

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Michelle Lara Samuel

Avaliação de fatores inibitórios desencadeados por células T reguladoras sobre linfócitos
citotóxicos em pacientes com neoplasias linfoproliferativas

Uberaba - MG

2021

Michelle Lara Samuel

Avaliação de fatores inibitórios desencadeados por células T reguladoras sobre linfócitos
citotóxicos em pacientes com neoplasias linfoproliferativas

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Helio Moraes de Souza
Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Bernadelli
De Vito

Uberaba – MG
2021

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

S188f	<p>Sammel, Michelle Lara Fatores inibitórios desencadeados por células T reguladoras sobre linfócitos citotóxicos em neoplasias linfoproliferativas / Michelle Lara Sammel. – 2021. 57 p.: il., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021 Orientador: Prof. Dr. Helio Morais de Souza Coorientadora: Profa. Dra. Fernanda Bernadelli De Vito</p> <p>1. Linfoma não Hodgkin. 2. Leucemia linfocítica crônica de células B. 3. Fator de crescimento transformador beta. 4. Linfócitos T reguladores. 5. Proteínas citotóxicas formadoras de poros. I. Souza, Helio Morais de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616-006.44</p>
-------	---

MICHELLE LARA SAMUEL

Avaliação de fatores inibitórios desencadeados por células T reguladoras sobre linfócitos citotóxicos em pacientes com neoplasias linfoproliferativas.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração Imunologia Básica e Aplicada, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

09 de dezembro de 2021

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Sarah Cristina Sato Vaz Tanaka
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Celso Arrais Rodrigues da Silva
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Helio Moraes de Souza
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico este trabalho àqueles que perto ou
longe encantam minha vida: MINHA FAMÍLIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser a preciosidade da luz divina que me inspira e me guia em todos os caminhos que trilho.

Agradeço aos meus pais, Ronaldo e Delza, pelo apoio incondicional, por terem me ensinado a seguir sempre em frente e lutar pelos meus objetivos com garra e determinação.

Agradeço ao meu noivo, César, pela paciência e apoio. Sua alegre e carinhosa presença foi e é fundamental para mim. Ao Cezinha, pela companhia nas etapas deste ciclo.

Aos meus irmãos Andréa e Rodrigo, meu cunhado Paulo Raphael e minha cunhada Miriam, por torcerem por meu sucesso e sempre me ofertarem uma palavra de apoio.

Agradeço ao tio Júnior pelo incentivo à realização deste mestrado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Helio Moraes de Souza, pelo incentivo, oportunidades e receptividade. Os seus ensinamentos tem um especial significado em minha carreira profissional.

Agradeço à minha coorientadora, Profa. Dra. Fernanda Bernadelli de Vito, por me conduzir nesses dois anos de aprendizado, pelo carinho e leveza na transmissão de conhecimento.

Agradeço à Dra. Sarah Tanaka pela presteza e receptividade, por me instruir nos experimentos no Laboratório de Pesquisas Hematológicas da Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da UFTM.

Agradeço às colegas Bruna Maria Bereta e Marianna Laicati Calado.

Agradeço os colegas de mestrado, em especial à Dra. Vanessa, pelo auxílio no trabalho.

Meu especial agradecimento à Dra. Darci Alvarenga, que muito contribuiu para implementação de meu trabalho em momento crítico de pandemia.

Agradeço aos médicos do Hemocentro de Uberaba, pela contribuição na busca ativa por pacientes que cumpriam o critério de inclusão neste presente estudo.

Aos colegas do Hemocentro de Uberaba, em especial ao meu colega de laboratório Arthur, que se dedicou ao trabalho durante minhas ausências.

Aos participantes saudáveis da pesquisa e paciente, os quais consentiram em participar na realização deste estudo, colaborando com a pesquisa científica.

Agradeço à Pós Graduação em Ciências da Saúde da UFTM e seus membros pelo apoio e à banca examinadora por aceitar participar da avaliação do meu trabalho.

Agradeço às agências brasileiras de fomento em pesquisa, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à FAPEMIG e à UFTM.

RESUMO

Neoplasias linfoproliferativas crônicas são doenças caracterizadas por expansão monoclonal e acúmulo de linfócitos aparentemente maduros, que apresentam vantagem proliferativa e/ou sobrevivência na medula óssea, sangue periférico e gânglios linfáticos. Os mecanismos imunológicos envolvidos na indução e inativação celular são complexos e ainda pouco compreendidos nessas neoplasias. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica de *TGF β* , *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, *FoxP3*, *PRF1* e *GZMB* em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH) e leucemia linfocítica crônica (LLC) atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Foram avaliados 20 pacientes com LNH e 14 com LLC e 12 indivíduos saudáveis. A quantificação relativa dos genes foi realizada por qPCR. Nos pacientes com LNH foi observada expressão significativamente menor de *TGF- β* quando comparados ao grupo controle (p= 0,041). O mesmo não foi observado em relação aos demais genes. Quando os pacientes com LNH foram categorizados por gravidade, foi verificada maior expressão de *PDL1* (p=0,049) em indivíduos com LNH agressivo. Em relação ao desfecho, pacientes com LNH que foram a óbito apresentavam níveis de expressão de *PRF1* significativamente menores que aqueles que permaneceram vivos (p=0.0474). Já nos pacientes com LLC, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos genes avaliados. Os dados aqui encontrados podem contribuir em novos estudos sobre os genes avaliados, bem como novos marcadores com valor prognóstico. O entendimento da imunologia tumoral combinada com a avaliação da expressão gênica contribui para um melhor entendimento do padrão de resposta imune.

Palavras chave: linfoma não-Hodgkin; leucemia linfocítica crônica; fator de crescimento transformador beta (TGF- β); FoxP3; fatores imunes inibitórios; proteínas citotóxicas.

ABSTRACT

Chronic lymphoproliferative neoplasms are diseases characterized by monoclonal expansion and accumulation of apparently mature lymphocytes which have a proliferative and/or survival advantage in bone marrow, peripheral blood and lymph nodes. The immunological mechanisms involved in cell induction and inactivation are complex and still poorly understood in these neoplasms. Therefore, this study aimed to evaluate the gene expression of *TGFβ*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *FoxP3*, *PRF1* and *GZMB* in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) attended at Hospital of Clinics of Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM). This study comprehended twenty patients with NHL, 14 with CLL and 12 healthy individuals. Relative quantification of genes was performed by qPCR. Non-Hodgkin lymphoma patients, showed a significantly lower expression of *TGFβ* when compared to the control group ($p=0,041$). The same was not observed in relation to the other genes. Non-Hodgkin lymphoma patients, when characterized by severity, showed a higher expression of *PDL1* ($p=0,049$) in individuals with aggressive NHL. Regarding the outcome, NHL patients who died had significantly lower levels of *PRF1* expression than those who remained alive ($p=0,0474$). When analysed chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients, no statistically significant difference in any of the genes evaluated. The data found here can contribute to new studies about the genes evaluated, as well as new markers with prognostic value. The understanding of tumor immunology combined with the evaluation of gene expression contributes to a better understanding of the immune response pattern.

Key words: non-Hodgkin lymphoma; chronic lymphocytic leukemia; transforming growth factor beta (*TGFβ*); forkhead box P3; inhibitory immune factors; cytotoxic proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Mecanismos efetores dos linfócitos T CD8+.....	19
Figura 02 - Mecanismos supressores das Tregs.....	20
Figura 03 - Representação esquemática de sinalização da via TGF- β	22
Figura 04 - Mecanismo de inibição de CTLA-4 e PD-1/PD-L1.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Lista de códigos das sondas TaqMan a serem utilizadas no experimento	30
Tabela 02	Características clínicas e diagnósticas dos pacientes com linfoma não-Hodgkin	31
Tabela 03	Características clínicas e diagnósticas dos pacientes com leucemia linfocítica crônica	32
Tabela 04	Valores das medianas obtidas da expressão relativa dos genes <i>FoxP3</i> , <i>TGF-β</i> , <i>PD1</i> , <i>PDL1</i> , <i>CTLA-4</i> , <i>PRF1</i> e <i>GZMB</i> obtidas nos grupos de indivíduos controle, pacientes com LNH e com LLC.	33
Tabela 05	Comparação dos valores obtidos da expressão relativa dos genes <i>FoxP3</i> , <i>TGF-β</i> , <i>PD1</i> , <i>PDL1</i> , <i>CTLA-4</i> , <i>PRF1</i> e <i>GZMB</i> de pacientes com LNH e com LLC em relação ao desfecho clínico.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT β : beta actina

APCs: células apresentadoras de antígenos

Buffy-coat: camada leucoplaquetária

B7: do inglês *B7 protein* - proteína B7

°C: graus centígrados

CD: do inglês *cluster of differentiation – clone de diferenciação*

cDNA: DNA complementar

Células NK: células *Natural Killer*

CT: do inglês *cycle threshold* – ciclo de threshold

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

Δ CT: do inglês Δ *cycle threshold* – ciclo de threshold

DNA: ácido desoxirribonucléico

Dnase: desoxirribonuclease

Dnase 1: desoxirribonuclease 1

dNTP mix: do inglês *deoxynucleotide trifosfato mix* – mistura de deoxinucleotídeos trifosfato

Downstream: do inglês *para baixo*

EDTA: do inglês *ethyleneamine tetraacetic acid* – ácido etilenodiamino tetra-acético

FoxP3: do inglês *forkhead box P3*

g: gravidade

GZMB: granzima B

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

IL-2R: do inglês *interleukin-2 receptor* – receptor de interleucina 2

IL-4R: do inglês *interleukin-4 receptor* – receptor de interleucina 4

IL-6: do inglês *interleukin-6* - interleucina 6

IL-6R: do inglês *interleukin-6 receptor* - receptor de interleucina 6

IL10R: do inglês *interleukin-10 receptor* - receptor de interleucina 10

IL-13R: do inglês *interleukin-13 receptor* - receptor de interleucina 13

IL-21: do inglês *interleukin-21* - interleucina 21

IL-23R: do inglês *interleukin-23 receptor* - receptor de interleucina 23

INF α : interferon alfa

INF γ : interferon gama

iTregs: do inglês *induced Tregs* – células T reguladoras induzidas

LLC: leucemia linfocítica crônica

LNH: linfoma não-Hodgkin

LTCs: linfócitos T citotóxicos

M: molar

MHC II: do inglês *major histocompatibility complex* – complexo principal de histocompatibilidade classe II

μL: microlitro

MM: mieloma múltiplo

MnCl₂: cloreto de manganês

MultiScribe Reverse Transcriptase – do inglês *Reverse Transcriptase Multiscribe*– Transcriptase Reversa Multiscribe.

nTregs: do inglês *natural Tregs* – células T regs naturais

Nuclease Free H₂O, do inglês - H₂O livre de nuclease

PCR em tempo real: do inglês *Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

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 1

PD-L2: do inglês *programmed death-ligand 2* - ligante do receptor de morte programada 2

PRF1: perforina

qPCR: do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

%: porcentagem

RNA lather solution, do inglês solução estabilizadora de RNA

RORγt: do inglês *Retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma* – receptor ácido retinóico relacionado ao receptor nuclear gama órfão.

RT Buffer: do inglês *transcriptase reverse buffer* – tampão da transcriptase reversa

RT Random Primers: do inglês *Reverse Transcriptase Random Primers* – iniciadores da Transcriptase Reversa

SHP-1: do inglês *domain-containing protein tyrosine phosphatase 1*– domínio contendo proteína tirosina fosfatase 1

SHP-2: do inglês *domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*– domínio contendo proteína tirosina fosfatase 2

SMAD: do inglês *SMAD protein* – proteína SMAD

TCLE: termo de consentimento livre e esclarecido

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

TGF β : do inglês *transforming growth factor beta* - fator de transformação do crescimento β

Th17: do inglês *T helper 17* - Linfócitos T CD4⁺ auxiliares 17

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

Treg: células T reguladoras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 DESENVOLVIMENTO	16
2.1 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1.1 Neoplasias linfoproliferativas - linfoma não-Hodgkin e leucemia linfocítica crônica	16
2.1.2 Atuação de linfócitos T reguladores sobre a resposta mediada por linfócitos citotóxicos	17
2.1.3 Células T reguladoras nas neoplasias	19
2.1.4 Atuação de fatores inibitórios nas neoplasias	20
2.1.4.1 <i>Fator de transformação de crescimento β (TGF-β)</i>	20
2.1.4.2 <i>Receptor do linfócito T citotóxico associada ao antígeno 4 (CTLA-4) e proteína programada de morte celular (PDI)</i>	22
3 HIPÓTESE	24
4 JUSTIFICATIVA	25
5 OBJETIVOS	26
5.1 OBJETIVO GERAL	26
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6 METODOLOGIA	27
6.1 DELINEAMENTO E CASUÍSTICA	27
6.1.1 Critérios de inclusão para pacientes	27
6.1.2 Critérios de exclusão para pacientes	27
6.1.3 Critérios de inclusão para grupo controle	27
6.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle	27
6.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	28
6.2.1 Coleta de sangue periférico e preparação das amostras	28
6.2.2 Avaliação da expressão gênica	28
6.2.2.1 <i>Extração do ácido ribonucleico</i>	28
6.2.2.2 <i>Transcrição reversa</i>	29
6.2.2.3 <i>PCR quantitativa</i>	29
6.2.2.4 <i>Análise estatística</i>	30

7 RESULTADOS	31
7.1 CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA	31
7.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>FoxP3</i> , <i>TGF-β</i> , <i>PDI</i> , <i>PDL1</i> , <i>CTLA-4</i> , <i>PRF E GZMB</i> EM PACIENTES COM LNH E LLC	32
7.3 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AVALIADOS COM O DESFECHO	33
8 DISCUSSÃO	35
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
10 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	46
ANEXO B – ARTIGO	47
ANEXO C – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	59

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a estimativa para cada ano é de 12.030 novos casos de linfoma não – Hodking, sendo 6.580 homens e 5.450 mulheres (INCA, 2020). O aumento da expectativa de vida associado às elevadas taxas de incidência e mortalidade relacionadas às neoplasias indica a necessidade de se realizar pesquisas e ações para o melhor entendimento do desenvolvimento destas doenças.

Células tumorais são capazes de modificar a resposta imune através da expressão e ativação de receptores inibitórios, os quais induzem as células efetoras à exaustão funcional e irresponsividade, favorecendo desenvolvimento e manutenção das células tumorais (BAITSCH *et al.*, 2012; KARACHALIOU *et al.*, 2015).

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 tumoral (SOUZA *et al.*, 2018). Estudos prévios tem demonstrado que a presença de células neoplásicas em determinado microambiente, inibe resposta imune através da produção de fatores, como fator de transformação do crescimento β (TGF- β 1), em prol da evasão da vigilância das células T (WANG, 2021).

O marcador de morte celular programada 1 (*PDI*, do inglês *programmed death 1*) é expresso em células B e T ativadas. Os genes *PDL1* e *PDL2* (do inglês *programmed death 2*) tem sido expressos por vários tipos de tumores. O principal ligante de PD1, conhecido como ligante do receptor de morte programada 1 (PDL1, do inglês *programmed death-ligand 1*), é tipicamente expresso em um grupo de macrófagos, mas pode ser induzido por citocinas inflamatórias em vários tipos de tecidos. Quando células T ativadas expressando *PDI* encontram PDL1, as funções das células T efetoras diminuem, são impedidas de eliminar células contendo PDL1, incluindo células neoplásicas. (TAUBE *et al.*, 2014).

O checkpoint imune, linfócito T associado à proteína 4 (CTLA-4) e células Treguladoras (T_{reg}) desempenham função essencial em impedir a imunidade anticancer. Células T reg, as quais constitutivamente expressam CTLA-4 suprimem as células apresentadoras de antígenos (APCs) através da depleção de citocinas estimulatórias do sistema imune, produzindo citocinas imunossupressivas. Moléculas de CTLA-4 se ligam com alta afinidade à CD80 e CD86 em relação à CD28 e atua como inibidoras competitivas de CD28 em APCs (SOBHANI, 2021).

Além da atuação destes fatores na resposta imune contra as neoplasias, destaca-se o papel de linfócitos T reguladores (Treg). São fundamentais na imunomodulação da resposta imune à patógenos, alérgenos, células cancerígenas e antígenos próprios, além de exercerem

função na manutenção da tolerância periférica (CHEN *et al.*, 2003; MELO, 2009; PAN, 2017). No presente estudo, destaca-se sua função de indução da supressão das células T efectoras, através do bloqueio da ativação e função destes linfócitos. Foi observado que células Treg desempenham um papel importante na promoção de um microambiente imunoprivilegiado ao tumor, promovendo assim a sua progressão (ZOU *et al.*, 2001) e o número e distribuição de Treg no microambiente do tumor está correlacionado com a progressão clínica (CURIEL *et al.*, 2004).

Devido à complexidade dos ciclos de indução e inativação celular, torna-se viável e necessário compreender os mecanismos de atuação destas moléculas em relação às células de defesa, síntese de proteínas citolíticas, além da ação e controle do processo através de células reguladoras especializadas.

Diante destes dados, consideramos ser importante o estudo da correlação entre o papel imunomodulador de células Tregs e a atividade dos linfócitos citotóxicos em pacientes diagnosticados com neoplasias linfoproliferativas. Em vista disso, este estudo pretende avaliar e comparar a expressão gênica de fatores inibitórios, como o *TGFβ*, *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, a expressão do fator de transcrição específico de linfócitos Tregs, do inglês *Forkhead* (*FoxP3*) e a expressão dos genes que codificam a perforina e a granzima B, que são as principais moléculas efectoras dos linfócitos citotóxicos. É importante ressaltar que a regulação de expressão de *FoxP3* ocorre através de mecanismos de controle epigenéticos (LU, 2017).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Neoplasias linfoproliferativas - linfoma não-Hodgkin e leucemia linfocítica crônica

A primeira descrição de tumores originados do tecido linfático foi realizada em 1832, por Thomas Hodgkin. Em 1865, esses tumores passaram a ser denominados doença de Hodgkin. Posteriormente, percebeu-se que alguns tumores dos tecidos linfáticos apresentavam características morfológicas diferentes da doença de Hodgkin, recebendo a denominação de linfomas não-Hodgkin, para distingui-los daqueles originariamente descritos (AISENBERG, 2000).

Os linfomas não-Hodgkin (LNH) são neoplasias linfoides originadas de populações de células B, T ou Natural Killer (NK), cujo comportamento clínico e história natural da doença dependem do subtipo do linfoma de acordo com a classificação e estadiamento utilizados (ARMITAGE, 1998; VOSE *et al.*, 2002). O LNH abrange um espectro diverso de cânceres do sistema imune que são decorrentes da malignização de um linfócito localizado nos gânglios linfáticos ou linfonodos. É a malignidade hematológica mais comum no mundo, correspondendo a aproximadamente 5,1% das malignidades hematológicas e 2,7% de todas as mortes pela doença (FERLAY *et al.*, 2012; BOFFETTA, 2011).

Conceitualmente, o LNH difere-se do linfoma de Hodgkin pela ausência das células mononucleares de Hodgkin e multinucleadas de Reed-Sternberg, por um menor número de células inflamatórias e por não possuir um tipo celular característico, com expressiva heterogeneidade morfológica, imunofenotípica e genética. (VAN DER WAAL *et al.*, 2005; ARMITAGE *et al.*, 2017).

Diagnóstico é feito por exame anatomo-patológico com imunohistoquímica. Recomenda-se biópsia incisional ou excisional do tecido, ao invés de biópsia aspirativa por agulha fina. (CHESON, 2014). Em aproximadamente 85% dos casos, a célula maligna possui fenótipo de célula B, mas também pode apresentar fenótipo de célula T ou NK, o que é determinado por imunofenotipagem e/ou estudos de rearranjo gênico (VAN DER WAAL *et al.*, 2005; ARMITAGE *et al.*, 2017).

Os LNH podem ser classificados clinicamente de acordo com a capacidade de proliferação da célula malignizada como indolente ou agressivo. O LNH indolente apresenta quadro clínico crônico, células neoplásicas pequenas associadas à baixo índice proliferativo, formação de grandes massas tumorais nos linfonodos ou regiões extranodais, além de apresentarem baixa agressividade. Diferentemente, os LNHs agressivos apresentam quadro

clínico agudo, células neoplásicas grandes com alto índice proliferativo e linfonodomegalias localizadas (ZAGO *et al.*, 2014).

A leucemia linfocítica crônica (LLC) é uma neoplasia hematológica derivada de uma população de linfócitos B maduros localizados na zona do manto dos folículos linfóides. Trata-se de uma doença em que as taxas de proliferação celular não são acompanhadas por taxas semelhantes de apoptose, resultando em acúmulo das células neoplásicas em linfonodos, medula óssea e sangue periférico (GARICOCHEA, 2005; XIAO *et al.* 2020). Sua etiologia ainda não está totalmente elucidada, porém fatores genéticos podem exercer certa influência no seu surgimento.

Na LLC, o diagnóstico é feito quando o paciente apresenta linfocitose persistente acima de $10 \times 10^9/L$ e linfocitose $> 40\%$ no mielograma, independente da presença ou não de linfonodo, hepato e/ou esplenomegalia, anemia e/ou plaquetopenia. Raramente, pode se apresentar apenas como tumor nodal ou extranodal, sem infiltração medular e linfocitose periférica (LORAND-METZE, 2005).

Juntamente com o quadro clínico e os dados do hemograma, a imunofenotipagem é a principal avaliação diagnóstica e permite o diagnóstico diferencial com as outras síndromes linfoproliferativas. Os linfócitos da LLC expressam CD19, CD5, CD23 e, fracamente, imunoglobulinas de superfície com caráter clonal. Estes achados permitem o diagnóstico diferencial de outros linfomas B leucemizados (MULLER-HERMELINK *et al.*, 2001).

O curso clínico da LLC é bastante variável. Progride desde linfocitose indolente, sem outras manifestações, até infiltração de órgãos linfóides como linfonodos, fígado, baço e medula óssea, com conseqüente linfonodomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia e citopenia no sangue periférico (CHIATTONE, 2005).

Alguns pacientes são assintomáticos e sobrevivem por longos períodos sem a necessidade de terapia, enquanto outros evoluem rapidamente requerendo tratamento agressivo.

2.1.2 Atuação de linfócitos T reguladores sobre a resposta mediada por linfócitos citotóxicos

Células Treg são um grupo de células T $CD4^+$ as quais inibem respostas imunológicas envolvidas nas respostas fisiológicas. Existem duas categorias de linfócitos Treg: as que surgem naturalmente no timo, sendo $CD4^+CD25^+$ - nTregs (do inglês *natural Treg*); e as iTreg (do inglês *induced Treg*) que são induzidas por TGF- β e produzidas na periferia (MELO, 2009). Os mecanismos utilizados pelas mesmas são: citocinas, morte celular, modulação do microambiente e receptores de superfície (GUZMÁN-FLORES, 2013).

O fator de transcrição *Forkhead (FoxP3)* é especificamente expresso em linfócitos Treg CD4⁺CD25⁺, cuja função é exercida sobre regiões reguladoras específicas do DNA (MELO, 2009). É o principal fator de transcrição específico na diferenciação das iTreg (YAGI *et al.*, 2004; YOSHIMURA; MUTO, 2011). *FoxP3* é induzido *downstream* na sinalização de TGF- β , após a interação com TCR (CHEN *et al.*, 2003; YOSHIMURA; MUTO, 2011). FoxP3 estabiliza o fenótipo supressor e capacidades de Treg. Mutações ou gene knockout para *FoxP3* resulta em condições linfoproliferativas fatais e em patologias secundárias autoimunes em relação à ativação incontrolada de células TCD4⁺ (PALUSKIEVICZ, 2019).

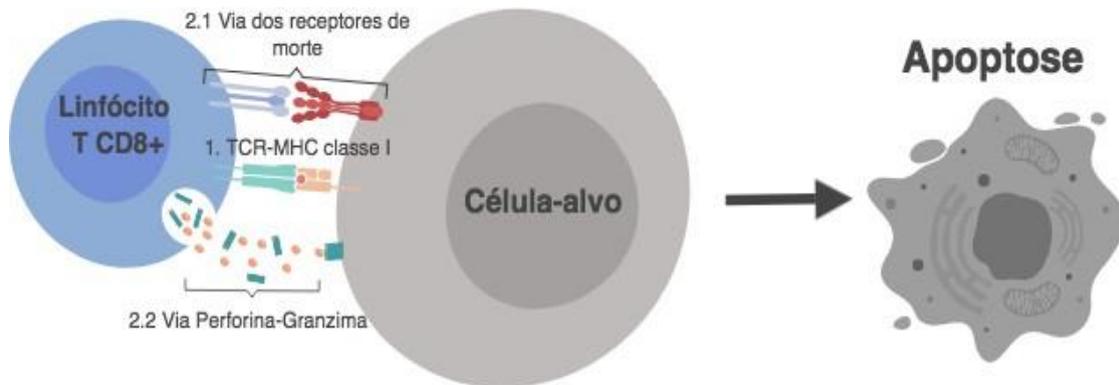
Devido presença destas células, estudos sugerem ocorrência de co-estimulação deficiente das células T CD4⁺ sobre as células T CD8⁺, bem como alteração na citotoxicidade mediada por células NK contra os antígenos tumorais (MELO, 2009).

O principal meio utilizado pelos linfócitos citotóxicos T CD8⁺ e pelas células *Natural Killer* (NK) para promover apoptose das células tumorais é a exocitose de proteínas citolíticas, como a perforina, uma proteína disruptora de membrana, e da granzima B, uma serino-protease (SMYTH E TRAPANI, 1995).

Em trabalho anterior realizado por nosso grupo de pesquisa em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH), foi identificado que a expressão da perforina difere entre as células LTCs e NK dos pacientes, com sua produção correlacionada à agressividade da doença. Atribuímos à resposta de células efetoras, maior expressão gênica de perforina e granzima B nos pacientes com LNH, em relação às células tumorais, ou seja, maior ativação celular e consequente aumento da expressão desses genes (SOUZA *et al.*, 2018).

Acredita-se que a expressão da perforina pode ser usada como um biomarcador prognóstico. Em casos de câncer de pulmão em estágio avançado, o maior número de LTCs que expressam perforina foi positivamente associado ao aumento da sobrevida (XU *et al.*, 2015) e o comprometimento da resposta imune de pacientes com linfoma difuso de grandes células foi correlacionado com um número menor de linfócitos efetores e pior prognóstico (CHANG *et al.*, 2018). Em nosso trabalho acima citado, observamos que a menor sobrevida dos pacientes estava claramente relacionada à diminuição da expressão gênica de perforina e granzima B, demonstrando que a resposta imune prejudicada nesses indivíduos foi responsável pela pior evolução da doença (SOUZA *et al.*, 2018). A atuação de linfócitos TCD8⁺ e seus mecanismos efetores podem ser visualizados na **Figura 01**.

Figura 01 - Mecanismos efetores dos linfócitos T CD8+

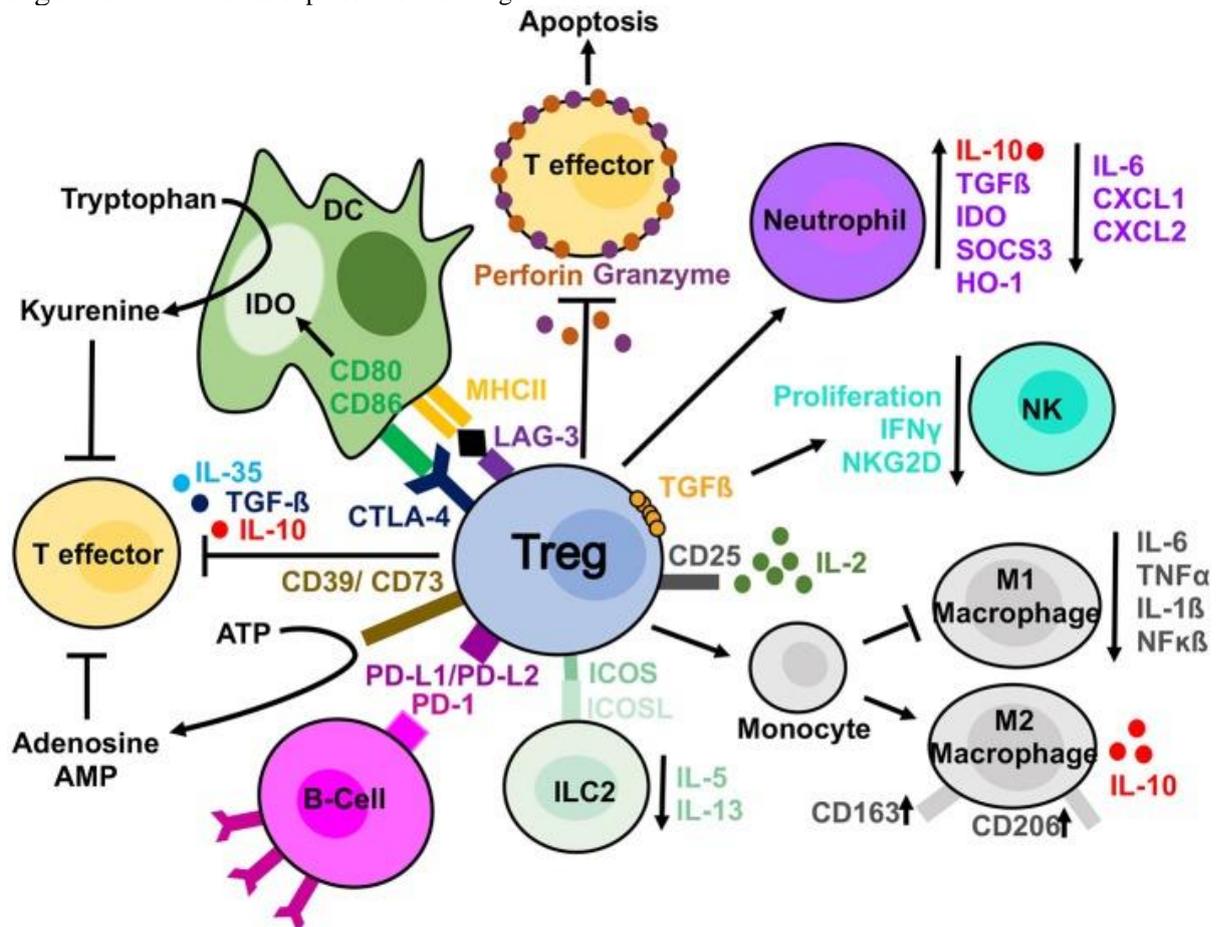


Fonte: VAN DEN BRINK MRM; BURAKOFF SJ, 2002.

2.1.3 Células T reguladoras nas neoplasias

Evidências demonstram a importância das diferentes populações de linfócitos T reguladores (Treg) na manutenção da autotolerância imunológica e controle de doenças (CHEN *et al.*, 2003). Tregs na circulação sanguínea são consideradas heterogêneas, tal fato é devido sua plasticidade e capacidade de adquirir recursos específicos para o tipo de resposta imune controladas pelas mesmas. Células Tregs aumentam drasticamente em resposta à estágios precoces do tumor maligno e no crescimento deste. No microambiente tumoral, Tregs podem suprimir a atividade de linfócitos T citotóxicos através de uma diversidade de mecanismos supressores (**Figura 02**) (ROMERO *et al.*, 2019; SOBHANI, 2021). A presença destas células parece modificar significativamente o desfecho clínico em neoplasias hematológicas, particularmente em linfomas (HUS *et al.*, 2017).

Figura 2 – Mecanismos supressores das T regs.



Fonte: ROMANO M; FANELLI G; ALBANY CJ; GIGANTI G; LOMBARDI G., 2018.

O aumento na frequência de células Treg foi observado em sangue periférico de pacientes com carcinoma brônquico, em comparação com indivíduos saudáveis (WOO *et al.*, 2001). Resultados similares foram relatados em pacientes com outros de tipos de cânceres, como por exemplo em linfomas foliculares, onde elevados níveis de Treg no sangue periférico antes da terapia foram associados à diminuição da progressão livre de sobrevida (VOO *et al.*, 2014).

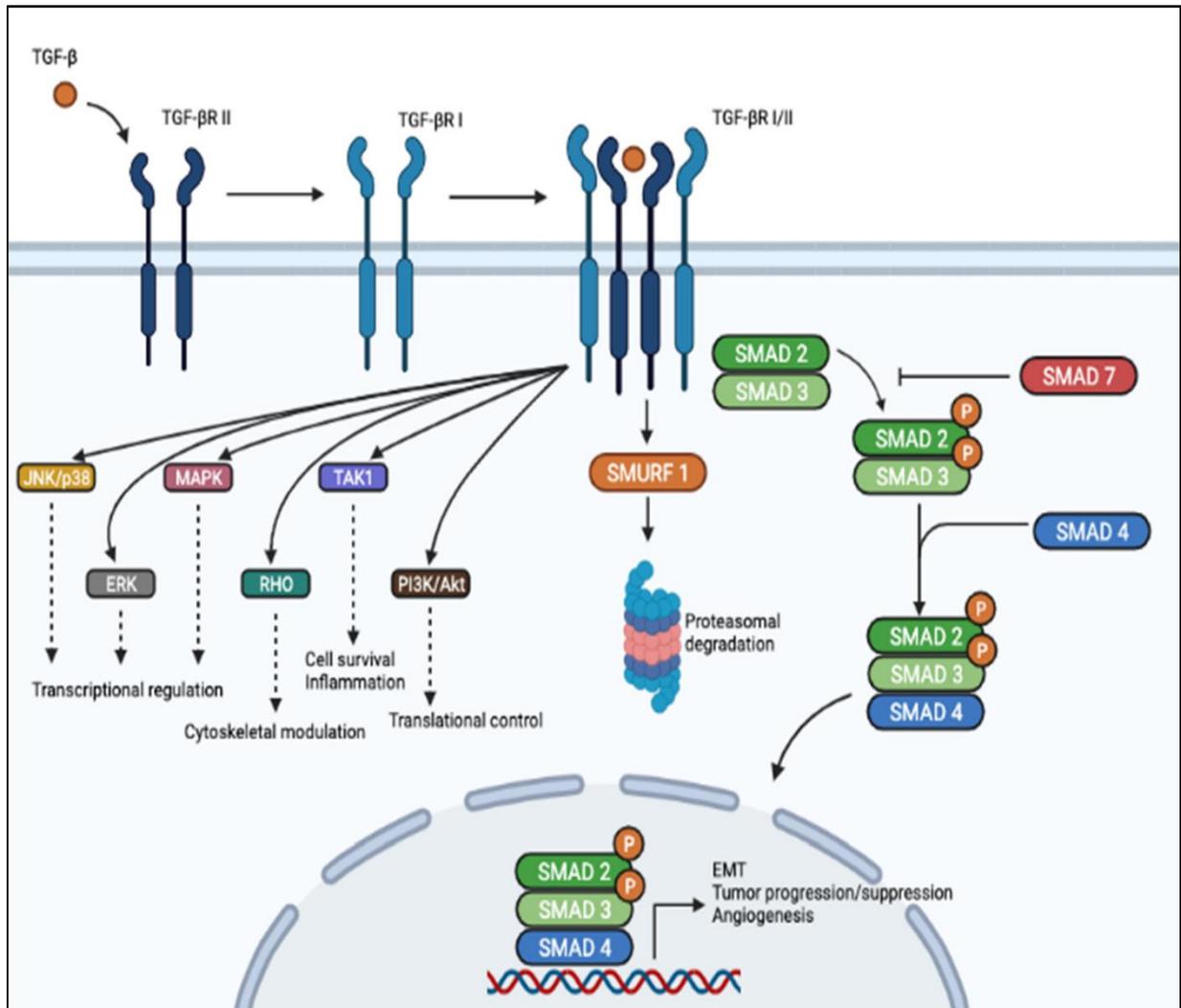
2.1.4 Atuação de fatores inibitórios nas neoplasias

Fatores inibitórios atuam em prol do escape da célula tumoral e impedem apoptose desta.

2.1.4.1 Fator de transformação de crescimento β (TGF- β)

TGF- β é uma citocina multifuncional crucial na sinalização de Th17, mas também tem papel importante no desenvolvimento das células iTreg, sendo estas duas linhagens relacionadas antagonicamente (VELDHOEN *et al.*, 2006; VOLPE *et al.*, 2008, KIM *et al.*, 2021). TGF- β , em altas concentrações, pode direcionar a diferenciação celular para o perfil de iTreg (célula T reguladora induzida) através da ativação de FOXP3 (CHEN *et al.*, 2003; ZHOU

et al., 2008). No entanto, em baixas concentrações e na presença de IL-6, TGF- β induz o desenvolvimento de Th17 por ativação de ROR γ t, produção de IL-21 e *up*-regulação na expressão de IL-23R (BETTELLI *et al.*, 2006; VELDHOEN *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2008). Nas neoplasias, como supressor tumoral, TGF- β induz efeito citostático e apoptótico em células normais e pré-malignas (SABADDINI, 2021). Como promotora tumoral, a via de sinalização TGF- β estimula proliferação celular, migração, angiogênese, invasão e supressão da imunovigilância (MELO, 2009). As células na LLC expressam uma série de receptores de citocinas, denominados receptores de interleucinas — IL-2R, -4R, -6R, -10R, -13R e também receptores de necrose tumoral alfa (TNFA) interferon alpha (INFA) e gama (INFG) e também para fator de crescimento tumoral beta (TGFB). TGF β na via canônica ativa, permite apoptose tumoral, sendo importante na carcinogênese (MATVEEVA, 2017). Estudos propõem que altos níveis de 90K, uma proteína relacionada ao contexto de atuação de TGF β , pode ser capaz de induzir mudanças no microambiente celular que predispõe à motilidade de células e progressão neoplásica (GRASSADONIA, 2021). Em tumores gastrointestinais, mutação como aquisição de perda de função de elementos na via de TGF- β , como as proteínas SMAD e receptores de TGF- β tem demonstrado contribuir para mudança de função de supressora tumoral para promotora tumoral, permitindo crescimento das células tumorais em um microambiente enriquecido por TGF- β (BATLLE, 2019). A representação esquemática da sinalização da via TGF- β está evidenciada na **Figura 03**.

Figura 03- Representação esquemática de sinalização da via TGF- β 

Fonte: SABBADINI F.; *et al.*, 2021.

2.1.4.2 Receptor do linfócito T citotóxico associada ao antígeno 4 (CTLA-4) e proteína programada de morte celular (PD1)

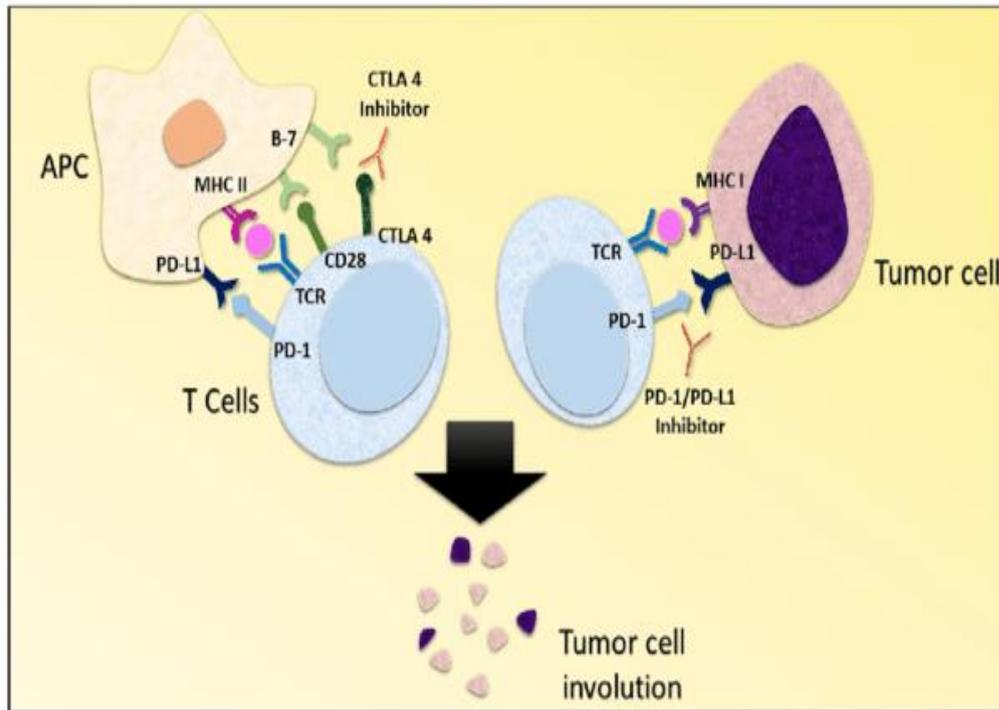
É importante destacar o mecanismo de inibição de CTLA-4 e PD1/PDL1. A ativação de células T é mediada pela interação de receptor de célula T e o receptor CD28 com complexo maior de histocompatibilidade classe II (MHC II) e a molécula coestimulatória localizada nas células apresentadoras de antígenos. (CHEN *et al.*, 2017).

A interação de CTLA-4 com a molécula B7 resulta em sinal inibitório, assim como a regulação de células T resultante da interação de PD1/PDL1. Associação PD1 e PDL1 promove recrutamento de fosfatases SHP-1 e SHP-2, com consequente diminuição de sinal TCR e liberação de sinais inibitórios sobre LTCs e células NK, impedindo sua ação citotóxica tumoral (SPRANGER e SPAAPEN, 2013; LIAO, *et al.*, 2018; TAUBE, *et al.*, 2014)

Foi observado que células Tregs intratumorais expressam altos níveis de moléculas

CTLA-4 e PD1 em linfonodos pancreáticos drenados do tumor e em linfonodos inguinais periféricos (JANG *et al.*, 2017). Situações como essas já foram evidenciadas em linfomas de células T e linfomas de células NK (BUCHBINDER E DESAIA, 2016; LIAO *et al.*, 2018). A **Figura 04** retrata mecanismo de inibição de CTLA-4 e PD1/PDL1.

Figura 04 – Mecanismo de inibição de CTLA-4 e PD1/PDL1



Fonte: Chae, Y.K; *et al.*, 2018.

3 HIPÓTESE

O principal mecanismo de escape das células tumorais ocorre através da superexpressão de ligantes de receptores de checkpoints nestas células ou células adjacentes, podendo induzir a liberação de sinais que atuam diretamente sobre as células de defesa, como um sinal inibitório, permitindo que as células T se tornem nérgicas ou vão à exaustão. Diante disso, acredita-se que níveis alterados na expressão gênica de fatores imunes relacionados ao escape tumoral e à apoptose, estejam envolvidos com a progressão e gravidade das doenças linfoproliferativas crônicas.

4 JUSTIFICATIVA

O estudo da expressão gênica de marcadores celulares capazes de estimular ou inibir a resposta imune é determinante para entendimento do comportamento e acompanhamento evolutivo ou remissivo das neoplasias. Uma vez que TGF- β é capaz de direcionar a diferenciação celular para o perfil de iTreg por meio da ativação de FoxP3, pensamos que esta citocina estaria envolvida neste processo de inibição dos linfócitos citotóxicos. Além disso, é crucial avaliar a expressão de fatores também correlacionados com mecanismos inibitórios, como *CTLA-4*, *PDI* e *PDL1*.

Assim, a investigação dos fatores que podem inibir as células efectoras, com o detalhamento deste processo, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos imunológicos de resposta à células tumorais, especialmente nos casos das neoplasias linfoproliferativas.

5 OBJETIVOS

Compreendem objetivo geral e objetivos específicos abaixo descritos.

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão gênica de *TGF- β* , *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF*, *GZMB* em pacientes com LNH e LLC.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Quantificar e comparar a expressão gênica de *TGF- β* , *FoxP3*, *PDI*, *PDL1* e *CTLA4* em pacientes com LNH e LLC.

Quantificar e comparar a expressão gênica de *PRF1* e *GZMB* em pacientes com LNH e LLC.

Comparar a expressão de *TGF- β* , *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF* e *GZMB* em relação ao subtipo de LNH.

Comparar dos valores obtidos da expressão relativa dos genes *TGF- β* , *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* e *GZMB* de pacientes com LNH e com LLC em relação à gravidade e ao desfecho clínico.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO E CASUÍSTICA

Este projeto é um estudo primário, analítico do tipo caso-controle, de caráter biológico e observacional, e foi desenvolvido com a participação consciente e voluntária de todos os pacientes com LNH ou LLC atendidos no Serviço de Onco-Hematologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (HC-UFTM) no período de julho de 2019 à junho de 2021. Também foram incluídos no estudo indivíduos saudáveis para compor o grupo controle dos experimentos.

6.1.1 Critérios de inclusão para pacientes

Foram incluídos no presente estudo indivíduos com diagnóstico de LNH ou LLC confirmado no HC-UFTM, com idade igual ou superior a 18 anos.

6.1.2 Critérios de exclusão para pacientes

Foram excluídos indivíduos que realizam tratamento quimioterápico antes da abordagem pela equipe de pesquisadores.

6.1.3 Critérios de inclusão para grupo controle

Foram incluídos no grupo controle indivíduos maiores de 18 anos

6.1.4 Critérios de exclusão para grupo controle

Indivíduos com histórico de neoplasias, doenças autoimunes ou infecciosas crônicas ou ativas no momento do recrutamento foram excluídos.

6.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, sob o número de parecer 2.555.435 (CAAE 70610416.9.0000.5154) e todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

6.2.1 Coleta de sangue periférico e preparação das amostras

Após a aplicação do TCLE, foram coletados 5mL 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 LLC foi realizada após a confirmação do diagnóstico e antes que os pacientes iniciassem o protocolo padrão de tratamento quimioterápico, caso fosse indicado pelo médico responsável.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico e Pesquisas Hematológicas e Hemoterápicas, 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).

6.2.2 Avaliação da expressão gênica

6.2.2.1 Extração do ácido ribonucleico (RNA)

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit de extração SV Total RNA Isolation System® (Promega, Madison, EUA). Para o protocolo de extração, inicialmente foi realizado o descongelamento das células 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 de lise de hemácias 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, 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 foi transferido a novos tubos estéreis.

Subsequentemente, foi realizada a transferência da solução recém lisada para tubos de microcentrífuga e 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 e centrifugadas a uma velocidade de 12.000g por 1 minuto em temperatura ambiente. O eluato foi descartado e em seguida 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, 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 adicionados 200µL “*DNase Stop Solution*” na coluna. O material foi centrifugado a 12.000g por 1 minuto em temperatura ambiente e ao final da centrifugação, todo o volume presente no interior dos tubos foi descartado.

Após esta etapa foi adicionado 250µL de “*RNA Wash Solution*” e centrifugado a 14.000g por 2 minutos em temperatura ambiente. As colunas 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. O eluato obtido contendo RNA extraído foi armazenado em freezer -80°C até a sua utilização.

6.2.2.2 *Transcrição reversa*

Posteriormente à extração do RNA, foi realizada a transcrição reversa do material obtido, utilizando-se o kit *High-Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). A reação de transcrição reversa foi realizada a partir da confecção 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 10µL de RNA total de cada amostra a um volume de 10µL do mix preparado. Os tubos foram submetidos às seguintes condições: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) para a produção do cDNA (DNA complementar).

6.2.2.3 *PCR quantitativa (qPCR)*

A quantificação relativa dos genes de interesse nas amostras de cDNA foi realizada 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. A lista de códigos das sondas TaqMan utilizadas no experimento está representada a seguir na **Tabela 01**.

Tabela 01 - Lista de códigos das sondas TaqMan utilizadas no experimento.

Gene de interesse	Código das sondas TaqMan
<i>FoxP3</i>	<i>Hs01085834_m1</i>
<i>TGFβ</i>	<i>Hs00998133_m1</i>
<i>PRF1</i>	<i>Hs00169473_m1</i>
<i>GZMB</i>	<i>Hs01554355_m1</i>
<i>PD1</i>	<i>Hs01550088_m1</i>
<i>PDL1</i>	<i>Hs00204257_m1</i>
<i>CTLA4</i>	<i>Hs00175480_m1</i>
<i>ACTB</i>	<i>Hs99999903_m1</i>

Fonte: Applied Biosystems®, Foster City, EUA.

Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, EUA), seguindo as orientações do fabricante. Em tubos estéreis foram adicionados 5,0μL de master mix, 0,5μL de sonda TaqMan e 200ng de cDNA. As placas foram seladas com MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems®, Foster City, EUA) e conduzidas ao termociclador em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, EUA). As condições de termociclagem foram: 95°C por 2 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Os valores de expressão gênica foram calculados pelo método de quantificação relativa (RQ) com a fórmula $2^{-\Delta CT}$, sendo $\Delta CT = CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{beta-actina}}$.

6.2.2.4 Análise Estatística

Após análise de normalidade das amostras por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, foi realizada a comparação dos níveis de expressão gênica com o teste t-student não pareado para amostras com distribuição normal e os testes Mann Whitney ou Kruskal-Wallis para amostras com distribuição não-normal. Foi utilizado o software SigmaStat versão 3.5 (Systat Software Inc, GmbH, Alemanha). O nível de significância estatística considerado foi de p menor que 0,05.

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERÍSTICA DA AMOSTRA

Foram avaliados neste estudo 20 pacientes com LNH (mediana 70 anos, 42-92 anos), sendo na sua maioria mulheres. Em relação à gravidade, sete pacientes eram classificados como indolente e 13 pacientes como LNH agressivo (**Tabela 02**).

Tabela 02 - Características clínicas e diagnósticas dos pacientes com LNH.

Identificação	Sexo	Idade	Subtipo	Progressão da doença	Desfecho
LNH 01	Masculino	74	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Vivo
LNH 02	Feminino	74	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Óbito
LNH03	Feminino	83	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Óbito
LNH 04	Masculino	92	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Vivo
LNH 05	Feminino	68	Tecido linfóide associado à mucosa Linfoma de MALT	Indolente	Vivo
LNH 06	Masculino	70	Linfoma cutâneo de células T	Agressivo	Óbito
LNH 07	Feminino	NI	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Vivo
LNH 08	Masculino	71	Linfoma anaplásico de grandes células	Agressivo	Vivo
LNH 09	Masculino	63	Linfoma de células do Manto	Agressivo	Óbito
LNH 10	Feminino	75	Linfoma de zona marginal	Indolente	Vivo
LNH 11	Masculino	47	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Vivo
LNH 12	Masculino	60	Linfoma angioimunoblástico de células T	Agressivo	Óbito
LNH 13	Feminino	54	Linfoma tipo MALT com transformação Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Óbito
LNH 14	Feminino	68	Micose Fungóide	Indolente	Vivo
LNH 15	Feminino	NI	Linfoma linfocítico de pequenas células	Indolente	Vivo
LNH 16	Masculino	70	Linfoma linfocítico de pequenas células	Indolente	Vivo
LNH 17	Feminino	NI	Linfoma anaplásico de pequenas células	Agressivo	Vivo
LNH 18	Feminino	63	Linfoma folicular	Indolente	Vivo
LNH 19	Feminino	42	Linfoma difuso de grandes células B	Agressivo	Vivo
LNH 20	Feminino	80	Linfoma linfocítico de pequenas células	Indolente	Vivo

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2021

Legenda: LNH: Linfoma não-Hodgkin; NI: não informado.

Também foram avaliados 14 pacientes com LLC (mediana 67 anos, 48-90 anos), em sua maioria homens. Os pacientes com LLC eram monitorados periodicamente, mas sem intervenção terapêutica (**Tabela 03**).

Tabela 03 - Características clínicas e diagnósticas dos pacientes com LLC.

Identificação	Sexo	Idade	Patient management	Desfecho
LLC 01	Masculino	81	Monitoramento	Vivo
LLC 02	Masculino	55	Diagnóstico Inicial	Óbito
LLC 03	Masculino	70	Diagnóstico Inicial	Vivo
LLC 04	Masculino	73	Diagnóstico Inicial	Vivo
LLC 05	Masculino	90	Monitoramento	Óbito
LLC 06	Feminino	72	Monitoramento	Vivo
LLC 07	Masculino	68	Monitoramento	Óbito
LLC 08	Masculino	60	Monitoramento	Vivo
LLC 09	Feminino	65	Monitoramento	Vivo
LLC 10	Feminino	48	Diagnóstico Inicial	Vivo
LLC 11	Feminino	78	Diagnóstico Inicial	Vivo
LLC 12	Masculino	60	Monitoramento	Vivo
LLC 13	Masculino	58	Diagnóstico Inicial	Vivo
LLC 14	Masculino	60	Diagnóstico Inicial	Vivo

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2021

Legenda: LLC: Leucemia Linfocítica Crônica

O grupo controle foi constituído de 12 indivíduos saudáveis (mediana 65 anos, 60-75 anos), sendo sete mulheres e cinco homens.

7.2 EXPRESSÃO GÊNICA DE *FoxP3*, *TGF-β*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF* e *GZB* EM PACIENTES COM LNH E LLC

Nos pacientes com LNH foi observada expressão significativamente menor de *TGF-β* quando comparados ao grupo controle ($p=0,041$). O mesmo não foi observado em relação aos genes *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF* e *GZMB*. Quando os pacientes com LNH foram categorizados por gravidade (indolente x agressivo), foi verificada diferença estatisticamente significativa na expressão de *PDL1* ($p=0,049$). A expressão dos outros genes não diferiu entre os grupos. Já nos pacientes com LLC, não foi observada diferença estatisticamente significativa em nenhum dos genes avaliados (**Tabela 4**).

Tabela 04 - Valores das medianas obtidas da expressão relativa dos genes *FoxP3*, *TGF- β* , *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* e *GZMB* obtidas nos grupos de indivíduos controle, pacientes com LNH e com LLC.

	n	<i>FoxP3</i>	<i>TGFβ</i>	<i>PD1</i>	<i>PDL1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>PRF1</i>	<i>GZMB</i>
Controles	12	0.0019	0.640	0.000	0.0029	0.0064	0.125	0.000
Pacientes LNH patients	20	0.0013	0.299	0.00002	0.000	0.0208	0.144	0.0928
<i>p value</i>		0.984	0.041*	0.339	0.272	0.199	0.785	0.073
LNH agressivo	13	0.0009	0.292	0.00001	0.0043	0.0203	0.205	0.0960
LNH indolente	7	0.0040	0.307	0.000	0.000	0.0278	0.0934	0.0204
<i>p value</i>		0.186	0.115	0.416	0.049*	0.331	0.314	0.168
Pacientes LLCpatients	14	0.0002	0.372	0.000	0.0075	0.000	0.0526	0.000
<i>p value</i>		0.204	0.247	0.710	0.352	0.186	0.316	0.289

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2021.

Legenda: LNH: Linfoma não-Hodgkin; LLC: Leucemia Linfocítica Crônica; *p value*: valor de p

Mann-Whitney para a comparação das medianas entre controles vs. pacientes com LNH e controles vs. pacientes com LLC. A comparação entre controles vs. LNH agressivo vs. LNH indolente foi realizada utilizando-se o teste Kruskal-Wallis.

7.3 COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES AVALIADOS COM O DESFECHO

Três dos pacientes com LLC e seis com LNH foram à obito até o final desta pesquisa. Com isso, foi avaliado se existia alguma relação da expressão destes genes estudados com a mortalidade nos pacientes. Como todos os pacientes com LNH que foram a óbito apresentavam a doença na sua forma agressiva, foram retirados da análise pacientes com LNH indolente.

De acordo com as análises, foi possível verificar que pacientes com LNH que foram a óbito apresentavam níveis de expressão de *PRF1* significativamente menores que aqueles que permaneceram vivos ($p=0.0474$). Estes pacientes também apresentavam menor expressão de *GZMB*, porém a análise não resultou em significância estatística ($p=0.0548$). Em relação à expressão dos demais genes, não foi observada diferença significativa em relação à morte, tanto em pacientes com LLC, quanto LNH (**Tabela 05**).

Tabela 05. Comparação dos valores obtidos da expressão relativa dos genes *FoxP3*, *TGF- β* , *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* e *GZMB* de pacientes com LNH e com LLC em relação ao desfecho clínico.

	n	<i>FoxP3</i>	<i>TGFβ</i>	<i>PD1</i>	<i>PDL1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>PRF1</i>	<i>GZMB</i>
Pacientes com LNH óbito	6	0.0002	0.2311	0.0000	0.0005	0.0026	0.1304	0.0043
Pacientes com LNH vivos	7	0.0013	0.4082	0.0006	0.0049	0.0213	0.3655	0.2088
<i>p value</i>		0.1917	0.4452	0.1148	0.4347	0.2343	0.0474*	0.0548
Pacientes com LLC óbito	3	0.0005	0.2413	0.0001	0.0073	0.0072	0.0424	0.0078
Pacientes com LLC vivos	11	0.0000	0.5201	0.0000	0.0119	0.0000	0.0628	0.0000
<i>p value</i>		>0.9999	0.1703	0.6484	0.8846	0.5055	0.9780	0.1209

Fonte: Elaborado pela própria autora, 2021.

Legenda: LNH: Linfoma não-Hodgkin; LLC: Leucemia Linfocítica Crônica; *p value*: valor de p

[§] Como todos os pacientes com LNH que foram a óbito apresentavam a doença na sua forma agressiva, foram retirados da análise pacientes com LNH indolente. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para a comparação das medianas. Apenas para a análise da expressão de *PRF1* nos pacientes com LNH foi utilizado o teste t não pareado, uma vez que os dados apresentavam distribuição normal. O restante dos dados apresentaram distribuição não-normal.

8 DISCUSSÃO

Células tumorais podem evadir da vigilância imune através da superexpressão de ligantes de receptores de checkpoints em células tumorais ou células adjacentes, permitindo que as células T se tornem anérgicas ou vão à exaustão (WANG *et al*; 2019). O estudo da expressão gênica de marcadores celulares capazes de estimular ou inibir a resposta imune contribui para o entendimento do comportamento evolutivo ou remissivo das neoplasias. Existem, contudo, gaps em relação ao conhecimento sobre fatores celulares extrínsecos que regulam sua expressão. Em vista disso, este estudo avaliou e comparou a expressão gênica de *FoxP3*, *TGF-β*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* e *GZMB* em pacientes com LNH e com LLC correlacionando com a gravidade e também com desfecho clínico.

O presente estudo observou que pacientes com LNH apresentaram expressão significativamente menor de *TGF-β* quando comparados ao grupo controle. Estudos têm implicado que o *TGF-β* pode induzir a exaustão das células T que leva a um declínio da proliferação e função das células T, bem como aumento da morte celular (RUBTSOY *et al*; 2007; TINOCO *et al.*, 2009). A exaustão de células T é bem caracterizada em infecções virais crônicas (GALLIMORE *et al*; 1998; BYKOVSKAJA *et al.*, 1998), entretanto tem sido observado que as células T intratumorais apresentam um perfil fenotípico e funcional semelhante ao das células T exauridas por infecção viral crônica (MUMPRECHT *et al*; 2009; AHMADZADEH *et al*, 2009; KLEIN *et al*, 2003).

Yang e colaboradores (2013) descobriram que o *TGF-β* secretado por células de linfoma e células T intratumorais atuou em células Treg aumentando a expressão de *Foxp3* em células T CD4+ e suprimiu células T auxiliares efectoras inibindo a expressão de *IFN-γ* e *IL-17* (YANG *et al*; 2013). Com isso, acreditávamos que poderia haver um aumento da expressão deste gene nos pacientes com LNH aqui avaliados. Entretanto, observamos o contrário. Uma vez que a maioria dos trabalhos relata a expressão de *TGF-β* no ambiente tumoral, acreditamos que a diferença esteja relacionada ao fato que avaliamos células do sangue periférico. Como os pacientes foram avaliados logo após o diagnóstico, com doença ativa, provavelmente a via de expressão de *TGF-β* estaria suprimida, para que células efectoras pudessem eliminar as células tumorais.

Em relação ao gene *PDL1* e à categorização por gravidade dos pacientes com LNH, foi verificada expressão significativamente maior de *PDL1* em pacientes com LNH agressivo. Foram categorizados mecanismos de escape imunológico no linfoma difuso de grandes células B através da deficiência em infiltração de células T e/ou células NK no tumor, alta expressão de *PDI* (mas não de *CTLA-4*) em células TCD8+ ou expressão de *PDL1* em células T e

macrófagos (XU-MONETTE; *et al.*; 2019). Outro trabalho avaliou duzentas e cinquenta e duas amostras de tecidos de pacientes com linfoma difuso de grandes células B. Foi estabelecida relação entre a atividade imune efetora e genes com atividade inibitória. O resultado revelou expressão de molécula efetora de células T e células NK do sistema imune correlacionadas ao marcador PD1/PDL1 no tumor associado a macrófago, consistente com perfil de células B malignas desencadeando uma dinâmica resposta checkpoint em prol da adaptação e evasão da vigilância imune (KEANE C; *et al.*, 2015).

No presente estudo, a expressão dos outros genes não diferiu entre pacientes com LNH indolente ou agressivo. Apesar de haver indícios da relação da expressão gênica de *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF* e *GZMB* em neoplasias linfoproliferativas (SONG *et al.*; 2015), não observamos diferenças significativas quando foram comparados pacientes com LNH e LLC e indivíduos saudáveis.

Através da análise da expressão de *FoxP3*, apesar de não verificarmos diferenças significativas na expressão deste entre estes grupos, os quatro pacientes que não apresentaram detecção na expressão de *FoxP3* eram linfoma agressivo. Resultados de estudos recentes demonstram através da técnica de imunohistoquímica, que a proteína Foxp3 foi expressa em diferentes níveis em tecidos LNH de grandes células tipo B, com taxa de expressão positiva de 65,7% e forte taxa de expressão positiva de 14,4%. Alta expressão de *Foxp3* foi associada com estágio tumoral 3 ou 4 (ZHAO *et al.*; 2020). Esses dados demonstram então que a resposta imune relacionada às Treg está realmente mais ativa nos pacientes com doença com proliferação celular mais intensa.

Para o gene *PDI*, diferentemente do encontrado em nosso estudo, foi relatado que níveis do mesmo estavam nitidamente elevados em células T infiltrantes no Linfoma de Hodgking (LH) (53% e 76%) em pacientes com LH em comparação com indivíduos saudáveis (XU-MONETTE *et al.*; 2018). Este mesmo estudo ressaltou que a expressão de *PDI* no sangue periférico também estava significativamente alta em pacientes com LH (esclerose nodular) em relação à pacientes com LNH-B.

É importante ressaltar que CTLA-4 é uma proteína checkpoint predominante expressa no LH clássico, mais especificamente em células T no microambiente tumoral deste linfoma, sendo este enriquecido por células T CTLA-4+ que são PD1 negativas (PATEL; *et al.*, 2019). A alta infiltração de células duplamente positivas para FoxP3/CTLA-4 está significativamente associada com pior prognóstico, enquanto pacientes com baixos níveis destas células têm maior tempo de sobrevida e progressão livre de doença (ZHAO *et al.*; 2020).

Este estudo também avaliou e comparou a expressão gênica de *FoxP3*, *TGF-β*, *PDI*,

PDL1, *CTLA-4*, *PRF1* e *GZMB* em pacientes com LLC. Em relação à avaliação da expressão gênica de *TGF-β* nestes pacientes, a expressão deste gene aqui avaliada foi semelhante à encontrada nos indivíduos saudáveis. Este fato pode ser embasado pela inativação da via canônica em células da LLC e que genes SMAD responsivos, como *BCL2L1*, *Cyclin D2* e *MYC*, são pouco regulados nas células da LLC em comparação com células B no sangue periférico de indivíduos saudáveis (MATVEEVA *et al*, 2017). Estudos mostraram que associação *PDI/PDL1* é funcionalmente ativa na LLC. Assim como expressão de *PDI*, *PDL1* na LLC/LLP não tem significância prognóstica na maioria dos estudos, mas o aumento da expressão foi associado ao pior prognóstico em uma pequena amostra analítica (XUMONETTE *et al*, 2018). Em um estudo com modelo murino na LLC, o bloqueio de PD1 aumentou modestamente a função de células T e foi insuficiente para recuperar a atividade antitumoral de células T. Em contrapartida, bloqueio precoce de PDL1 restaurou função celular TCD8+ e preveniu o desenvolvimento de LLC *in vivo* (SISKA; *et al.*, 2016).

Futuramente seria interessante aumentar o número amostral para determinar se realmente poderia ser um fator limitante desta pesquisa. Vale reforçar que os pacientes aqui avaliados não haviam iniciado tratamento quimioterápico. Isso permitiu que fossem excluídas possíveis interferências nas vias imunológicas causadas por medicação. É necessário também determinar se estudos já reportados na literatura removeram esse viés de sua análise.

Em relação à comparação da expressão dos genes avaliados com o desfecho, foi possível identificar que pacientes com LNH que foram a óbito apresentavam níveis de expressão de *PRF1* significativamente menores que aqueles que permaneceram vivos. Foi verificado que pacientes com LNH superexpressaram transcritos de perforina e granzima B em comparação com indivíduos saudáveis. Pacientes os quais tiveram expressão de ambos os genes abaixo da média apresentaram menor tempo de sobrevida (SOUZA; *et al.*, 2018).

Avanços no campo da biologia molecular, com implementação de técnicas inovadoras como citogenética e microarrays, têm permitido e contribuído para melhor compreensão de várias vias oncogênicas relacionadas aos linfomas e outras neoplasias linfoproliferativas. Desta forma, é possível ampliação de recursos diagnósticos e implementação de recursos terapêuticos disponíveis (PRATAP; 2019).

Pela complexidade da regulação da expressão gênica em relação às neoplasias linfoproliferativas e outros tumores, os dados aqui apresentados podem contribuir e implementar novos estudos sobre os genes avaliados, bem como novos marcadores com valor prognóstico. O entendimento da imunologia tumoral combinada com a avaliação da expressão gênica contribui para um melhor entendimento do padrão de resposta imune.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em uma análise geral, nosso trabalho apresentou resultados interessantes apesar do número amostral não ter sido muito satisfatório. Tal fato foi ocasionado pelo período pandêmico, no qual houve menor afluxo na captação de pacientes diagnosticados com neoplasias linfoproliferativas. Mesmo assim, o trabalho atingiu os objetivos propostos, com obtenção de resultados satisfatórios em relação à expressão dos genes elegíveis pelo estudo.

Aspiramos implementar dados sobre expressão de outros genes em relação ao assunto abordado, assim como análise de outros marcadores celulares, melhor avaliando a resposta imune frente à ação neoplásica. Ao mesmo tempo, é importante levar em consideração possíveis contribuições que o trabalho em questão possa oferecer à novas pesquisas.

10 CONCLUSÃO

No presente estudo foi encontrada menor expressão de *TGF- β* em pacientes com LNH, menor expressão de *PRFI* em pacientes com LNH que foram a óbito e maior expressão de *PDL1* em pacientes com LNH agressivo. Já os pacientes com LLC não apresentaram alterações na expressão de nenhum dos genes avaliados.

REFERÊNCIAS

- AHMADZADEH, M.; JOHNSON, L. A.; HEEMSKERK, B.; WUNDERLICH, J. R.; DUDLEY, M. E.; WHITE, D. E. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**, v. 14, n. 8, p. 1537-1544, 2009.
- AISENBERG, A. C. Historical review of lymphomas. **British Journal Haematology**. v. 109, n. 3, p. 466-76, 2000.
- ARMITAGE, J. O.; WEISENBURGER, D. D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. **Journal of Clinical Oncology**. v. 16, n. 8, p. 2780-2795, 1998.
- ARMITAGE, J. O.; GASCOYNE, R. D.; LUNNING, M. A.; CAVALLI, F. Non-Hodgkin lymphoma. **Lancet**. v. 390, n. 10091, p.298-310, 2017.
- BAITSCH, L.; LEGAT, A.; BARBA, L.; FUERTES MARRACO, S. A.; RIVALS, J. P.; BAUMGARTNER, P. *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, e30852, 2012.
- BATLLE, E.; MASSAGUÉ, J. Transforming Growth Factor- β signaling in immunity and cancer. **Immunity**. v. 4, p. 924-940, 2019.
- BETTELLI, E.; CARRIER, Y.; GAO, W.; KORN, T.; STROM, T. B.; OUKKA, M. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**. v. 441, n. 7090, p. 235-238, 2006.
- BYKOVSKAJA, S. N.; BUFFO, M. J.; BUNKER, M.; ZHANG, H.; MAJORS, A.; HERBERT, M. *et al.*, Interleukin- 2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 63, n.5, p. 620-630, 1998.
- BOFFETTA, P. I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. **Annals of Oncology** v.22, n. suppl 4, p.iv 27–31, 2011.
- BUCHBINDER, E. I., 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.
- CHAE, Y. K.; ARYA, A.; IAMS, W.; CRUZ, M. R.; CHANDRA, S.; CHOI, J. *et al.* Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC). **Journal for Immunotherapy of Cancer**. v. 6, n. 1, 2018.
- CHANG, L. C.; CHEN, T. P.; KUO, W. K.; HUA, C. C. The Protein Expression of PDL1 Is Highly Correlated with Those of eIF2 α and ATF4 in Lung Cancer. **Disease Markers**. 2018.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003.

CHEN, X.; LIU, S.; WANG, L.; ZHANG, W. G.; YUQIANG, J. I.; XIAORONG, M. A. *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.

CHESON, B. D.; FISHER, R. I.; BARRINGTON, S. F.; CAVALLI, F.; SCHWARTZ, L. H.; ZUCCA, E. *et al.* Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. **Journal of Clinical Oncology**. v. 32, n. 27, p. 3059-3068, 2014

CHIATTONE, C. S; FALCÃO, R. P. Indicações para início de tratamento na leucemia linfóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, n. 4, 2005.

CURIEL, T. J.; COUKOS, G.; ZOU, L.; ALVAREZ, X.; CHENG, P.; MOTTRAM, P. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. **Nature Medicine**. v. 10, n. 9, p. 942-949, 2004.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., ERVIK, M. *et al.* **GLOBOCAN**. v. 0, *Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. 2012.

GALLIMORE, A.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses. **Immunological Reviews**. v. 164, p. 29-36, 1998.

GARICOCHEA, B. Patogênese da leucemia linfóide crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, p.241-246, 2005.

GUZMÁN- FLORES, J. M.; PORTALES-PÉREZ, D. P. Mechanisms of suppression of regulatory T- cells Treg. **Gaceta Médica de México**. v. 149, n. 6, p. 630-638, 2013.

GRASSADONIA, A.; GRAZIANO, V.; PAGOTTO, S.; VERONESE, A.; GIULIANI, C.; MARCHISIO, M. *et al.* Tgf-β1 transcriptionally promotes 90K expression: possible implications for cancer progression. **Cell Death Discovery**. v. 7, n. 86, 2021.

HUS, I.; BOJARSKA-JUNAK, A.; KAMIŃSKA, M.; DOBRZYŃSKA-RUTKOWSKA, A.; SZATAN, K.; SZYMCZYK, A. *et al.* Imbalance in circulatory iNKT, Th17 and T regulatory cell frequencies in patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. **Oncology Letters**. v. 14, n. 6, p.7957-7964, 2017.

Estimativa novos casos de linfoma não – Hodgkin. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/2020>. Acesso em: 22/11/2021.

JANG, J. E.; HAJDU, C. H.; LIOT, C.; MILLER, G.; DUSTIN, M. L.; BAR-SAGI D. *et al.* Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-Tumor Immunity in Pancreatic Cancer. **Cell Report**. v. 20, n.3, 2017.

- KARACHALIOU, N.; MAYO-DE LAS CASAS, C.; QUERALT, C.; DE AGUIRRE, I.; MELLONI, B.; CARDENAL, F. *et al.* Association of EGFR L858R Mutation in Circulating Free DNA with Survival in the EURTAC Trial. **JAMA Oncology**. v.1, n. 2, p. 149-157, 2015.
- KEANE, C.; VARI; HERTZBERG, M.; CAO, K. A.; GREEN, M. R.; HAN, E. *et al.* Ratios of T-cell immune effectors and checkpoint molecules as prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **Lancet Haematology**. v.2, n. 10, p. 445-455, 2015.
- KIM, B. G.; MALEK, E.; CHOI, S. H.; IGNATZ – HOOVER, J. J.; DRISCOLL, J. J. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF β pathway. **Journal of Haematology and Oncology**. v. 14, n. 55, p. 1-68, 2021.
- KLEIN, L.; KHAZAIE, K.; VON BOEHMER, H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 15, p. 8886-8891, 2003.
- LIAU, Z.; LV, X.; LIU, S.; HE, Z.; CHEN, S.; WANG, L. *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.
- LORAND-METZE, Irene. LLC: critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 27, p. 233-235, 2005.
- LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, p. 703-717, 2017.
- MATVEEVA, A.; KOVALEVSKA, L.; KHOLODNYUK, L.; KHOLODNYUK, I.; IVANIVSKAVA, T.; KASHUBA, E. *et al.* The TGF-beta - SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells. **Experimental Oncology**. v. 39, n. 4, p. 286-290, 2017.
- MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**. v. 32, n. 5, p. 184-188, 2009.
- MÜLLER-HERMELINK, H. K.; ZETTL, A.; PFEIFER, W.; OTT, G. Pathology of lymphoma progression. **Histopathology**. v. 38, n. 4, p. 285-306, 2001.
- MUMPRECHT, V.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 13, p. 1405-1416. 2009.
- PAN, Y. C.; WANG, J. L. Research progress of TNF- α in autoimmune diseases. **Progress in Pharmaceutical Sciences**, vol. 12, p. 883–889, 2017.
- PATEL, S. S.; WEIRATHER, J. L.; LIPSCHITZ, M.; LAKO, A.; CHEN, P. H.; GRIFFIN, G. K. *et al.* The microenvironmental niche in classic Hodgkin lymphoma is enriched for CTLA-4-positive T cells that are PD-1-negative. **Blood**. v. 134, n. 23, p. 2059-2069, 2019.
- PLUSKIEVICZ, C. M.; CAO, X.; ABDI, R.; ZHENG, P.; LIU, Y.; BROMBERG, J. S. *et al.* T Regulatory Cells and Priming the Suppressive Tumor Microenvironment. **Frontiers in Immunology**, 2019.

PRATAP, S.; SCORDINO, T. S. Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphoma: Diagnostic and prognostic implications. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 106, p. 44-51, 2019.

ROMANO, M.; FANELLI, G.; ALBANY, C. J.; GIGANTI, G.; LOMBARDI, G. Current landscape and future of dual anti-CTLA4 and PD-1/PD-L1 blockade immunotherapy in cancer; lessons learned from clinical trials with melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC) - Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Auto. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2018.

RUBTSOY, Y. P.; RUDENSKY, A. Y. TGF β signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. **Nature Reviews of Immunology**. v. 7, n. 6, p. 443-453, 2007.

SABBADINI, F.; BERTOLINI, M.; DE MATTEIS, S.; MANGIAMELI, D.; CONTARELLI, S.; PIETROBONO, S. *et al.* The Multifaceted Role of TGF- β in Gastrointestinal Tumors. **Cancers** v.13, p. 3960, 2021.

SISKA, P. J.; VAN DER WINDT, G. J.; KISHTON, R. J.; COHEN, S.; EISNER, W.; MACLYER, N. J. *et al.* Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 6, p. 2532-2540, 2016

SMYTH, M. J.; TRAPANI, J. A. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. **Immunology Today**. v. 16, p. 202-206, 1995.

SOBHANI, N.; TARDIEL – CYNIL, D. R.; DAVTYAN, A.; GENERALI, D.; ROUDI, R.; LI, Y.. *et al.* CTLA-4 in Regulatory T Cells for Cancer Immunotherapy. **Cancers**. v. 13, n. 6, 2021.

SONG, J. Y.; YU, J.; CHAN, W. C. Gene expression profiling in non-Hodgkin lymphomas. **Cancer Research and Treatment**. v. 165, p. 165-197, 2015.

SOUZA, B. M.; DE VITO, F. B.; CALADO, M. L.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, L. R.; JUNIOR, V. R. *et al.* Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**. v. 59, p. 214-220, 2018.

SPRANGER, S.; SPAAPEN, R. M.; ZHA, Y.; WILLIAMS, J.; MENG, Y.; HA, T. T. *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**. v. 5, n. 200, 2013.

TAUBE, J. M.; KLEIN, A.; BRAHMER, J. R.; XU, H.; PAN, X.; KIM, J. H. *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, n.19, p. 5064-5074, 2014.

TINOCO, R.; ALCALDE, V.; YANG, Y.; SAUER, K.; ZUNIGA, E. I. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. **Immunity**. v. 31, n. 1, p. 145-157, 2009.

VAN DEN BRINK, M. R. M.; BURAKOFF, S. J. Cytolytic Pathways in Haematopoietic Stem-Cell Transplantation. **Nature Reviews Immunology**. v. 2, n. 4, p. 273-281, 2002.

VAN DER WAAL, R. I.; HUIJGENS, P. C.; VAN DER VALK, P.; WAAL, I. V. Characteristics of 40 primary extranodal non-Hodgkin lymphomas of the oral cavity in perspective of the new WHO classification and the International Prognostic Index. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**. v. 34, p. 391-395, 2005.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R. J.; ATKINS, C. J.; LOCKSLEY, R. M.; STOCKINGER B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**. v. 24, p. 179-189, 2006.

VOLPE, E.; SERVANT, N.; ZOLLINGER, R.; BOGIATZI, S. I.; HUPÉ, P.; BARILLOT, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. **Nature Immunology**. v. 9, p.650-657, 2008.

VOSE, J. M.; CHIU, B. C.; CHESON, B. D.; DANCEY, J.; WRIGHT, J. Update epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphoma. **Hematology American Society of Hematology Education Program**. v. 1, p. 241-262, 2002.

VOO, K. S.; FOGLIETA, M.; PERCIVALLE, E.; CHU, F.; NATTAMAI, D.; HARLINE, M. *et al.* Selective targeting of Toll-like receptors and OX40 inhibit regulatory T-cell function in follicular lymphoma. **International Journal of Cancer**. v. 135(12), p.2834-2846, 2014.

WANG, H. W.; BALAKRISHNA, J. P.; PITTALUGA, S.; JAFFE, E. S. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. **British Journal of Haematology**. v. 184. n. 1. p. 45-59, 2019.

WANG, J.; XIANG, H.; LU, Y.; WU, T. Role and clinical significance of TGF- β 1 and TGF- β R1 in malignant tumors. **International Journal of Molecular Medicine**. n.55, 2021.

WOO, E. Y.; CHU, C. S.; GOLETZ, T. J.; SCHLIENGER, K.; YEH, H.; COUKOS, G. *et al.* Regulatory CD4 (+) CD25 (+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. **Cancer Research**. v. 61, n.12, p. 4766-4772, 2001

XIAO, K.; YANG, L.; GAO, X.; A, Y.; XIE, W.; JINGQUAN G. *et al.* HuR Affect Proliferation and Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia Cells via NF-Kb Pathway. **BioMed Research International**. v. 2020, p. 1-7, 2020.

XU-MONETTE, Z. Y.; ZHOU, J.; YOUNG, K. H. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. **Blood**. v. 131, n. 1, p. 68-83, 2018.

XU-MONETTE, Z. Y.; XIAO, M.; AU, Q.; PADMANABHAN, R.; XU, B.; HOE, N. *et al.* Immune Profiling and Quantitative Analysis Decipher the Clinical Role of Immune-Checkpoint Expression in the Tumor Immune Microenvironment of DLBCL. **Cancer Immunology Research**. v. 7, n.4, p. 644-657, 2019.

- YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K.; YAMAZAKI, S.; KITAWAKI, T.; HORI, S. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology**. v.16, n. 11, p. 1643-56, 2004.
- YANG, H.; FANG, F.; CHANG, R.; YANG, L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor β receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**. v. 58, n. 1, p. 205-217, 2013.
- YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF-beta function in immune suppression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 350, p. 127-147, 2011.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, P. Tratado de Hematologia. São Paulo: Ed. Atheneu, 2014.
- ZHAO, Y.; CUI, W. L.; FENG, Z. Y.; XUE, J.; GULINAER, A.; ZHANG, W. *et al.* Expression of Foxp3 and interleukin-7 receptor and clinicopathological characteristics of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Oncology Letters**. v. 19, n. 4, p. 2755-2764, 2020.
- ZOU, W.; MACHELON, V.; COULOMB-L'HERMIN, A.; BORVAK, J.; NOME, F.; ISAEVA, T. *et al.* Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. **Nature Medicine**. v. 7, n. 12, p. 1339-1346, 2001.
- ZHOU, L.; LOPES, J. E.; CHONG, M. M.; IVANOV, I. I.; MIN, R.; VICTORA, G. D. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. **Nature**. v. 453, n. 7192, p. 236-240, 2008.
-

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to

International Journal of Laboratory Hematology

Manuscript ID

IJLH-10-21-0996

Title

Gene expression levels of inhibitory and immune factors stimulators in patients with chronic lymphoproliferative neoplasms and their relationship with the severity and clinical outcome

Authors

Samuel, Michelle
Souza, Bruna
Calado, Marianna
Tanaka, Sarah
De Vito, Fernanda
Moraes-Souza, Helio

Date Submitted

25-Oct-2021

ANEXO B – Artigo

Analysis of gene expression levels of inhibitory and immune factors stimulators in patients with chronic lymphoproliferative neoplasms and their relationship with the severity and clinical outcome

Samuel, Michelle Lara; Souza, Bruna Maria Bereta de; Calado, Marianna Licati; Tanaka, Sarah Cristina Sato Vaz; De Vito, Fernanda Bernadelli; Moraes-Souza, Helio

Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Hematological Research Laboratory, Discipline of Hematology and Hemotherapy.

Abstract

Chronic lymphoproliferative neoplasm are diseases characterized for monoclonal expansion and lymphocytes accumulation apparently mature that present a proliferative advantage and/or survival in relation to normal lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and lymph nodes. The immunological mechanisms in cell induction and inactivation are complex and still poorly understood in these neoplasms. Therefore, this study aimed to evaluate the gene expression of *TGFβ*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *FoxP3*, *PRF1* and *GZMB* in patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and chronic lymphocytic leukemia (CLL) attended at the Hospital of Clinics of Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM). Twenty patients with NHL, 14 with CLL and 12 healthy individuals participated in this study. The relative gene quantification was performed by qPCR. Patients with non-Hodgkin's lymphoma showed significantly lower *TGFβ* expression when compared to the control group ($p=0,041$). The same was not observed for the other genes. When analysed patients with NHL and categorized by severity, greater expression of *PDL1* ($p=0,049$) was evidenced in individuals with aggressive NHL. Regarding the outcome, patients with NHL who died had significantly lower *PRF1* expression levels than those who remained alive ($p=0,0474$). However, in patients with CLL, no statistically significant difference was observed in any of the genes evaluated. The data found here can contribute to new studies on the evaluated genes, as well as new markers with prognostic value. The understanding of tumor immunology combined with the assessment of gene expression contributes to a better understanding of the immune response pattern.

Key words: non -Hodgkin lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, transforming growth factor beta (*TGFβ*), Forkhead Box P3 (*FoxP3*), inhibitory immune factors, cytotoxic proteins.

INTRODUCTION

Chronic lymphoproliferative neoplasms are diseases characterized by monoclonal expansion and lymphocyte accumulation apparently mature that present a proliferative advantage and/or survival in relation to normal lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and lymph nodes. It can present monoclonal lymphocytosis, lymphadenopathy and medullary infiltration [1].

Cell-mediated immunity is the body's main mechanism of action against tumor cells. The main cells involved in this process are CD8⁺ T lymphocytes and natural killer (NK) cells, which manage to eliminate their targets through the release of cytokines, binding of cell death receptors, but above all by the release of cytolytic proteins such as perforin and granzyme B [2] [3] [4].

As a way of controlling the immune response, regulatory T lymphocytes (Treg) act to avoid exacerbated responses and terminate immune process when the cause extinguishes. These cells originate from the thymus, are characterized by CD4⁺ CD25⁺ cell markers (nTreg) and the iTreg that are peripherally produced and induced by transforming growth factor (TGF- β).

They participate in the maintenance of immune tolerance and prevention of autoimmune diseases [5]. Forkhead transcription factor (FoxP3) is the main transcription factor especially in the differentiation of these cells [6] [7]. Treg infiltrating tumors FoxP3⁺ may be an escape mechanism to the immune response [8].

The presence of some immune receptors and molecules ("checkpoints") can induce the release of signals that act directly on the defense cells, as an Inhibitor signal, favoring the escape of the tumor cell to immune surveillance. Among these, we have the transforming growth factor beta (TGF- β) known to promote evasion of T cell surveillance [9]. As a tumor promoter, the signaling pathway TGF- β stimulates cell proliferation, migration, angiogenesis, invasion and suppression of immune surveillance [10].

Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4), also known as CD152, which was the first clinically evaluated immunological checkpoint, is a type- I membrane protein, expressed on the cell surface of cytotoxic T lymphocytes (LTC) and homologous to CD28.

Tumor cells express ligands for CTLA-4 as one of their mechanisms of evasion in order to avoid the activation of effector cells [11]. Another receptor with inhibitory action is the programmed death receptor 1 (PD1, from English programmed death-1). This receptor is commonly expressed on the cell surface of B-lymphocytes, T lymphocytes and NK cells, acting

as one of the main inhibitory receptors in regulation of T lymphocyte activation. When activated T cells expressing *PD1* find *PDL1*, effector T cell functions decrease, and are prevented from eliminating cells containing *PDL1*, including neoplastic cells [12].

Due to the complexity of cell induction and inactivation cycles, it is feasible and necessary to understand the mechanisms of action of these molecules in relation to defense cells, cytolytic protein synthesis, in addition to the action and control of the process through specialized regulatory cells. The study of gene expression of cell markers capable of stimulating or inhibiting the immune response contributes to the understanding of the evolutionary or remissive behavior of neoplasms. Thus, this study evaluated and compared the gene expression of inhibitory factors, such as *TGF β* , *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, the expression of the lymphocyte-specific transcription factor Tregs (FoxP3) and the expression of genes that encode perforin and granzyme B, which are the main effector molecules of cytotoxic lymphocytes in patients with chronic lymphoproliferative diseases.

MATERIALS AND METHODS

Participants

In this study, patients with non-Hodgkin's lymphoma (NHL) and patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated at the Hospital of Clinics of Federal University of Triângulo Mineiro (UFTM) were evaluated. Patients with NHL were recruited before starting treatment and all patients with CLL did not use chemotherapy. A control group with individuals without a history of cancer or chronic autoimmune and infectious diseases was also included in the survey. The UFTM Ethics Committee (protocol # 2677) approved this study and all participants consented to be part of the study.

Gene Expression Assessment

Quantification of the expression of FoxP3 and TGF- β genes was performed using the Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Initially, total RNA was isolated from peripheral blood using QIAampVR Mini RNA Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany) and complementary DNA was obtained by reverse transcription using the GoScriptTM Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI). For target quantification, the GoTaq[®] qPCR Master Mix kit (Promega, WI) and TaqMan[®] probes (Applied Biosystems, Foster City, CA) FoxP3 (Hs01085834_m1), TGF- β (Hs00998133_m1), PRF1 (Hs 00169473_m1) were used), GZMB (Hs01554355_m1), PD1 (Hs01550088_m1), PDL1 (Hs 00204257_m1), CTLA-4 (Hs00175480_m1).

The amplification reaction of the transcripts was carried out according to the manufacturers' instructions in a thermocycler 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, CA). The data obtained for each target were normalized with expression of the endogenous β -actin reference gene (Hs99999903_m1) and the gene expression values were calculated using the threshold cycle method ($2^{-\delta CT}$).

Statistical analysis

After analyzing the normality of the samples using the Kolmogorov-Smirnov test, gene comparison levels were compared using the unpaired t-test for samples with normal distribution and the Mann Whitney or Kruskal-Wallis tests for samples with non-normal distribution. SigmaStat software version 3.5 (Systat Software Inc, GmbH, Germany) was used. The level of statistical significance considered was p less than 0.05.

RESULTS

Sample characterization

Twenty patients with NHL (median 70 years, 42-92 years), mostly women, were evaluated in this study. Regarding severity, seven patients were classified as indolent and 13 patients as aggressive NHL (**Table 01**).

Table 01. Clinical and diagnostic characteristics of NHL patients.

Identification	Gender	Age	Subtype	Disease Progress	Outcome
NHL01	Male	74	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL02	Female	74	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL03	Female	83	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL04	Male	92	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL05	Female	68	Mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma	Indolent	Alive
NHL06	Male	70	Cutaneous T-cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL07	Female	NI	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL08	Male	71	Anaplastic large cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL09	Male	63	Mantle cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL10	Female	75	Marginal zone lymphoma	Indolent	Alive
NHL11	Male	47	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Vivo
NHL12	Male	60	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL13	Female	54	MALT-type lymphoma with transformation to diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Dead
NHL14	Female	68	Mycosis fungoides	Indolent	Alive
NHL15	Female	NI	Small-cell lymphocytic lymphoma	Indolent	Alive
NHL16	Male	70	Small-cell lymphocytic lymphoma	Indolent	Alive
NHL17	Female	NI	Anaplastic large cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL18	Female	63	Follicular lymphoma	Indolent	Alive

NHL19	Female	42	Diffuse large B-cell lymphoma	Agressive	Alive
NHL20	Female	80	Small-cell lymphocytic lymphoma	Indolent	Alive

Legend: NHL: Non-Hodking Lymphoma; NI: Not informed

Fourteen patients with CLL (median 67 years, 48-90 years), mostly men, were also evaluated. Patients with CLL were monitored periodically, but without therapeutic intervention (**Table 02**).

Table 02. Clinical and diagnostic characteristics of CLL patients.

Identification	Gender	Age	Patient management	Outcome
CLL01	Male	81	Monitoring	Alive
CLL02	Male	55	Initial diagnosis	Dead
CLL03	Male	70	Initial diagnosis	Alive
CLL04	Male	73	Initial diagnosis	Alive
CLL05	Male	90	Monitoring	Dead
CLL06	Female	72	Monitoring	Alive
CLL07	Male	68	Monitoring	Dead
CLL08	Male	60	Monitoring	Alive
CLL09	Female	65	Monitoring	Alive
CLL10	Female	48	Initial diagnosis	Alive
CLL11	Female	78	Initial diagnosis	Alive
CLL12	Male	60	Monitoring	Alive
CLL13	Male	58	Initial diagnosis	Alive
CLL14	Male	60	Initial diagnosis	Alive

Legend: CLL: chronic lymphocytic leukemia

The control group consisted of 12 healthy individuals (median 65 years, 60-75 years), being seven women and five men.

Gene expression of FoxP3, TGF- β , PD1, PDL1, CTLA-4, PRF and GZB in patients with NHL and CLL

In patients with NHL, a significantly lower expression of TGF- β was observed when compared to the control group ($p=0.041$). The same was not observed in relation to FoxP3, PD1, PDL1, CTLA-4, PRF and GZMB genes (Table 3). When patients with NHL were categorized by severity (indolent vs. aggressive), there was a statistically significant difference in PDL-1 expression ($p=0.049$). The expression of the other genes did not differ between groups (Table 3).

Tabela 03 Median values obtained from relative expression of genes *FoxP3*, *TGF- β* , *PD1*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* and *GZMB* obtained in the groups of control individuals, NHL patients NHL and CLL patients.

	n	<i>FoxP3</i>	<i>TGFβ</i>	<i>PD1</i>	<i>PDL1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>PRF1</i>	<i>GZMB</i>
Controls	12	0.0019	0.640	0.000	0.0029	0.0064	0.125	0.000
NHL patients	20	0.0013	0.299	0.00002	0.000	0.0208	0.144	0.0928
<i>p value</i>		0.984	0.041*	0.339	0.272	0.199	0.785	0.073
NHL aggressive	13	0.0009	0.292	0.00001	0.0043	0.0203	0.205	0.0960
NHL indolent	7	0.0040	0.307	0.000	0.000	0.0278	0.0934	0.0204
<i>p value</i>		0.186	0.115	0.416	0.049*	0.331	0.314	0.168
CLL patients	14	0.0002	0.372	0.000	0.0075	0.000	0.0526	0.000
<i>p value</i>		0.204	0.247	0.710	0.352	0.186	0.316	0.289

Legend: NHL: Non-Hodking Lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; *p value*: valor de p. The Mann-Whitney test compared medians between controls vs. NHL patients and controls vs. patients with CLL. Kruskal-Wallis test for comparison between controls vs. Aggressive vs. Indolent NHL

Comparison of the expression of the genes evaluated with the outcome

Three of the patients with CLL and six with NHL died by the end of this research. Thus, there was necessity of evaluation whether if there was any relationship between the expression of these genes studied and mortality in patients. As all patients with NHL who died had the disease in its aggressive form, patients with indolent LNH were excluded from the analysis.

According to the analyses, it was possible to verify that patients with NHL who died had significantly lower *PRF1* expression levels than those who remained alive ($p=0.0474$).

These patients also had lower expression of *GZMB*, but the analysis did not result in statistical significance ($p= 0,0548$).

Regarding the expression of other genes, no significant difference was observed in relation to death, both in patients with CLL and NHL (Table 04).

Table 04. Comparison of the medians obtained from the relative expression of the genes *FoxP3*, *TGF- β* , *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* and *GZMB* of NHL and CLL patients in relation to clinical outcome.

	n	<i>FoxP3</i>	<i>TGFβ</i>	<i>PDI</i>	<i>PDL1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>PRF1</i>	<i>GZMB</i>
Dead NHL patients	6	0.0002	0.2311	0.0000	0.0005	0.0026	0.1304	0.0043
Alive NHL patients[§]	7	0.0013	0.4082	0.0006	0.0049	0.0213	0.3655	0.2088
<i>p value</i>		0.1917	0.4452	0.1148	0.4347	0.2343	0.0474*	0.0548
Dead CLL patients	3	0.0005	0.2413	0.0001	0.0073	0.0072	0.0424	0.0078
Alive CLL patients	11	0.0000	0.5201	0.0000	0.0119	0.0000	0.0628	0.0000
<i>p value</i>		>0.9999	0.1703	0.6484	0.8846	0.5055	0.9780	0.1209

Legend: NHL: Non-Hodking Lymphoma; CLL: chronic lymphocytic leukemia; *p value*: valor de p.

As all patients with NHL who died had the aggressive form of the disease, patients with indolent NHL were excluded from the analysis. The Mann-Whitney test compared medians. Analysis of PRF1 expression in patients with NHL, the unpaired t test, since the data had a normal distribution. The remaining data showed a non-normal distribution.

DISCUSSION

Tumor cells can evade the immune surveillance by overexpression of checkpoint receptor ligands on tumor cells or adjacent cells, allowing T cells to become anergic or go to exhaustion [13]. The study of gene expression of cell markers capable of stimulating or inhibiting the immune response contributes to the understanding of the evolutionary or remissive behavior of neoplasms. There are, however, gaps in relation to knowledge about extrinsic cellular factors that regulate its expression. In view of this, this study evaluated and compared the gene expression of *FoxP3*, *TGF- β* , *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF1* and *GZMB* in patients with NHL and CLL, correlating with severity and with clinical outcome.

The present study observed that patients with NHL had significantly lower expression of *TGF- β* when compared to the control group. Studies have implied that TGF- β can induce T cell exhaustion which leads to a decline in T cell proliferation and function, as well as increased cell death [14] [15]. T cell is well characterized in chronic viral infections [16] [17], however it has been observed that intratumoral T cells have a phenotypic and functional profile similar to that of T cells depleted by chronic viral infection [18] [19] [20].

Yang e colaboradores (2013) found that TGF- β secreted by lymphoma cells and intratumoral T cells acted on Treg cells by increasing *FoxP3* expression on CD4+ T cells and suppressed effector helper T cells by inhibiting the expression of IFN- γ and IL-17[21]. Thus, we believed that there could be an increase in the expression of this gene in the patients with NHL evaluated herein. However, we noted the opposite. Since most studies report the expression of *TGF- β* in the tumor environment, we believe that the difference is related to the fact that we evaluated peripheral blood cells. As the patients were evaluated soon after diagnosis, with active disease, the *TGF- β* expression pathway would probably be suppressed,

so that effector cells could eliminate the tumor cells.

Regarding the categorization by severity of patients with NHL, significantly higher expression of PDL1 was found in patients with aggressive NHL. Immunological escape mechanisms were characterized in diffuse large B-cell lymphoma through infiltration deficiency of T cells and/or NK cells in the tumor, high *PDI* (but not *CTLA-4*) expression on CD8+ T cells or *PDL1* expression on T cells and macrophages [22]. Another study evaluated two hundred and fifty-two tissue samples from patients with diffuse large B-cell lymphoma. A relationship was established between effector immune activity and genes with inhibitory activity. The result revealed expression of T cell and NK cell effector molecule of the immune system correlated to the PD1/PDL1 marker in the macrophage-associated tumor, consistent with a malignant B cell profile triggering a dynamic checkpoint response in favor of adaptation and evasion of immune surveillance [23].

In the present study, the expression of the other genes did not differ between patients with indolent or aggressive NHL. Although there is evidence of a relationship between the gene expression of *FoxP3*, *PDI*, *PDL1*, *CTLA-4*, *PRF* and *GZMB* in lymphoproliferative neoplasms [24], we did not observe significant differences when comparing patients with NHL and CLL and healthy individuals.

Although we did not see significant differences in *FoxP3* expression between these groups, the four patients who did not show *FoxP3* expression had aggressive lymphoma. Results of recent studies demonstrate through the immunohistochemical technique, that FoxP3 protein was expressed at different levels in NHL tissues of large type B cells, with a positive expression rate of 65.7% and a strong positive expression rate of 14.4%. High *FoxP3* expression has been associated with tumor stage 3 or 4 [25]. These data then demonstrate that the Treg-related immune response is actually more active in patients with disease with more intense cell proliferation.

Unlike what was found in our study, *PDI* levels were markedly elevated in infiltrating T cells in Hodgkin's Lymphoma (LH) (53% to 76%) in patients with HL compared to healthy individual [26]. The same study highlighted that *PDI* expression in peripheral blood was also significantly higher in patients with HL (nodular sclerosis) than in patients with NHL-B.

CTLA-4 is a predominant checkpoint protein expressed on T cells in the classical LH tumor microenvironment, which is enriched by CTLA-4+ T cells that are PD1 negative [27]. The high infiltration of cells double positive for FoxP3/CTLA-4 is significantly associated with a worse prognosis and that patients with low levels of double positive cells for FoxP3/CTLA-4 have longer survival time and life progression free [25].

In patients with CLL, the expression of *TGF- β* evaluated here was similar to that found in healthy individuals. This fact can be supported by the inactivation of the canonical pathway in CLL cells and that SMAD-responsive genes, such as *BCL2L1*, *Cyclin D2* and *MYC*, are poorly regulated in CLL cells compared to B cells in the peripheral blood of healthy individuals [28].

Studies have shown that PD1/PDL1 association is functionally active in CLL. Like *PDI* expression, *PDL1* in LLC/LLP has no prognostic significance in most studies, but increased expression was associated with worse prognosis in a small analytical sample [26]. Study with a murine model in CLL, demonstrated PD1 blockade modestly increased T cell function and was insufficient to recover T cell antitumor activity. In contrast, early PDL1 blockade restored CD8+ T cell function and prevented the development of CLL in vivo [29].

In the future, would be interesting to increase the sample number to determine whether it could really be a limiting factor for this research. It is worth emphasizing that the patients herein evaluated had not started chemotherapy. This allowed the exclusion of possible interferences in the immunological pathways caused by medication. It is also necessary to determine whether studies already reported in the literature removed this bias from their analysis.

Regarding the comparison of the expression of the genes evaluated with the outcome, it was possible to identify that patient with NHL who died had significantly lower *PRFI* expression levels than those who remained alive. Patients with NHL overexpressed perforin and granzyme B transcripts compared to healthy individuals. Patients who had expression of both genes below the mean had a shorter survival time [30].

Advances in molecular biology, with implementation of innovative techniques such as cytogenetic techniques and microarrays, have allowed and contributed to a better understanding of various oncogenic pathways, expanding available diagnostic and therapeutic resources involved in lymphomas and other lymphoproliferative neoplasms [31].

Through the complexity of gene expression regulation in relation to lymphoproliferative neoplasms and other tumors, the data presented here can contribute and implement further studies on the genes evaluated, as well as new markers with prognostic value. The understanding of tumor immunology combined with the evaluation of gene expression contributes to a better understanding of the pattern of immune response.

REFERENCES

- [1] VAILLANT, A. A. J.; STANG, C. M. Lymphoproliferative Disorders, 2021.
- [2] KONJEVIC, G.; JURISIC, V.; BANICEVIC, B.; SPUZIC, I. The difference in NK-cell activity between patients with non-Hodgkin's lymphomas and Hodgkin's disease. **British Journal of Haematology**. v. 104, n. 1, p. 144-151, 1999.
- [3] WAGNER-SOUZA, K.; DIAMOND, H. R.; ORNELLAS, M. H; GOMES, B. E.; ALMEIDA-OLIVEIRA, A.; ABDELHAY, E. *et al.* Rhodamine 123 efflux in human subpopulations of hematopoietic stem cells: comparison between bone marrow, umbilical cord blood and mobilized peripheral blood CD34+ cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 22, n. 2, p. 237-242, 2008.
- [4] MALMBERG, K. J.; SOHLBERG, E.; GOODRIDGE, J. P.; LJUNGGREN, H. G. Immune selection during tumor checkpoint inhibition therapy paves way for NK-cell "missing self" recognition. **Immunogenetics**. v. 69, n. 8-9, p. 547-556, 2017.
- [5] CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J.; LI, L.; MARINOS, N. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 198, n. 12, p. 1875-1886, 2003.
- [6] YAGI, H.; NOMURA, T.; NAKAMURA, K. *et al.* Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. **International Immunology**. v.16, n. 11, p. 1643-56, 2004.
- [7] YOSHIMURA, A.; MUTO, G. TGF-beta function in immune suppression. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 350, p. 127-147, 2011.
- [8] SHANG, B.; LIU, Y.; JIANG, S. J.; LIU, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. **Scientific Reports**. v. 5; p. 151-179, 2015.
- [9] WANG, J.; XIANG, H., LU, Y.; WU, T. Role and clinical significance of TGF- β 1 and TGF- β R1 in malignant tumors. **International Journal of Molecular Medicine**. n. 55, p. 2021.
- [10] MELO, K. M.; CARVALHO, B. T. C. Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**. v. 32, n. 5, p. 184-188, 2009.
- [11] TWUMASI – BOATENG, K.; PETTIGREW, J. L.; KWOK, Y.; BELL, J. C.; NELSON, B. H. Oncolytic viruses as engineering platforms for combination immunotherapy. **Nature Reviews of Cancer**. v. 18, n. 7, p. 419-432, 2018.

- [12] TAUBE, J. M.; KLEIN, A.; BRAHMER, J. R.; XU, H.; PAN, X.; KIM, J. H. *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, n.19, p. 5064-5074, 2014.
- [13] WANG, H. W.; BALAKRISHNA, J. P.; PITTALUGA, S.; JAFFE, E. S. Diagnosis of Hodgkin lymphoma in the modern era. **British Journal of Haematology**. v. 184. n. 1. p. 45-59, 2019
- [14] RUBTSOY, Y. P.; RUDENSKY, A.Y. TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. **Nature Reviews of Immunology**. v. 7, n. 6, p. 443-453, 2007.
- [15] TINOCO, R.; ALCALDE, V.; YANG, Y.; SAUER, K.; ZUNIGA, E. I. Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. v. 31, n. 1, p. 145-157, 2009.
- [16] GALLIMORE, A.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. Hierarchies of antigen-specific cytotoxic T-cell responses. **Immunological Reviews**. v. 164, p. 29-36, 1998.
- [17] BYKOVSKAJA, S. N.; BUFFO, M. J.; BUNKER, M.; ZHANG, H.; MAJORS, A.; HERBERT, M. *et al.* Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 63, n.5, p. 620-630, 1998.
- [18] MUMPRECHT, V.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer metastasis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 13, p. 1405-1416. 2009.
- [19] AHMADZADEH, M.; JOHNSON, L. A.; HEEMSKERK, B.; WUNDERLICH, J. R.; DUDLEY, M. E.; WHITE, D. E. *et al.* Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. **Blood**. v. 14, n. 8, p. 1537-1544, 2009.
- [20] KLEIN, L.; KHAZAIE, K.; VON BOEHMER, H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 100, n. 15, p. 8886-8891, 2003.
- [21] YANG, H.; FANG, F.; CHANG, R.; YANG, L. MicroRNA-140-5p suppresses tumor growth and metastasis by targeting transforming growth factor β receptor 1 and fibroblast growth factor 9 in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**. v. 58, n. 1, p. 205-217, 2013.
- [22] XU-MONETTE, Z. Y.; XIAO, M.; AU, Q.; PADMANABHAN, R.; XU, B.; HOE, N. *et al.* Immune Profiling and Quantitative Analysis Decipher the Clinical Role of Immune-Checkpoint Expression in the Tumor Immune Microenvironment of DLBCL. **Cancer Immunology Research**. v. 7, n.4, p. 644-657, 2019.

- [23] KEANE, C.; VARI; HERTZBERG, M.; CAO, K. A.; GREEN, M. R.; HAN, E. *et al.* Ratios of T-cell immune effectors and checkpoint molecules as prognostic biomarkers in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. **Lancet Haematology**. v.2, n. 10, p. 445-455, 2015.
- [24] SONG, J. Y.; YU, J.; CHAN, W. C. Gene expression profiling in non-Hodgkin lymphomas. **Cancer Research and Treatment**. v. 165, p. 165-197, 2015.
- [25] ZHAO, Y.; CUI, W. L.; FENG, Z. Y.; XUE, J.; GULINAER, A.; ZHANG, W. *et al.* Expression of Foxp3 and interleukin-7 receptor and clinicopathological characteristics of patients with diffuse large B-cell lymphoma. **Oncology Letters**. v. 19, n. 4, p. 2755-2764, 2020.
- [26] XU-MONETTE, Z. Y.; ZHOU, J.; YOUNG, K. H. PD-1 expression and clinical PD-1 blockade in B-cell lymphomas. **Blood**. v. 131, n. 1, p. 68-83, 2018.
- [27] PATEL, S. S.; WEIRATHER, J. L.; LIPSCHITZ, M.; LAKO, A.; CHEN, P. H.; GRIFFIN, G. K. *et al.* The microenvironmental niche in classic Hodgkin lymphoma is enriched for CTLA-4-positive T cells that are PD-1-negative. **Blood**. v. 134, n. 23, p. 2059-2069, 2019.
- [28] MATVEEVA, A.; KOVALEVSKA, L.; KHOLODNYUK, L.; KHOLODNYUK, I.; IVANIVSKAVA, T.; KASHUBA, E. *et al.* The TGF-beta - SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells. **Experimental Oncology**. v. 39, n. 4, p. 286-290, 2017.
- [29] SISKI, P. J.; VAN DER WINDT, G. J.; KISHTON, R. J.; COHEN, S.; EISNER, W.; MACLYER, N. J. *et al.* Suppression of Glut1 and Glucose Metabolism by Decreased Akt/mTORC1 Signaling Drives T Cell Impairment in B Cell Leukemia. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 6, p. 2532-2540, 2016.
- [30] SOUZA, B. M.; DE VITO, F. B.; CALADO, M. L.; SILVA, M. V.; OLIVEIRA, L. R.; JUNIOR, V. R. *et al.* Evaluation of the cytotoxic response mediated by perforin and granzyme B in patients with non-Hodgkin lymphoma. **Leukemia and Lymphoma**. v. 59, p. 214-220, 2018.
- [31] PRATAP, S.; SCORDINO, T. S. Molecular and cellular genetics of non-Hodgkin lymphoma: Diagnostic and prognostic implications. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 106, p. 44-51, 2019.

ANEXO C – Parecer consubstanciado do CEP

Portal do Governo Brasileiro

Plataforma Brasil

principal sair

Público Pesquisador CEP Alterar Meus Dados

Fernanda Bernadelli De Vito - Membro do CEP | V3.2
Sua sessão expira em: 39min 25

Você está em: Público > Buscar Pesquisas Aprovadas > Detalhar Projeto de Pesquisa

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título Público: ANÁLISE DO GENE DA PERFORINA EM LINFÓCITOS CITOTÓXICOS DE PACIENTES COM NEOPLASIAS LINFOPROLIFERATIVAS
 Pesquisador Responsável: Helio Moraes de Souza
 Contato Público:
 Condições de saúde ou problemas estudados: Linfoma
 Descritores CID - Gerais: Linfoma nao-Hodgkin difuso
 Linfoma nao-Hodgkin, folicular (nodular)
 Linfoma nao-Hodgkin de outros tipos e de tipo nao especificado
 Descritores CID - Especificos: Linfoma nao-Hodgkin difuso
 Linfoma nao-Hodgkin, folicular (nodular)
 Linfoma nao-Hodgkin de outros tipos e de tipo nao especificado
 Descritores CID - da Intervenção:
 Data de Aprovação Ética do CEP/CONEP: 21/03/2018

DADOS DA INSTITUIÇÃO PROPONENTE

Nome da Instituição: Universidade Federal do Triângulo Mineiro - MG
 Cidade: UBERABA

DADOS DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética Responsável: 5154 - Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM
 Endereço: Av. Getúlio Guaritá, nº 158, Casa das Comissões
 Telefone: (34)3700-8803
 E-mail: cep@uftm.edu.br

CENTRO(S) PARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA

CENTRO(S) COPARTICIPANTE(S) DO PROJETO DE PESQUISA



Fonte: <https://portal.plataformamaisbrasil.gov.br/>

