 com PD-L1 em pacientes com mieloma múltiplo (MM).



Teste de regressão linear. Teste de Spearman. Legenda: PRF – perforina; GZMB – granzima B.
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Ao avaliar a sobrevida destes pacientes, não observamos diferenças significativas quanto aos níveis de expressão de Fas ($p=0,05263$), PD-1 ($p=0,6667$), PD-L1 ($p=0,8185$), CTLA-4 ($p=0,2357$), TIM-3 ($p=0,1985$) e MARCH-1 ($p=0,0655$). Apesar de não significativas, observou-se uma maior sobrevida nos pacientes com maiores níveis de PRF ($p=0,0521$), GZMB ($p=0,0833$), CD86 ($p=0,0655$), Fas-L ($p=0,0655$), MARCH-1 ($p=0,0655$) (Figura 17).

Figura 17 - Análise de sobrevivência dos pacientes com mieloma múltiplo (MM), de acordo com a expressão de proteínas citolíticas, receptores e moléculas inibitórias.



Teste de Log-Rank (Mantel-Cox). Legenda: PRF - perforina; GZMB - granzima B.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018

2.7 DISCUSSÃO

O conhecimento das características imunológicas relacionadas ao processo de ativação de LTC e células NK é o foco de pesquisas que visam compreender como os distúrbios na atividade do sistema imune interferem na resposta terapêutica e/ou no prognóstico de doenças onco-hematológicas (PARDOLL, 2012; LI et al, 2017; INTHAGARD et al, 2019).

A quantificação da expressão gênica de perforina e granzima B, proteínas fundamentais para o desempenho de LTC e células NK nos permite avaliar a resposta citotóxica mediada por grânulos, desempenhada por estes tipos celulares.

No presente estudo, foi observado que os pacientes com LNH apresentaram níveis elevados na expressão de granzima B em comparação aos indivíduos saudáveis. Acreditamos que essa maior expressão seja devido à ativação das células efectoras do sistema imune na tentativa de promover a apoptose das células tumorais. Essa hipótese é subsidiada por estudos que identificaram elevados níveis de granzima B em células NK do sangue periférico de pacientes com linfoma difuso de grandes células B no momento do diagnóstico, assim como foi por nós observado (COX et al, 2015; BATTELLA et al, 2017).

Apesar de termos encontrado maiores níveis na expressão gênica de perforina não observamos diferenças significativas entres os pacientes com LNH e os indivíduos saudáveis. Possivelmente, a grande variabilidade da expressão gênica de perforina encontrada entre os indivíduos saudáveis tenha prejudicado a análise destes resultados.

Em relação aos pacientes com MM, não observamos diferenças significativas na expressão de perforina e granzima B entre pacientes e indivíduos saudáveis. Nossos dados divergem com a literatura que demonstra haver níveis reduzidos destas proteínas citolíticas em células citotóxicas de pacientes com MM (XAGORARIS et al, 2001). Assim como observado no LNH, acreditamos que a ausência de significância observada possa ocorrer devido à variabilidade da expressão gênica encontrada nos indivíduos saudáveis.

Com o objetivo de identificar possíveis fatores que poderiam interferir na expressão de perforina e granzima B, diversos receptores inibitórios foram estudados no presente trabalho. Estes receptores e moléculas inibitórias quando

expressos na superfície das células efectoras e tumorais atuam na promoção da ineficiência imunológica frente as células tumorais do LNH e do MM (ROSENBLATT, AVIGAN; 2017; HILMENYUK et al, 2018).

Concomitantemente à elevada expressão de granzima B, observamos que os pacientes com LNH apresentaram redução na expressão gênica de Fas-L e PD-L1. Esse achado nos mostra que nestes pacientes, o mecanismo de defesa predominantemente utilizado pelos linfócitos citotóxicos foi o relacionado à morte mediada por grânulos citolíticos e não pela via Fas/Fas-L.

Os receptores Fas-L e PD-L1 também são responsáveis por exercer um papel importante no processo de autorregulação das células efectoras, prevenindo o excesso de ativação com conseqüente apoptose das células efectoras. Neste cenário, os níveis aumentados de granzima B somados aos níveis reduzidos de PDL-1 e Fas-L nos fazem acreditar que os pacientes com LNH apresentam um excesso de ativação das células efectoras presentes no sangue periférico e que, neste contexto, os conhecidos fatores inibitórios que nós avaliamos atuem apenas no microambiente tumoral. Esta hipótese é reforçada pelos achados de Dilly-Feldis e colaboradores (2019) que identificaram forte expressão de PD-L1 em biópsias de pacientes com linfoma de Hodgkin.

A capacidade de autorregulação dos LTC e células NK pelos receptores PD-L1 e Fas-L ocorreu de maneira distinta ao considerar as características proliferativas das células tumorais. Neste estudo PD-L1 esteve significativamente diminuído em pacientes com LNH indolente, enquanto Fas-L mostrou-se reduzido tanto em pacientes com LNH indolente quanto agressivo. A literatura demonstra que a capacidade das células efectoras expressarem estas moléculas varia conforme a doença. Estudo em pacientes com gliomas de alta capacidade proliferativa demonstrou que a alta expressão gênica de Fas-L encontra-se diretamente relacionada à menor capacidade citotóxica de células efectoras (WERNER et al, 2017). Estudo em pacientes com carcinomas orais de células escamosas demonstra elevada expressão de PD-L1 tanto no microambiente tumoral como no sangue periférico (WEBER et al, 2017).

O presente estudo também avaliou a expressão dos genes que codificam CD86, MARCH-1, CTLA-4 e TIM-3, porém não foram observadas diferenças significativas entre pacientes com LNH e indivíduos saudáveis.

Apesar de nossos dados ter mostrado maior expressão de TIM-3 e CTLA-4 nos LNH indolentes e maior expressão de CD86 nos LNH agressivos, as diferenças não foram estatisticamente significantes. Outros estudos demonstram o aumento da expressão destes receptores e moléculas inibitórias em pacientes com linfomas agressivos de células NK/T e leucemias linfoblásticas agudas (MANOSUR, 2014; LIAO et al, 2018). Esta divergência de resultados poderia estar relacionada à maneira de quantificação destes receptores, seja na superfície celular, solúveis no citoplasma, presentes ou não no microambiente tumoral, tipos de neoplasias e número de pacientes avaliados.

Embora nosso estudo não demonstre correlações significativas entre as expressões relativas das proteínas citolíticas e receptores inibitórios, estudos demonstraram a presença de correlações significativas, variáveis conforme o subtipo da doença e os receptores avaliados (MAZZASCHI et al, 2019).

Ainda no LNH foi observada uma correlação significativa entre as expressões de MARCH-1 e CD86, demonstrando que a expressão relativa de CD86 e a atividade imunológica destes pacientes não são afetadas pela expressão da molécula inibitória MARCH-1. Este cenário ocorre devido a expressão desta molécula inibitória ser frequentemente observada em células imaturas, como células dendríticas e células da linhagem B que podem ser localizadas em tecidos pulmonares, linfoides e esplênicos e não em células citotóxicas e maduras localizadas no sangue periférico. (GASSART et al, 2008).

Concomitantemente à correlação anterior, nosso estudo também demonstrou haver uma correlação significativa e diretamente proporcional entre as expressões relativas de CTLA-4 e CD86 no LNH. Acreditamos que esta correlação possa indicar suas relações próximas em termos de funções celulares no processo de regulação da resposta imune na patologia do LNH, assim como foi observado a correlação de CTLA-4 e CD80 na regulação imunológica de pacientes com artrite reumatoide (CAO et al, 2012).

A ativação da resposta imune no LNH também interferiu na sobrevida dos pacientes avaliados. Nosso estudo mostrou que os pacientes que apresentaram elevados níveis de granzima B possuem maior sobrevida. Assemelhando-se a estes resultados, estudo realizado por nosso grupo de pesquisa em uma coorte menor de pacientes com LNH, também observou que a maior expressão gênica de granzima B está relacionada a maior sobrevida (SOUZA et al, 2018).

Em relação à expressão de PD-L1, nossos dados demonstraram que a deficiência na expressão desta molécula inibitória apresenta taxa de sobrevida semelhante aos pacientes com níveis de expressão normal. Não há consenso na literatura quanto à expressão de PD-L1 e o prognóstico de pacientes com LNH (KIYASU et al, 2015; MIYOSHI et al, 2016 ZHAO et al, 2018). Devemos ainda considerar que nosso estudo avaliou a expressão gênica desta molécula no sangue periférico enquanto a literatura correlaciona a expressão e o prognóstico da doença ao avaliar a expressão no microambiente tumoral, uma vez que neste ambiente existem outros componentes que podem interferir na capacidade citotóxica dos LTC e células NK.

Como já descrito anteriormente, os receptores inibitórios PD-1 e CTLA-4 interferem no mecanismo de ativação das células efetoras do sistema imunológico. Porém, ao considerar a porcentagem de sobrevida do LNH, nosso estudo observou que a maior sobrevida encontra-se relacionada nos pacientes que apresentam maiores níveis de expressões dos genes que codificam estas moléculas. Este achado também foi observado em estudo que verificou uma associação entre a elevada expressão de PD-1 e um maior período livre de doença em pacientes com linfomas foliculares (MEIRAV et al, 2017).

No MM, usualmente ocorre uma diminuição da resposta imunológica no microambiente tumoral. Neste cenário, a interação entre as células do estroma da medula óssea e os osteoclastos é capaz de promover a manutenção da imunossupressão a partir da indução e secreção de diferentes moléculas inibitórias e ligantes, como o PD-L1 e galactina-9, promovendo a inibição da proliferação e ativação de linfócitos T CD4+ e CD8+ (TAI et al, 2018).

Apesar de não termos observado diferenças significativas na expressão gênica de PD-1, PDL-1, TIM-3 e MARCH1 e das proteínas citolíticas nos pacientes com MM, podemos inferir que estes pacientes possam apresentar uma resposta imunológica imunossuprimida ao considerar a correlação significativa e inversamente proporcional entre as expressões gênicas de perforina e granzima B com PDL-1 e MARCH-1, mesmo sem a possibilidade de observar diferenças nas expressões destes fatores entre MM e indivíduos saudáveis.

Estudos demonstram a redução do sistema imunológico pela correlação inversamente proporcional de MARCH-1 e CD86 em células dendríticas e em monócitos (THIBODEAU et al, 2008; BRAVALLE et al, 2011). Em contrapartida,

acreditamos que a correlação diretamente proporcional observada entre as expressões relativas destes marcadores possa relacionar-se como uma tentativa falha do sistema imunológico destes pacientes em evitar a imunossupressão ocasionada pela expressão da proteína inibitória MARCH-1. Cabe ressaltar que ainda são escassos os trabalhos que avaliam a expressão destas moléculas inibitórias nesta enfermidade.

Em simultâneo a esta análise, acreditamos que a inversão de expressão gênica de PRF e Fas-L encontrada no MM também poderia ser resultante de um mecanismo compensatório utilizado pelos linfócitos citotóxicos, uma vez que na deficiência de produção de perforina, a célula poderia desviar a linha de defesa para a morte via ligação Fas/Fas-L. Este mecanismo já foi descrito por Kagi e colaboradores (1994) que observaram em estudos *in vitro* a maior ativação do sistema de morte celular mediada pelos receptores Fas/Fas-L em células citotóxicas deficientes de perforina.

Além disso, este estudo demonstrou haver uma tendência, embora não significativa, à pior sobrevida dos pacientes com MM que apresentaram menores níveis da expressão gênica de perforina, granzima B, Fas-L e CD86. A literatura confirma a pior porcentagem de sobrevida em pacientes deficientes na expressão gênica de perforina e granzima B, uma vez que as células tumorais do MM são altamente sensíveis à morte mediada por grânulos citolíticos (XAGORARIS et al, 2001). Possivelmente a não observância de resultados estatisticamente significativos se deve ao número de indivíduos avaliados, uma vez que os valores de “p” estiveram bem próximos de 0,05. Mesmo assim, fica evidente a importância destes fatores para o controle do MM, onde uma diminuição de sua expressão diminuiu claramente a sobrevida do paciente.

Assim, os resultados permitiram a constatação de que pacientes com LNH e MM apresentam características imunológicas distintas. A comparação entre estas doenças nos leva a crer que ocorra um excesso de ativação das células efetoras no LNH, cursando com aumento de granzima B e diminuição de PD-L1 e Fas-L. Por outro lado, foi possível identificar uma imunossupressão a nível periférico nos pacientes com MM, evidenciado pela associação inversa e significativa nos níveis de PD-L1 e MARCH-1 com a expressão gênica de perforina.

Conclusão

3. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Pacientes com LNH apresentaram: aumento na expressão gênica de granzima B, assinalando o aumento da resposta imunológica frente às células tumorais; expressões significativamente reduzidas de PD-L1 e Fas-L; correlação inversamente proporcional entre as expressões gênicas de granzima B com PD-L1 e Fas-L e correlação moderada entre as expressões gênicas de MARCH-1 e CD86; menor sobrevida naqueles com níveis reduzidos de expressão gênica de granzima B
- Pacientes com LNH agressivos apresentaram uma redução de Fas-L enquanto que aqueles com LNH indolentes apresentaram uma redução de Fas-L e PD-L1 em relação aos indivíduos saudáveis.
- Pacientes com MM apresentaram: correlações inversamente proporcionais entre as expressões gênicas de perforina com PD-L1, Fas-L e MARCH-1; granzima B com MARCH-1, o que pode assinalar uma imunossupressão e correlação diretamente proporcional entre MARCH-1 e CD86; tendência à menor sobrevida quando foram observados menores níveis de expressão gênica de perforina, granzima B, CD86 e Fas-L.
- Pacientes com LNH e MM apresentam características imunológicas distintas quanto à sua defesa imunológica. Observou-se uma ativação das células efectoras no LNH, cursando com aumento de granzima B e diminuição de PD-L1 e, no caso do MM, constatou-se uma imunossupressão a nível periférico, com a correlação inversamente proporcional entre as expressões das proteínas citolíticas com PD-L1, Fas-L e MARCH-1.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN CANCER SOCIETY. Key Statistics About Multiple Myeloma. 2018. American Cancer Society. Disponível em <<https://www.cancer.org/cancer/multiple-myeloma/about/key-statistics.html>>. Acesso em 10 de setembro de 2018.
- ALMEIDA-OLIVEIRA A; DIAMOND HR. Atividade antileucêmica das células *Natural Killer* (NK). **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 54,n. 3,p. 297-305, 2008.
- ANSELL, S.M. Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic Proceedings**. v. 90, n. 11, p. 1574-1583, 2015.
- ANDERSON AC. TIM-3: An emerging target in cancer immunotherapy landscape. **Cancer Immunology Research**. v. 2, n. 5, p. 393-398, 2014.
- ANDERSON AC; JOLLER N; KUCHROO VK. Lag-3, Tim-3 and TIGIT co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. **Immunity Journal**. v. 44, n. 5, p. 989-1004, 2016.
- AISENBERG, A.C. Historical review of lymphomas. **British Journal Haematology**. v. 109, n. 3, p. 466-76, 2000.
- ARMITAGE, J.O. Staging non-Hodgkin lymphoma. **CA Cancer Journal for Clinicians**. v. 55, n. 6, p. 368-376, 2005.
- ARMITAGE, J.O; GASCOYNE, R.D; LUNNING, M.A; *et al.* Non-Hodgkin Lymphoma. **The Lancet**. v. 390, n. 10091, p. 298-310, 2017.
- ÁSTER JC. **Doença de leucócitos, linfonodo, baço e timo**. In Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Robbins e Cotran. Patologia-Bases patológicas das doenças. 7ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 695-746, 2005.
- BAITSCH L, LEGAT L, BARBA L, *et al.* Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. **PloS One**. v. 7, n. 2, 2012.
- BARAVALLE G; PARK H; McSWEENWY M; *et al.* Ubiquitination of CD86 Is a Key Mechanism in Regulating Antigen Presentation by Dendritic Cells. **The Journal of Immunology**. v. 187, n. 6, p. 2966-2973, 2011.
- BARTEE E; MANOSURI M; NERENBERG BTH; *et al.* Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. **Journal of Virology**. v. 78, p. 1109-1120, 2004.
- BATTELLA S; COX MC; LA SCALEIA R; *et al.* Peripheral blood T cell alterations in newly diagnosed diffuse large B cell lymphoma patients and their long-term dynamics upon rituximab-based chemoimmunotherapy. **Cancer Immunology Immunotherapy**. v. 66, n. 10, p. 1295-1306, 2017.
- BELL RB; FENG Z; BIFULCO CB; *et al.* Immunotherapy. **Oral, Head, Neck Oncology and Reconstructive Surgery**. p. 314-340, 2018.

- BOURGEOIS-DAIGNEAULT MC; THIBODEAU J. Autoregulation of MARCH1 expression by dimerization and autoubiquitination. **The Journal of Immunology**. v. 188, n. 10, p. 4959-4970, 2012.
- BUCHBINDER EI; DESAI A. CTLA-4 and PD-1 pathways. Similarities, differences and implications of their inhibition. **American Journal of Clinical Oncology**. v. 39, n. 1, p. 98-106, 2016.
- BUSTIN SA; BENES V; GARSON JA; *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CAO J; ZOU L; LUO P; *et al.* Increased production of circulating soluble co-stimulatory molecules CTLA-4, CD28 and CD80 in patients with rheumatoid arthritis. **International Immunopharmacology**. v. 14, n. 4, p. 585-592, 2012.
- CARRENO BM; BENNET F; CHAU TA; *et al.* CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. **The Journal of Immunology**. v. 165, n. 3, p. 1352-1356, 2000.
- COLUCCI F; TRAHERNE J. Killer-cell immunoglobulin-like receptors on the cusp of modern immunogenetics. **Immunology**. v. 152, n. 4, p. 556-561, 2017.
- CORCORAN K; JABBOUR M; BHAGWINDIN C; *et al.* Ubiquitin-mediated regulation of CD86 protein expression by the ubiquitin ligase membrane-associated RING-CH-1 (MARCH1). **The Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 43, p. 37168-37180, 2011.
- COX MC; BATTELLA S; SCALEIA RL; *et al.* Tumor-associated and immunochemotherapy-dependent long-term alterations of the peripheral blood NK cell compartment in DLBCL patients. **Oncoimmunology**. v. 4, n. 3, 2015.
- CHANG LC; CHEN TP; KUO WK; *et al.* The Protein Expression of PDL1 Is Highly Correlated with Those of eIF2 α and ATF4 in Lung Cancer. **Disease Markers**. doi: 10.1155/2018/5068701. eCollection 2018, 2018.
- CHEN L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 4, n. 5, p. 336-347, 2014.
- CHEN X; LIU S; WANG L; *et al.* Clinical significance of B7-H1 (PD-L1) expression in human acute leukemia. **Cancer Biology & Therapy**. v. 7, n. 5, p. 622-627, 2008.
- CHEN X; SHAO Q; HAO S; *et al.* CTLA-4 positive breast cancer cells suppress dendritic cells maturation and function. **Oncotarget**. v. 8, n. 8, p. 13703-13715, 2017.
- CLEMENTI R; DAGNA L; DIANZANI U; *et al.* Inherited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. **New England Journal of Medicine**. v. 351, n. 14, p. 1419-1424, 2004.
- DADI S; CHHANGAWALA S; WHITLOCK BM; *et al.* Cancer immunosurveillance by tissue-resident innate lymphoid cells and innate-like T cells. **Cell**. v. 164, p. 365-377, 2016.

DILLY-FELDIS M, ALADJIDI N, REFAIT JK, PARRENS M, DUCASSOU S, RULLIER A. Expression of PD-1/PD-L1 in children's classical Hodgkin lymphomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2019 Jan 13:e27571.

GREENFIELD EA; NGUYEN KA; KUCHROO VK. CD28/B7 coestimulation: a review. **Critical Reviews in Immunology**. v. 18, n. 5, p. 389-418, 1998.

HILMENYUK T; RUCKSTUHL CA; HAROYZ M; *et al*. T cell inhibitory mechanisms in a model of aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma. **Oncoimmunology**. v. 7, n. 1, e1365997, 2018.

HEKIMGIL, M; CAGIRGAN S; PEHLIVAN M; *et al*. Immunohistochemical detection of CD 95 (Fas) & Fas ligand (Fas-L) in plasma cells of multiple myeloma and its correlation with survival. **Leukemia and Lymphoma**. v. 47, n. 2, p. 271-280, 2006.

HEUSEL JW; WESSELSCHMIDT RL; SHRESTA S; *et al*. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. **Cell**. v. 76, p. 977-987, 1994.

HORLAD H; OHNISHI K; MA C; *et al*. TIM-3 expression in lymphoma cells predicts chemoresistance in patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. **Oncology Letters**. v. 12, n. 2, p. 1519-1524, 2016.

HUANG, X; BAI X; CAO Y; *et al*. Lymphoma endothelium preferentially express TIM-3 and facilitates the progression of lymphoma by mediating immune evasion. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 207, n. 3, p. 505-520, 2010.

INTHAGARD J; EDWARDS J; ROSEWEIR AK. Immunotherapy: enhancing the efficacy of this promising therapeutic in multiple cancers. **Clinical Science (London)**. v. 133, n. 2, p. 181-193, 2019.

ISHIDO S; MATSUKI Y; GOTO E; *et al*. MARCH-1: a new regulator of dendritic cell function. **Molecules and Cells**. v. 29, n. 3, p. 229-232, 2009.

JABERIPOUR M; HABIBAGAH M; HOSSEINI A; *et al*. Detection of B cell lymphoma 2, tumor protein 53, and Fas gene transcripts in blood cells of patients with breast cancer. **Indian Journal Cancer**. v. 47, n. 4, p. 412-417, 2010.

KAGI D; VIGNAUX F; LEDERMANN B; *et al*. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. **Science**. V. 265, n. 5171, p. 528-530, 1994.

KAMARASHEV, J; BURG, G; MINGARI, M.C; *et al*. Differential expression of cytotoxic molecules and killer cell inhibitory receptors in CD8+ and CD56+ cutaneous lymphomas. **The American Journal of Pathology**. v.158, n. 5, p. 1593-1598, 2001.

KARACHALIOU N; CAO MG; TEIXIDO C; *et al*. Understanding the function and dysfunction of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints. **Cancer Biology & Medicine**. v. 12, n. 2, p. 79-86, 2015.

KIM R; EMI M; TANABE K; *et al*. The role of Fas ligand and transforming growth factor β in tumor progression. **Cancer Cytopathology**. v. 100, n. 11, 2004.

KIM N; KIM HS. Targeting Checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of natural killer cells. **Frontiers in Immunology**. v. 9, 2018.

KIYASU J; MIYOSHI H; HIRATA A; *et al.* Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**. v.126, n. 9, p. 2193-2201, 2015.

KYLE RA; GERTZ MA; WITZIG TE; *et al.* Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. **Mayo Clinic Proceedings**. n. 78, v. 1, p. 21-33, 2003.

KONG Y; ZHANG J; CLAXTON DF; *et al.* PD-1(hi)TIM-3(+) T cells associate with and predict leukemia relapse in AML patients post allogeneic stem cell transplantation. **Blood Cancer Journal**. v. 5, 2015.

KONJEVIC G; JURISIC V; JOVIC V; *et al.* Investigation of NK cell function and their modulation in different malignancies. **Immunologic Research**. v. 52, n. 1-2, p. 139-156, 1999.

LI J; NI L; DONG C. Immune checkpoint receptors in cancer: redundant by design? **Current Opinion in Immunology**. v.45, p. 37-42, Epub 2017 Feb 10, 2017.

LIAO Z; LV X; LIU S; *et al.* Different aberrant expression. Pattern of immune checkpoint receptors in patients with PTCL and NK/T-CL. **Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology**. p. 1-7, 2018.

LINSLEY OS; BRADSHAW J; GREENE J; *et al.* Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. **Immunity**. v. 4, p. 535-543, 1996.

LINSLEY OS; GREENE JL; BRADY W; *et al.* Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. **Immunity**. v. 1, p. 793-801, 1994.

LORD SJ; RAJOTTE RV; KORBUTT GS; *et al.* Granzyme B: a natural born killer. **Immunology Reviews**. v. 193, n. 1, p. 31-38, 2003.

MACFARLENE AW; JILLAB M; SMITH MR; *et al.* NK cell dysfunction in chronic lymphocytic leukemia is associated with loss of the mature cells expressing inhibitory killer cell Ig-like receptors. **Oncoimmunology**. v. 6, n. 7, eCollection, 2017.

MALMBERG KJ; CARLSTEN M; BJORKLUND A; *et al.* Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. **Seminars in Immunology**. v. 31, 2017.

MANSOUR A; ELKHODARY T; DARWISH A; *et al.* Increased expression of costimulatory molecules CD86 and sCTLA-4 in patients with acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & Lymphoma**. v. 55, n. 9, p. 2120-2124, 2014.

MARGOLIN K. Introduction to the role of the immune system in melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**. v. 28, n. 3, p. 537-558, 2014.

MARTÍNEZ-LOSTAO L; ANEL A; PARDO J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? **Clinical Cancer Research**. v. 21, n. 22, p. 5047-5056, 2015.

MATSUKI Y; MHUMURA-HOSHINO M; GOTO E; *et al.* Novel regulation of MHC class II function in B cells. **The EMBO Journal**. v. 26, n. 3, p. 846-854, 2007.

MAZZASCHI G; FACCHINETTI F; MISSALE G; *et al.* The circulating pool of functionally competent NK and CD8+ cells predicts the outcome of anti-PD1 treatment in advanced NSCLC. **Lung Cancer**. n. 127, p. 153-163, 2019.

MENIAWY TM; LAKE RA; McDONNELL AM; *et al.* PD-L1 on peripheral blood T lymphocytes is prognostic in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with EGFR inhibitors. **Lung Cancer**. v. 93, p. 9-16, 2016.

MELLOR-HEINEKE; VILLANUEVA J; JORDAN MB; *et al.* Elevated Granzyme B in Cytotoxic Lymphocytes is a Signature of Immune Activation in Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. **Frontiers of Immunology**. v. 4, n. 72, doi: 10.3389/fimmu.2013.00072. eCollection, 2013.

MEIRAV K; GINETTE S; TAMAR T; *et al.* Extrafollicular PD1 and Intrafollicular CD3 Expression Are Associated With Survival in Follicular Lymphoma. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**. v. 17, n. 10, p. 645-649, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional de Câncer. A situação do câncer no Brasil**. INCA. Rio de Janeiro 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. INCA. Rio de Janeiro 2017. Disponível em <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-incidencia-de-cancer-no-brasil-2018.pdf>>.

MIYOSHI H; KIYASU J; YOSHIDA N; *et al.* PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. **Blood**. v.128, n. 10, p. 1374-1381, 2016.

MULLBACHER, A; WARING, P; THA HLA, R; *et al.* Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.96:13950–13955, 1999.

OCAÑA-GUZMAN R; TORRE-BOUSCOULET L; *et al.* TIM-3 regulates distinct functions in macrophages. **Frontiers in Immunology**. v. 7, n. 229, 2016.

OSÍNSKA I; POPKO K; DEMKOW U. Perforin: a important player in immune response. **Central European Journal of Immunology**. v. 39, n. 1, p. 109-115, 2014.

PAULA e SILVA, RO; BRANDÃO KMA; PINTO PVM; *et al.* Mieloma múltiplo: características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico e estudo prognóstico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 31, n. 2, p. 63-68, 2009.

PARDOLL DM. The blockade of immune checkpoints in câncer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**. v. 12, n. 4, p. 252-264, 2012.

PFEFFER CM; SINGH ATK. Apoptosis: A target for anticancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, n. 2, p. 448, 2018.

- PIPKIN M.E; RAO A; LICHTENHELD M.G. The transcriptional control of the perforin locus. **Immunological Reviews**. v. 235, n. 1, p. 55-72, 2010.
- PODACK ER; KONIGSBERG PJ. Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical and functional characterization. **Journal of Experimental Medicine**. v. 160, n. 3, p. 695-710, 1984.
- REN X; WU H; LU J; *et al.* PD1 protein expression in tumor infiltrated lymphocytes rather than PDL1 in tumor cells predicts survival in triple-negative breast cancer. **Cancer Biology & Therapy**. v. 19, n. 5, p. 373-380, 2018.
- REVELL, P.A; GROSSMAN, W.J; THOMAS, D.A; CAO, X; BEHL, R; RATNER, J.A; *et al.* Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions. **The Journal of Immunology**. v.174:2124–2131, 2005.
- ROSENBLATT J; AVIGAN D. Targeting the PD-1/PD-L1 axis in multiple myeloma: a dream or a reality?. **Blood**. v.129, p. 275-279, 2017.
- SANCHEZ-BEATO M; SANCHEZ-AGUILERA A; PIRIS MA; *et al.* Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. **Blood**. v. 101, n. 4, p. 1220-1235, 2003.
- SOUZA BMB; DE VITO FB; CALADO ML; *et al.* Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma. **Leukemia & Lymphoma**. V. 59, n. 1, p. 214-220, 2018.
- SHANKLAND KR; ARMITAGE JO; HANCOCK BW. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**. v. 380, n. 9844, p. 848-857, 2012.
- SHRESTA, S; GRAUBERT, T.A; THOMAS, D.A; *et al.* Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. **Immunity**. v.10:595–605, 1999.
- SMYTH M.J; THIA K.Y; STREET S.E; *et al.* Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, n. 5, p. 755-60, 2000.
- SPRANGER S; SPAAPEN RM; ZHA Y; *et al.* Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. **Science Translational Medicine**. 2013; v. 5, n. 200, 2013.
- SWERDLOW SH, CAMPO E, HARRIS NL, *et al.* WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2008.
- TAI YT; CHO SF; ANDERSON KC. Osteoclast Immunosuppressive Effects in Multiple Myeloma: Role of Programmed Cell Death Ligand 1. **Frontiers in Immunology**. v. 10, n. 9, eCollection 2018.
- TAUBE JM; KLEIN A; BRAHMER JR; *et al.* Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. **Clinical Cancer Research**. v. 20, p. 5064-5074, 2014.
- TORREZINI T; ANTHONAZIO DA. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias: Implicações Clínicas e Potencial Terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 54, n. 1, p. 63-77, 2008.

THE LEUKEMIA AND LYMPHOMA SOCIETY. Facts and statistics. 2018. The Leukemia and Lymphoma Society. Disponível em <www.lls.org/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview>. Acesso em 29 de novembro de 2018.

THIBODEAU J; BOURGEOIS-DAIGNEAULT MC; HUPPE G; et al. Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. **European Journal of Immunology**. v. 38, n. 5, p. 1225-1230, 2008.

TRAPANI JA. Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. **Internal Medicine Journal**. v. 25, n. 6, p. 793-799, 1995.

TRAPANI JA. Granzymes, cytotoxic granules and cell death: the early work of Dr. Jurg Tschopp. **Cell Death & Differentiation**. v.19, n. 1, p. 21-27, 2012.

TSCHOPP J; NABHOLZ M. Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. **Annual Review of Immunology**. v. 8, p. 279-302, 1990.

TURNER CT; LIM D; GRANVILLE DJ. Granzyme B in skin inflammation and disease. **Matrix Biology**. 2017, <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.005>.

VAN DEN BROEK M.E; KÄGI D; OSSENDORP F; et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 184, n. 5, p. 1781-90, 1996.

VAN ELSAS A; SUTMULLER RP; HURWITZ AA; et al. Elucidating the autoimmune and antitumor effector mechanisms of a treatment based on cytotoxic T lymphocyte antigen-4 blockade in combination with a B16 melanoma vaccine: comparison of prophylaxis and therapy. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 194, p. 481-489, 2001.

VEJBAESYA S; SAE-TAM P; KHUHAPINANT A; et al. Killer cell immunoglobulin-like receptors in Thai patients with leukemia and diffuse large B-cell lymphoma. **Human Immunology**. v. 75, n. 7, p. 673-676, 2014.

VERHAGE M; SORENSEN J.B. Vesicle docking in regulated exocytosis. **Traffic**. v.9, n. 9, p. 1414-24, 2008.

VILLA-MORALES M; GOZÁLEZ-GUGEL E; SHAHBAZI MN; et al. Modulation of the Fas-apoptosis-signalling pathway by functional polymorphisms at Fas, FasL and Fadd and their implication in T-cell lymphoblastic lymphoma susceptibility. **Carcinogenesis**. v. 31, n. 12, p. 2165-2171, 2010.

VOSKOBOINIK I, WHISSTOCK JC, TRAPANI JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. **Nature Reviews Immunology**. v.15, n. 6, p. 388-400, 2015.

WALDHAEUER I; STEINLE A. NK cells and cancer immunosurveillance. **Oncogene**. v. 27, n. 45, p. 5932-5943, 2008.

WANG, S.; CHEN, L. lymphocyte co-signaling pathways of the B7-CD28 family. **Cell Mol Immunol**, v. 1, n.1, p. 37-42, 2004.

- WEBER M; WEHRLAN F; BARAN C; *et al.* PD-L1 expression in tumor tissue and peripheral blood of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**. v. 8, n. 68, p. 112584-112597, 2017.
- WERNER JM; KUHL S; STAVRINO P; *et al.* Expression of FAS-L Differs from Primary to Relapsed Low-grade Gliomas and Predicts Progression-free Survival. **Anticancer Research**. v. 37, n. 12, p. 6639-6648, 2017.
- WILLENBRING RC; JOHNSON AJ. Finding a balance between protection and pathology: the dual role of perforin in human disease. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 8, p. 1608, 2017.
- YANG, ZZ; NOVAK A.N; ZIESMER S.C; *et al.* Attenuation of CD8+ T-Cell Function by CD4+ CD25+ Regulatory T Cells in B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. **Cancer Research**. v.66, n.20, p. 10145-10152, 2006.
- YANG ZZ; GROTE DM; ZIESMER SC; *et al.* IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 122, n. 4, p. 1271-1282, 2012.
- YANG H; BUESO-RAMOS C; DINARDO C; *et al.* Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. **Leukemia**. v. 28, n. 6, p. 1280-1288, 2014.
- XAGORARIS I; PATERAKIS G; ZOLOTA B; *et al.* Expression of Granzyme B and Perforin in Multiple Myeloma. **Acta Haematologica**. v. 105, n. 3, p. 125-129, 2001.
- ZELLE-RIESER C; THANGAVADIEL S; BIEDERMANN R; *et al.* T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. **Journal of Hematology & Oncology**. V. 9, n. 1, 2016.
- ZAGO MA; FALCÃO RP; PASQUINI P. **Tratado de Hematologia**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2014.
- ZENG Z; SHI F; ZHOU L; *et al.* Upregulation of Circulating PD-L1/PD-1 Is Associated with Poor Post-Cryoablation Prognosis in Patients with HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. **PloS One**. v. 6, n. 9, 2011.
- ZHANG X; GAO L; MENG K; *et al.* Characterization of CD4+ T cell-mediated cytotoxicity in patients with multiple myeloma. **Cellular Immunology**. [Epub ahead of print], 2018.
- ZHAO S; ZHANG M; ZHANG Y; *et al.* The prognostic value of programmed cell death ligand 1 expression in non-Hodgkin lymphoma: a meta-analysis. **Cancer Biology & Medicine**. v. 15, n. 3, p. 290-298, 2018.
- ZHOU Q; MUNGER ME; VEENSTRA RG; *et al.* Coexpression of TIM-3 and PD-1 identifies a CD8+ T cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. **Blood**. v. 117, n. 17, p. 4501-4510, 2011.