

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DAS  
MOLÉCULAS OX40, 4-1BB E CD40/CD40L  
NO MIELOMA MÚLTIPLO**

**REIJÂNE ALVES DE ASSIS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio  
Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de  
Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências**

**Área de Concentração em Oncologia**

**Orientador: Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos**

**Coorientadora: Dra. Leuridan Cavalcante Torres**

**São Paulo**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\*

A848 Assis, Reijâne Alves de  
**Avaliação do perfil de expressão das moléculas OX40, 4-1BB e CD40/CD40L no mieloma múltiplo** / Reijâne Alves de Assis - São Paulo; 2020.  
81p.  
Tese (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.  
Orientador: Antônio Hugo José Fróes Marques Campos

Descritores: 1. Mieloma Múltiplo/Multiple Myeloma. 2. Receptores OX40/Receptors, OX40. 3 Antígeno CD40/CD40 Antigen. 4. Ligante de CD40/CD40 Ligant 5. Receptor 4-1BB/4-1BB Receptor

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

*Desejo também que você plante uma semente, por mais minúscula que seja, e acompanhe o seu crescimento, para que você saiba de quantas muitas vidas é feita uma árvore.*

Victor Hugo

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Eleuza e Luiz (in memoriam) que me estimularam a sonhar, lutar e acreditar que tudo é possível, com empenho e dedicação.*

*Aos meus avós, Américo (in memoriam) e Dorcina (in memoriam), meu porto seguro, meus maiores exemplos de amor ao próximo, de bondade, compaixão, simplicidade, retidão e caráter. No colo de vocês sempre me senti amada e protegida, e foi por vocês que sempre busquei quando precisava curar minhas dores e feridas.*

*Ao meu esposo Paulo, pelo companheirismo, respeito e apoio incondicional ao longo destes 25 anos, pacientemente a sua mão esteve atrelada à minha em qualquer decisão ou escolha que eu tenha feito.*

*Aos meus irmãos, Líliam e Júnior, parte fundamental da minha existência, meus grandes e verdadeiros amigos.*

*À minhas sobrinhas, Natália, Sophia e Luiza, o lado doce da vida.*

*À Minha Pequena Ana Beatriz (Aninha) ... desde a sua chegada a vida fez mais sentido, os dias se tornaram mais alegres, cheios de vida e luz. O seu amor, me fez ainda mais forte e determinada. Desculpe a ausência dos últimos meses. No futuro, torço para que você entenda este momento como um ato de amor e exemplo. Perceba que desistir no meio do caminho não é uma opção e que as batalhas precisam ser finalizadas, ainda que nem sempre saíamos vencedores.*

## AGRADECIMENTOS

Aos **pacientes** envolvidos nesta pesquisa, sem os quais não poderíamos realizar este projeto. Meu agradecimento pela disponibilidade e generosidade em ajudar.

**A todos os pacientes**, dos quais tive a honra e a oportunidade de cuidar ao longa da minha vida na medicina, vocês foram a motivação aos estudos e ao desejo de fazer sempre o melhor.

Ao Dr. **Antônio Hugo José Fróes Marques Campos**, meu orientador pela disponibilidade ao longo deste período.

À **Dra. Leuridan Cavalcante Torres**, minha coorientadora, cujo desejo de nos fazer melhor, nos impulsionou, nos motivou e nos fez acreditar que seria possível. Você vai além ... sempre disponível, presente e nos mostrou ao longo de nossa trajetória, o exemplo do que é ser um mestre, o quão importante e motivante é despertar o desejo de ensinar.

À **Lidiane Vasconcelos do Nascimento Carvalho**, pelo auxílio e colaboração na realização deste projeto. Sem sua ajuda não teria sido possível.

Aos meus **mestres da Hematologia (Dr Nelson, Dra Andreza, Dra Valéria, Dra Beatriz (BB), Dr Paulo e tantos outros)** que com paciência e dedicação, ensinaram, treinaram e moldaram a mim e a tantos outros profissionalmente.

À **Diretoria do Hospital de Câncer de Pernambuco** pelo empenho em conseguir esse convênio com a Fundação Antônio Prudente para formação de novos doutores.

À **equipe do laboratório de Pesquisa Translacional** do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP) pela ajuda, recurso e presteza.

**Aos médicos, amigos e funcionários** do Departamento de Ensino e Pesquisa e da Hematologia do Hospital do Câncer de Pernambuco.

**A todos os colegas hematologistas, enfermeiros e residentes**, que toleraram minha ausência e deslizes em alguns momentos nos últimos tempos. Pela compreensão e apoio, muito obrigada.

Aos **amigos que fiz neste doutorado**. Nossos finais de semana e quartas à noite deixarão saudades. Obrigada a cada um pelas “boas risadas” que demos juntos.

A todos que não citei, mas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

Assis RA. **Avaliação do perfil de expressão das moléculas OX40, 4-1BB e CD40/CD40L no mieloma múltiplo.** [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

**Introdução:** O mieloma múltiplo é uma desordem clonal das células plasmocitárias e, responde por 10-15% das neoplasias hematológicas. Apresenta diversas alterações no sistema imune, caracterizadas por déficits na produção de anticorpos; alterações do perfil imunológico das células T; aumento da expressão do PD-L1; modificações no microambiente medular favorecendo o recrutamento de populações imunossupressoras como as Treg e disfunção nas células dendríticas. Manter um sistema imune ativo é fundamental para o controle da doença, pacientes com manutenção de células T efetoras apresentam maiores taxas de remissão e sobrevida. Receptores coestimuladores como o OX40, CD40/CD40L e 4-1BB, participam na ativação, proliferação e amplificação da resposta imune. **Objetivo:** Avaliar os níveis de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras OX40, CD40, CD40L e 4-1BB no sangue e medula óssea dos pacientes com mieloma múltiplo. **Métodos:** Trata-se de estudo exploratório, realizado entre 2016 e 2019 no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) e Laboratório de Pesquisa Translacional do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Foram incluídas 40 pacientes, até 79 anos de idade, com diagnóstico de Mieloma Múltiplo. Coletas de sangue periférico e medula óssea foram realizadas ao diagnóstico. As mensurações dos níveis de expressão de proteínas de membrana CD20, CD3, OX40, CD40/CD40L foram detectadas pela técnica de *Cytometric Bead Array* por citometria de fluxo. A dosagem dos níveis solúveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L foi realizada por *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Foi realizada análise de curva Receiver Operating Characteristic (ROC) para determinar o melhor valor de acurácia de cada marcador estudado assim como, a ocorrência de óbito. A análise estatística foi realizada no programa GraphPadPrism v8.0. O nível de significância estatística foi de  $p < 0,05$ . **Resultados:** Em sangue periférico, comparando-se pacientes e controles, verificou-se níveis menores de CD20 ( $p < 0,0001$ ) e CD20<sup>low</sup> ( $p < 0,0001$ ), CD40<sup>+</sup> em leucócitos totais ( $p = 0,0005$ ), CD40<sup>+</sup> em linfócitos ( $0,0006$ ) e CD40/CD3<sup>+</sup> ( $p < 0,0001$ ) no grupo de pacientes. Mas, em contrapartida, os pacientes apresentaram níveis mais elevados de OX40<sup>+</sup> ( $p = 0,0012$ ), CD40L<sup>+</sup> em leucócitos totais ( $p = 0,002$ ) e OX40<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>

( $p < 0,0001$ ). Os níveis séricos de s4-1BB ( $p = 0,03$ ) e sOX40 ( $p = 0,01$ ) estavam reduzidos no grupo de MM quando comparado aos controles. Na análise segundo o ISS, somente os níveis de expressão de CD40L<sup>+</sup> em leucócitos ( $p = 0,01$ ) e de CD40<sup>+</sup> em linfócitos ( $p = 0,0045$ ), mostraram níveis superiores nos pacientes com ISS1-2 em relação ao ISS-3. As medidas de expressão de OX40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> em leucócitos totais eram inferiores nos casos com evolução para óbito ( $p < 0,0006$  e  $p = 0,002$ , respectivamente). Os pacientes que apresentavam níveis de expressão de OX40 em leucócitos totais  $\geq 2,93\%$  tiveram maior sobrevida em relação àqueles com valores  $< 2,93\%$  ( $p = 0,03$ ), bem como aqueles com CD40L em leucócitos totais com valores  $\geq 3,09\%$  ( $p = 0,001$ ). Na análise da medula óssea, segundo o ISS, somente os níveis de expressão de OX40/CD3<sup>+</sup>, mostraram níveis superiores nos pacientes com ISS1-2 em relação ao ISS-3 ( $p < 0,0017$ ). Não foram observadas diferenças significativas entre os valores de expressão dos diversos marcadores em medula óssea, com relação ao desfecho óbito. Na análise de correlação de Spearman, os valores de CD20 em sangue e medula óssea, apresentam uma correlação moderada entre si ( $r = 0,64$  e  $p < 0,0001$ ). **Conclusão:** Os resultados deste estudo permitem concluir que existem alterações de mecanismos celulares envolvidos na regulação e ativação da resposta imune no MM quando comparados aos controles. A manutenção de níveis mais elevados de moléculas coestimuladoras (OX40  $\geq 2,93\%$  e CD40L  $\geq 3,09\%$ ), foi preditiva de melhor sobrevida no MM.

**Descritores:** Mieloma Múltiplo. Receptores OX40. Antígeno CD40. Ligante de CD40. Receptor 4-1BB.

## SUMMARY

Assis RA. [Evaluation of the expression profile of the molecules OX40, 4-1BB and CD40/CD40L in multiple myeloma]. [Tese]. São Paulo; Programa de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antônio Prudente, em Parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco; 2020.

**Introduction:** Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell (PC) disorder, accounting for approximately 10-15% of all hematological cancers. Multiple myeloma presents several immune system alterations, characterized by deficits in antibody production, disruption of the T-cell immune profile, increased expression of cell death ligand 1 (PD-L1), changes in the bone marrow microenvironment favoring the recruitment of immunosuppressive populations such as Tregs and dysfunction in dendritic cells. It is important to preserve the integrity of the active immune system for the control of disease progression and patients with maintenance of T-cell cytotoxic activities improve rates of remission and overall survival. Co-stimulating receptors such as OX40, CD40/CD40L and 4-1BB, cooperate in the activation, proliferation, and amplification of the immune response. **Objective:** To evaluate T and B lymphocyte levels as well as co-stimulating molecules OX40, CD40, CD40L and 4-1BB in the blood and bone marrow of multiple myeloma patients. **Methods:** This is a cross-sectional and exploratory study, conducted between 2016 and 2019 at Pernambuco Cancer Hospital (HCP) and Translational Research Laboratory of Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Forty patients, up to 79 years of age, diagnosed with Multiple Myeloma were included. Peripheral blood and bone marrow samples were collected at diagnosis. Serum concentrations of CD20, CD3, OX40, CD40/CD40L were detected through the Cytometric Bead Array technique by flow cytometry, and the soluble forms of s4-1BB, sOX40 e sCD40L by enzyme linked immunosorbent assays. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was performed to determine not only the best accuracy value of each studied marker but also, mortality. Statistical analysis was performed in the GraphPadPrism v8.0 program and the level of statistical significance was  $p < 0.05$ . **Results:** In peripheral blood, comparing patients and controls, there were lower levels of CD20 ( $p < 0.0001$ ) and CD20<sup>low</sup> ( $p < 0.0001$ ), CD40<sup>+</sup> in total leukocytes ( $p = 0.0005$ ), CD40<sup>+</sup> in lymphocytes (0.0006) and CD40/CD3<sup>+</sup> ( $p < 0.0001$ ) in the patient group. However, on the other hand, patients had higher levels of OX40<sup>+</sup> ( $p = 0.0012$ ),



CD40L<sup>+</sup> in total leukocytes (p=0.002) and OX40<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> (p<0.0001). Serum levels of s4-1BB (p=0.03) and sOX40 (p=0.01) were reduced in the MM group compared to controls. According to the ISS, CD40L<sup>+</sup> in leukocytes (p=0.01) and CD40<sup>+</sup> in lymphocytes (p=0.0045) showed higher levels in patients with ISS1-2 compared to ISS-3. Regarding the outcome death, levels of OX40<sup>+</sup> and CD40L<sup>+</sup> in total leukocytes were lower (p<0.0006 and p=0.002, respectively). In survival analyses, patients who had OX40<sup>+</sup> levels in total leukocytes  $\geq 2.93\%$  had higher survival compared to those with levels <2.93% (p=0.03), as well as those with CD40L<sup>+</sup> in total leukocytes with values  $\geq 3.09\%$  (p=0.001). In the bone marrow only the OX40/CD3<sup>+</sup> levels were higher in patients with ISS1-2 compared to ISS-3 (p<0.0017). No significant differences were observed between values of other bone marrow markers in relation to the outcome death. In Spearman's correlation analysis, CD20 levels in blood and bone marrow present moderate correlation between them (r=0.64 and p<0.0001). **Conclusion:** This study shows differences in cellular mechanisms involved in the regulation and activation of immune response in MM patients in comparison to healthy controls. The maintenance of higher levels of co-stimulating molecules (OX40  $\geq 2.93\%$  and CD40L  $\geq 3.09\%$ ) is associated with better survival in multiple myeloma.

**Keywords:** Multiple Myeloma Receptors, OX40. CD40 Antigen. CD40 Ligant. 4-1BB Receptor

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Expectativa da Sociedade Americana de Câncer, para casos novos de mieloma múltiplo, de acordo com sexo, por ano, em cada 100.000 habitantes, nos Estados Unidos em 2020 .....	1
<b>Figura 2</b>	Características epidemiológicas do Mieloma Múltiplo, tratados no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, ao longo de 10 anos.....	3
<b>Figura 3</b>	Resumo dos sintomas CRAB e fatores pelos quais são provocados tais manifestações nos pacientes portadores de mieloma múltiplo .....	4
<b>Figura 4</b>	Atuais alvos terapêuticos para imunoterapia de pacientes com MM.....	13
<b>Figura 5</b>	Drogas com anticorpos monoclonais aprovadas ou em fase de testes, visando os receptores de células T .....	15
<b>Figura 6</b>	Interação da molécula de OX40 expressa por linfócitos T com seu ligante (OX40L) na membrana de células apresentadoras de antígenos (APC).....	17
<b>Figura 7</b>	Diagrama demonstrando alguns dos possíveis benefícios da ligação do OX40-OX40L na imunoterapia contra o câncer.....	18
<b>Figura 8</b>	Mecanismos envolvidos na interação do 4-1BB e seu ligante (4-1BBL).....	20
<b>Figura 9</b>	Interação entre a molécula CD40 expressa nos linfócitos B com o seu ligante (CD40L) na superfície dos linfócitos T CD4 <sup>+</sup> efetor (T helper – Th).....	22
<b>Figura 10</b>	Efeitos pleiotrópicos resultantes da interação de células T CD40L <sup>+</sup> ativadas, plaquetas CD40L <sup>+</sup> ativadas ou CD40L solúvel com células imunes e não imunes.....	23

<b>Figura 11</b>	A sinalização via interação de CD40 e do seu ligante (CD40L) participa da angiogênese.....	24
<b>Figura 12</b>	Alterações descritas no sistema imune dos pacientes com MM e possíveis abordagens terapêuticas .....	26
<b>Figura 13</b>	Fluxograma de captação dos pacientes acompanhados no ambulatório de onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, com suspeita clínica de mieloma múltiplo .....	33
<b>Figura 14</b>	Exemplos dos painéis de citometria de fluxo de sangue periférico, delimitando os percentuais de expressão .....	36
<b>Figura 15</b>	Valores percentuais de linfócitos B CD20 <sup>+</sup> e CD20 <sup>low</sup> e de linfócitos T em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo (n=40) e de controles saudáveis.....	41
<b>Figura 16</b>	Valores percentuais de leucócitos totais OX40 <sup>+</sup> , CD40 <sup>+</sup> , CDL40 <sup>+</sup> em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo (n=40) e de controles saudáveis.....	42
<b>Figura 17</b>	Valores percentuais.....	43
<b>Figura 18</b>	Dosagem sérica dos níveis.....	44
<b>Figura 19</b>	Análises de expressão de linfócitos B e T, moléculas OX40 <sup>+</sup> , CD40 <sup>+</sup> , CD40L <sup>+</sup> , em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo de acordo com o <i>International Staging System (ISS)</i> .....	45
<b>Figura 20</b>	Valores de níveis séricos solúveis expressos em pg/mL .....	46
<b>Figura 21</b>	Níveis percentuais de CDs.....	47
<b>Figura 22</b>	Níveis séricos.....	48

<b>Figura 23</b>	Valores percentuais de CDs.....	49
<b>Figura 24</b>	Níveis percentuais de CDs.....	50
<b>Figura 25</b>	Correlação dos valores percentuais de linfócitos.....	51
<b>Figura 26</b>	Curva de sobrevida global dos pacientes portadores de MM do Hospital de Câncer de Pernambuco .....	53
<b>Figura 27</b>	Sobrevida global entre os grupos de pacientes de acordo com os valores de cut-off obtido na curva ROC .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Apresentações clínicas habitualmente descritas como forma extramedular, do mieloma múltiplo.....	5
<b>Tabela 2</b>	Sensibilidade diagnóstica dos testes ou combinação de testes usados para triagem de gamopatias monoclonais.....	7
<b>Tabela 3</b>	Critérios diagnósticos revisados em 2014 para mieloma múltiplo e mieloma múltiplo assintomático pelo <i>Internacional Myeloma Working Group</i> (IMWG).....	8
<b>Tabela 4</b>	Fatores de risco no mieloma múltiplo, o <i>Internacional Staging System</i> e o ISS revisado (R-ISS) .....	11
<b>Tabela 5</b>	Descrição das frequências das características biológicas, desfecho clínico e distribuição dos casos conforme DS e ISS dos pacientes com mieloma múltiplo.....	40
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros encontrados da curva <i>Receiver Operating Characteristic</i> -ROC .	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>aCGH</b>	Hibridização genômica comparativa baseada em microarray
<b>AAs</b>	Ascendência afro-americana
<b>ATL</b>	Leucemia de células T do adulto
<b>Bcl-2</b>	do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BMCA</b>	do inglês, <i>B-cell maturation agente</i> (agente de maturação de células B)
<b>BMO</b>	Biópsia de medula óssea
<b>BMSCs</b>	Células tronco adultas mesenquimais derivadas da medula óssea
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
<b>CAR-T Cell</b>	do inglês, <i>Chimeric antigen receptor (CAR) T cell Therapy</i> .
<b>CD</b>	Células dendríticas
<b>CD40</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation 40</i>
<b>sCD40</b>	do inglês, <i>soluble cluster of differentiation 40</i>
<b>CD40L</b>	do inglês, <i>cluster of differentiation 40 ligand</i>
<b>CP</b>	Células plasmáticas ou plasmocitárias
<b>CTLA-4</b>	do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
<b>DHL</b>	Desidrogenase láctica
<b>DRM</b>	Doença Residual Mínima
<b>eGFR</b>	Taxa de filtração glomerular estimada
<b>EAs</b>	Europeus-americanos
<b>ECOG</b>	do inglês, <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
<b>ELISA</b>	do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EMM</b>	Manifestações extramedulares
<b>EPS</b>	Eletroforese de proteínas séricas
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>Fas-L</b>	do inglês, <i>Fas ligand</i>
<b>FDA</b>	do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FISH</b>	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
<b>FLC</b>	do inglês, <i>Free light chain</i> (cadeias leves livres)
<b>GEP</b>	Perfil de expressão gênica
<b>GITR</b>	do inglês, <i>Glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein</i>

<b>HD</b>	Hemodiálise
<b>HCP</b>	Hospital de Câncer de Pernambuco
<b>IDO</b>	Indoleamine 2,3-dioxygenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon gama
<b>IgA</b>	Imunoglobulina A
<b>IgD</b>	Imunoglobulina D
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgH</b>	Locus da cadeia pesada da imunoglobulina
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IMiDs</b>	Imunomoduladores
<b>IMIP</b>	Instituto Materno Infantil de Pernambuco
<b>IMWG</b>	do inglês, <i>Internacional Myeloma Working Group</i>
<b>IPs</b>	Inibidores de proteassoma
<b>ISS</b>	do inglês, <i>International Staging System</i>
<b>JNKs</b>	<i>c-Jun N-terminal kinases</i> (JNKs)
<b>LAG-3</b>	do inglês, <i>Lymphocyte-activation gene 3</i>
<b>LES</b>	Lúpus sistêmico eritematoso
<b>MAbs</b>	Anticorpos monoclonais
<b>MDCs</b>	Células dendríticas mielóides
<b>MDSC</b>	do inglês, <i>myeloid-derived suppressor cells</i> (células supressoras derivadas da linhagem mieloide)
<b>MGUS</b>	Gamopatia Monoclonal de Significado indeterminado
<b>MHC</b>	Complexo de Histocompatibilidade maior
<b>MM</b>	Mieloma múltiplo
<b>MO</b>	Medula óssea
<b>NF-<math>\kappa\beta</math></b>	do inglês, <i>factor nuclear kappa B</i>
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares do sangue periférico
<b>PCs</b>	Células plasmáticas
<b>PDCs</b>	células dendríticas plasmocitóides
<b>PD-1</b>	do inglês, <i>Programmed cell death protein 1</i>
<b>PD-L1</b>	do inglês, <i>Programmed death-ligand 1</i>
<b>PET-CT</b>	Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons
<b>PI3K</b>	Inibidores de fosfatidilinositol-3-cinase
<b>RNM</b>	Ressonância Nuclear Magnética

<b>sβ2M</b>	β2 microglobulina sérica
<b>SG</b>	Sobrevida global
<b>SLP</b>	Sobrevida livre de progressão
<b>SMM</b>	Mieloma múltiplo assintomático ou <i>smoldering</i>
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TC</b>	Tomografia computadorizada
<b>TCTH</b>	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas
<b>TGF-β</b>	Fator de Crescimento e Transformação Beta
<b>Th</b>	Células T <i>Helper</i>
<b>TIL</b>	Infiltrados linfocitários tumorais
<b>TIM-3</b>	do inglês, <i>T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
<b>TLR</b>	receptor Toll-like
<b>TNF-α</b>	Fator de Necrose tumoral
<b>TNFRs</b>	do inglês, <i>tumor necrosis factor receptor superfamily</i>
<b>Treg</b>	Células T reguladoras
<b>TSLP</b>	Linfopoetina estromal tímica
<b>VEGF</b>	Fator de Crescimento Endotelial Vascular



## SÚMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	Mieloma múltiplo .....	1
1.1.1	Epidemiologia.....	1
1.1.2	Características clínicas.....	3
1.1.3	Características laboratoriais e dos exames de imagem.....	6
1.1.4	Alterações moleculares e citogenéticas .....	9
1.1.5	Prognóstico e estratificação de risco no mieloma múltiplo .....	10
1.1.6	Tratamento do mieloma múltiplo .....	11
1.2	Aspectos gerais do sistema imune no câncer.....	13
1.2.1	A molécula coestimuladora OX40 (CD134) e seu ligante OX40L (CD252).....	16
1.2.2	A molécula coestimuladora 4-1BB (CD137) e seu ligante 4-1BBL .....	18
1.2.3	A proteína CD40 e seu ligante CD40L.....	21
1.3	Sistema imune no mieloma múltiplo .....	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
2.1	Objetivo Geral .....	29
2.1	Objetivos Específicos .....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1	Detalhamento do estudo e aspectos éticos.....	31
3.2	População do estudo .....	31
3.3	Critérios de elegibilidade.....	31
3.3.1	Critérios de inclusão .....	31
3.3.2	Critérios de exclusão.....	32
3.4	Procedimentos para captação e acompanhamento dos participantes.....	32
3.5	Técnicas de coleta, processamento e testes laboratoriais .....	34
3.5.1	Coleta e preparação de amostras biológicas .....	34
3.5.2	Testes laboratoriais e de imagens .....	34
3.5.3	Determinação da concentração sérica de sCD40L, sOX40 e s4-1BB.....	35
3.5.4	Determinação da expressão de linfócitos T e B e da expressão de OX40, CD40 e CD40L na superfície celular dos leucócitos e linfócitos .....	35

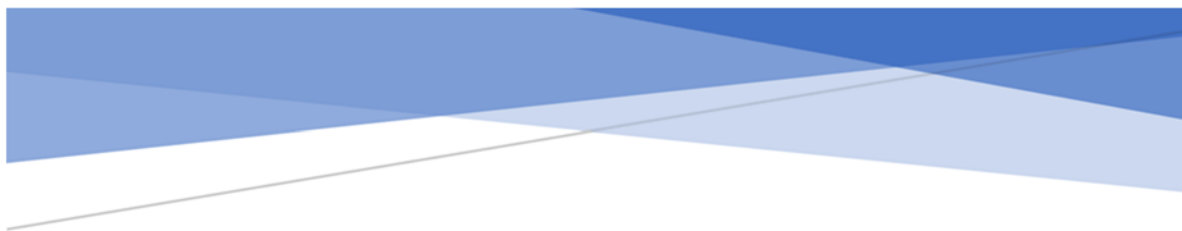
3.6	Análise Estatística.....	37
3.6.1	Análises de Associação.....	37
3.6.2	Análise de Sobrevida .....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>
4.1	Descrição das características clínicas dos pacientes.....	39
4.2	Análise dos níveis de linfócitos T, B (CD20+) no sangue periférico de pacientes e controles.....	40
4.3	Análise dos níveis de expressão OX40+, CD40+ e CD40L no sangue periférico de pacientes e controles .....	41
4.4	Análise dos níveis solúveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L no sangue periférico....	43
4.5	Análise dos níveis de leucócitos, linfócitos e de moléculas OX40+, CD40+ e CD40L no sangue periférico de acordo com <i>International Staging System</i> (ISS) ..	44
4.6	Análise dos níveis solúveis de s4-1bb, sox40 e scd40l no sangue periférico de acordo com <i>International Staging System</i> (ISS) .....	45
4.7	Análise dos níveis de leucócitos, linfócitos e de moléculas OX40+, CD40+ e CD40L entre grupos de pacientes entre os grupos de pacientes que evoluíram para óbito e sobreviveram.....	46
4.8	Análise dos níveis solúveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L entre os grupos de pacientes que evoluíram para o óbito e sobreviveram.....	48
4.9	Análise dos níveis expressão de CD20+, CD3+, OX40+, CD40+ e CD40L+ na medula óssea.....	49
4.9.1	De acordo com <i>International Staging System</i> (ISS) .....	49
4.9.2	Comparação entre os grupos de pacientes que evoluíram para óbito e sobreviveram.....	50
4.10	Correlação dos níveis expressão de leucócitos, linfócitos e de moléculas OX40+, CD40+ e CD40L+ entre o sangue periférico e medula óssea.....	51
4.11	Análise da sobrevida global.....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>

## **APÊNDICES**

- Apêndice 1** Formulário de pesquisa para coleta de dados clínico, laboratoriais e informações sobre exames de imagem
- Apêndice 2** Termo de consentimento livre e esclarecido - paciente
- Apêndice 3** Termo de consentimento livre e esclarecido – controles
- Apêndice 4** Imagem ilustrativa de achado de alta expressão de CD20<sup>high</sup> nos pacientes comparados aos controles

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Estadiamento de Durie-Salmon
- Anexo 2** Critérios de resposta segundo o *International Myeloma Working Group* – IMWG
- Anexo 3** Quadro representando os valores de referência do laboratório terceirizado utilizado pelo Hospital de Câncer de Pernambuco- Laboratório CIAC
- Anexo 4** Cópia do Parecer Consubstanciado de aprovação do comitê de ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco



# INTRODUÇÃO

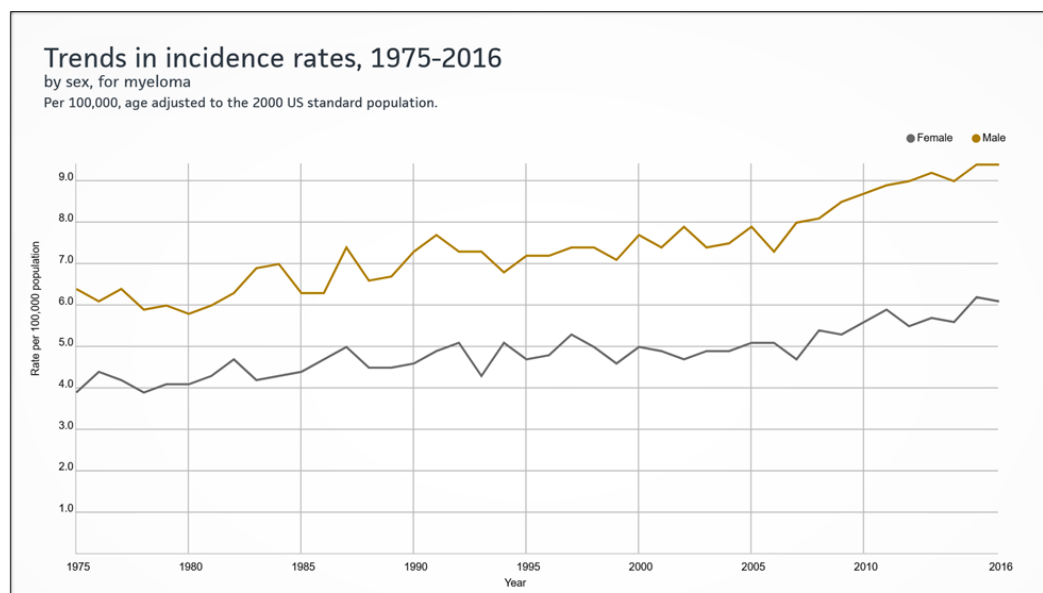


# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MIELOMA MÚLTIPLO

### 1.1.1 Epidemiologia

O mieloma múltiplo (MM) é uma desordem caracterizada por proliferação clonal de plasmócitos na medula óssea, cursando com expressão de proteínas monoclonais em sangue e/ou urina, associado à disfunção orgânica (Palumbo e Anderson 2011). Na idade adulta, é considerada a segunda neoplasia hematológica em ordem de frequência, atrás apenas dos linfomas, correspondendo a cerca de 1% dos tumores malignos e 10-15% das neoplasias hematológicas (Rajkumar 2020). Para 2020, a estimativa de casos novos de MM nos Estados Unidos foi de 32.270 casos e cerca de 12.830 mortes, representando 1,8% de todos os tipos de câncer a serem registrados, e vem demonstrando aumento progressivo no número de diagnóstico em ambos os sexos, como visto na Figura 1 (Siegel et al. 2020).



Fonte: Siegel et al. (2020)

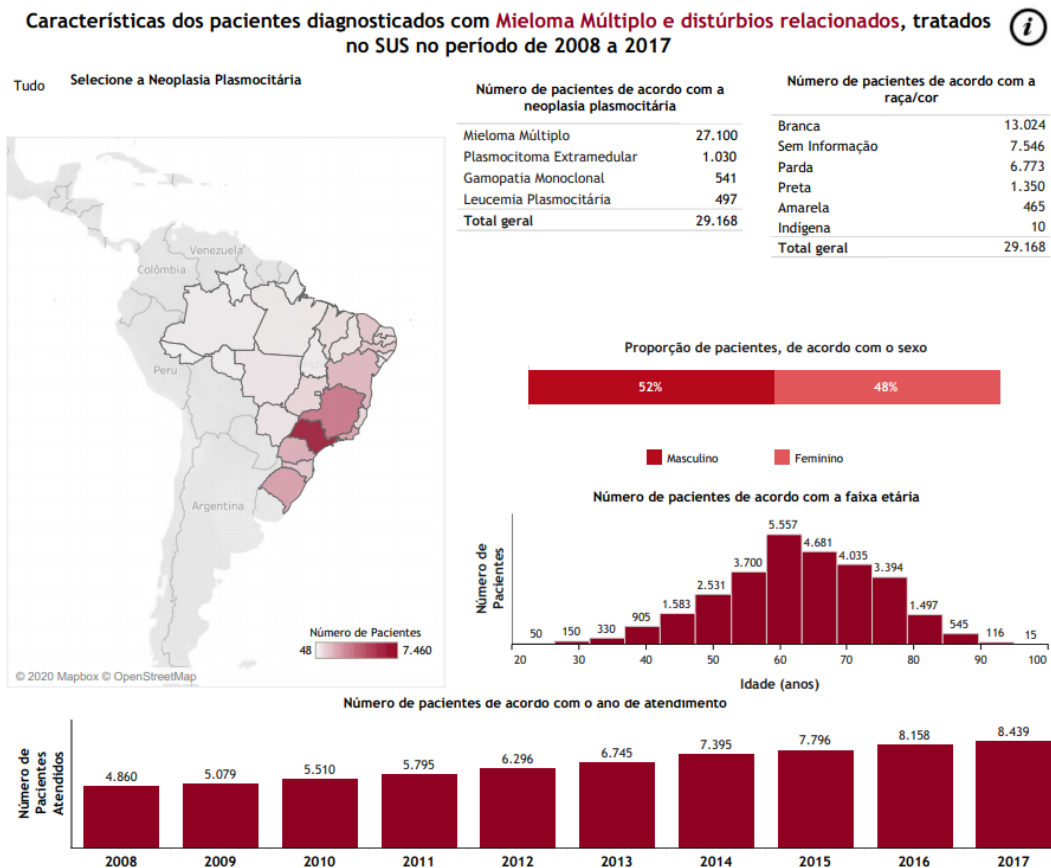
**Figura 1** - Expectativa da Sociedade Americana de Câncer, para casos novos de mieloma múltiplo, de acordo com sexo, por ano, em cada 100.000 habitantes, nos Estados Unidos em 2020.

O MM acomete mais homens que mulheres, predominando numa faixa etária de 50-70 anos, com seu pico entre os 60-65 anos, e chega a ser duas vezes mais frequentes em negros que brancos americanos (Rajkumar e Kumar 2016). No Brasil a mediana de idade de apresentação do MM é de 60 anos (Callera et al. 2011; Todaro et al. 2011).

No Brasil, dados epidemiológicos são escassos e na sua maioria publicados por centros da região Sudeste com estudos de serviços específicos e não como um grande registro nacional, e portanto, podem não refletir as diferenças regionais de um país com tamanha diversidade socioeconômica, dificuldades de acesso aos serviços de saúde e a terapias específicas, como visto em nosso meio. Hungria et al. (2008), analisaram 1.112 pacientes, no período de 1998 a 2004, e relataram que a mediana de idade foi de 60,5 anos, abaixo das descritas em países desenvolvidos, e a maioria dos pacientes apresentava doença avançada em estágio III de Durie & Salmon (76,5%).

No Vale do Paraíba, em São Paulo, a incidência e prevalência do MM em seis meses corresponderam, respectivamente, a 0,7 e 5,7/100.000 habitantes. Dados antigos do IBGE, de 1991-1995, demonstraram taxas brutas de incidência em homens e mulheres na cidade de Campinas, respectivamente de 0,8 e 0,9/100.000 habitantes (Callera et al. 2011).

Em 2019, o Observatório de Oncologia publicou em seu site um estudo retrospectivo, sobre a epidemiologia do Mieloma Múltiplo no Brasil no período de 10 anos, baseados em dados abertos e disponibilizados pelo SUS tendo como fonte de pesquisa a base de dados da APAC, demonstrando que a mediana de idade dos pacientes foi de 63 anos, houve predomínio de sexo masculino e assim como nos países da Europa e dos EUA, nota-se um aumento progressivo das taxas de diagnóstico, quase dobrando entre os anos de 2008 -2017, como exemplificado na Figura 2 (Corrêa Neto 2019).



Fonte: Corrêa Netto (2019)

**Figura 2** – Características epidemiológicas do mieloma múltiplo, tratados no Sistema Único de Saúde (SUS) do Brasil, ao longo de 10 anos.

### 1.1.2 Características Clínicas

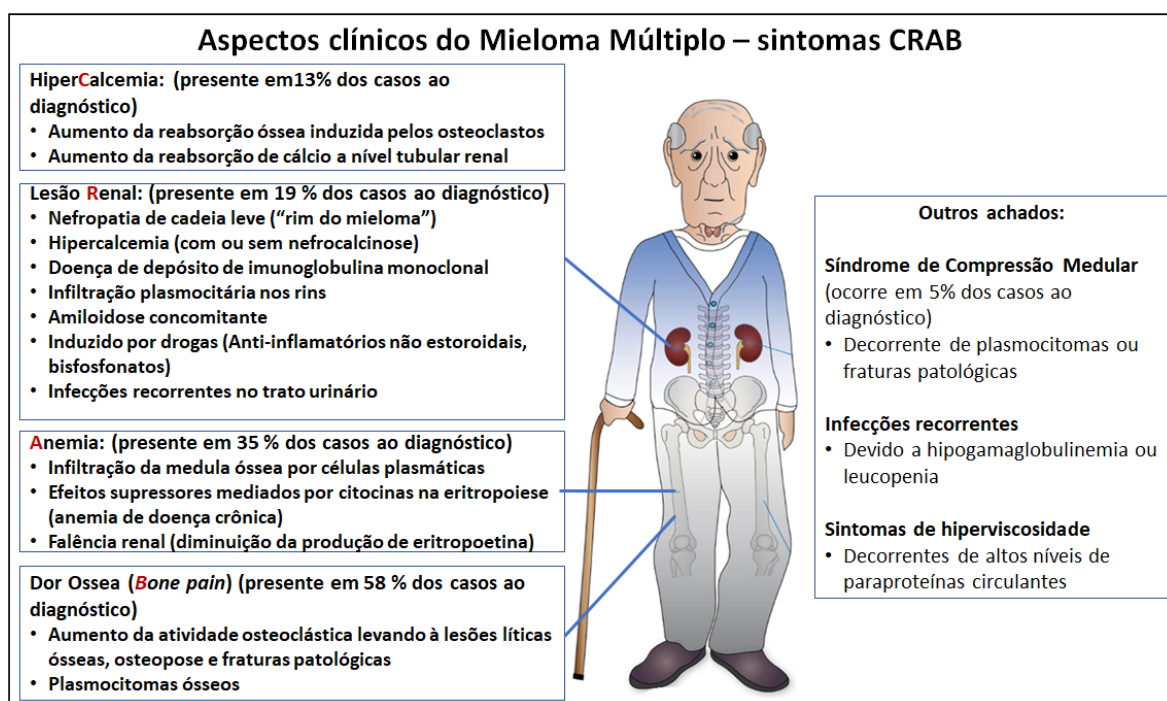
No MM devido a proliferação clonal dos plasmócitos na medula óssea, há expressão de uma proteína monoclonal quantificável em sangue e/ou urina, configurando os chamados MM secretores (representando a grande maioria dos casos), associado à alguma disfunção orgânica, denominados, sintomas CRAB – hipercalcemia, lesão renal, anemia e lesões líticas (Dimopoulos et al. 2015; Moreau 2017; Moreau et al. 2017).

O MM é uma doença heterogênea, e muitos casos são precedidos por uma fase conhecida como gamopatia monoclonal de significado indeterminado (do inglês- *Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance* - MGUS) que pode estar presente em 3-4% da população acima de 50 anos. A maioria são assintomáticos e detectados frequentemente como achado laboratorial incidental. Acredita-se que menos de 10% dos mielomas clinicamente manifestos tiveram história prévia de MGUS, entretanto, estudos mais recentes defendem que a fase de MGUS deve preceder todos os mielomas, sendo estimado em 1% ao ano o risco de

progressão dessa fase para o MM sintomático (Berenson et al. 2010; Kyle et al. 2014; Rajkumar et al. 2014).

O Mieloma múltiplo assintomático ou *smoldering* (SMM), é um estágio intermediário entre MGUS e MM, com taxa de progressão para a fase sintomática de aproximadamente 10% ao ano (Rajkumar e Kumar 2016).

Os sintomas mais comuns de apresentação do MM são fadiga e dor óssea (Figura 3). A anemia ocorre em aproximadamente 75% dos pacientes e pode contribuir para a fadiga. Lesões ósseas podem ser detectadas em até 80% dos pacientes. Outros achados frequentes são: hipercalcemia (15%) e elevação de creatinina acima de 2mg/dL em 20% dos casos (Kyle et al. 2003; Willan et al. 2016).



Fonte: Adaptado de Willan et al. (2016).

**Figura 3** - Resumo dos sintomas CRAB e fatores pelos quais são provocados tais manifestações nos pacientes portadores de mieloma múltiplo.

Aproximadamente 1-2% dos pacientes com MM, apresentam doença extramedular (resumidas na Tabela 1) ao diagnóstico e até 8% poderão desenvolver tais achados ao longo do curso da doença (Varettoni et al. 2010; Short et al. 2011; Touzeau e Moreau 2016).



**Tabela 1** – Apresentações extramedulares do mieloma múltiplo.

<b>Apresentação extramedular</b>	<b>Definição</b>	<b>Considerações especiais</b>
Plasmocitomas ósseos	Plasmocitomas ósseos surgindo em continuidade com a medula óssea.	Massas tumorais que afetam o esqueleto axial: costelas, vértebras, crânio, esterno, pélvis.
Doença extramedular (EMM)	Tumoração de partes moles (plasmocitoma) ou infiltração por células plasmáticas em um sítio anatômico distante da medula óssea. Secundário à disseminação hematogênica.	Afetam principalmente fígado, pele, sistema nervos central, derrame pleural, rins, gânglios linfáticos, pâncreas. Pode ser desencadeada por procedimentos invasivos (por exemplo, inserção de cateter, cicatrizes cirúrgicas).
Leucemia de células plasmáticas (LCP)	Variante agressiva do mieloma caracterizada pela presença de células plasmáticas circulantes em sangue periférico (> 20% e / ou contagem absoluta > $2 \times 10^9$ / L)	Pode ser considerado EMM por causa do envolvimento do sangue. A doença extramedular também é muito comum em pacientes com LCP.
Plasmocitoma Solitário (PS)	Infiltração óssea ou extramedular localizada por células plasmáticas clonais sem disseminação tumoral sistêmica.	O estudo da medula óssea e levantamento esquelético são ambos normais. Os sintomas CRAB estão ausentes. A radioterapia focal é o tratamento de escolha.

**Fonte:** Adaptado de Touzeau e Moreau (2016)

**Legenda-** CRAB: hipercalcemia, insuficiência renal, anemia, lesões ósseas.

O MM também é associado à importante disfunção imunológica, afetando o sistema imune adaptativo e inato, e frequentemente se apresenta com hipogamaglobulinemia e imunoparesia (supressão de uma ou mais das imunoglobulinas não envolvidas), levando a uma maior propensão a infecções. A patogênese envolvida na redução da produção de imunoglobulina policlonal por células plasmáticas normais (CP) é complexa e estudos têm relatado prejuízo imunológico causado pela desregulação do repertório normal das células T e B e do *B-cell maturation agent* (BCMA) em pacientes com MM. Nos casos de MGUS e SMM, imunoparesia tem se mostrado um marcador prognóstico de progressão para MM sintomático (Sørrig et al. 2017).

### 1.1.3 Características laboratoriais e dos exames de imagem

A presença de uma proteína monoclonal (proteína M) em sangue ou urina é a característica principal do MM, sendo vista em 82% dos pacientes na eletroforese de proteínas séricas. A sensibilidade aumenta para 93% quando se utiliza a imunofixação sérica e chega a 97% com a adição das técnicas de ensaios de cadeia leve livre (FLC do inglês – *Free light chain*) no soro ou nos estudos de urina de 24 horas. Sempre que uma suspeita de MM é feita, recomenda-se realizar os testes de *screening* com: eletroforese de proteínas séricas, imunofixação sérica, e FLC em soro, além de eletroforese de proteínas ou imunofixação em urina de 24 horas (Kyle et al. 2003; Rajkumar e Kumar 2016). A complementação com todos os testes, sempre que disponíveis é a situação ideal, pois ajuda na diferenciação do diagnóstico entre as diversas patologias que podem cursar com produção de proteínas monoclonais, como mostra a Tabela 2 (Willrich e Katzmann 2016).

A proteína M é do tipo IgG em 50% dos casos, seguidos de IgA em 20%, imunoglobulina de cadeia leve isolada em 20%, IgD em 2% e IgM em 0,5%. Apenas 2-3% dos MM não apresentam nenhum tipo de proteína M, utilizando-se as ferramentas diagnósticas citadas acima e são chamados de MM não secretores (Chawla et al. 2015). Quando da suspeita de MM, além dos exames acima descritos, utilizados no rastreamento do componente monoclonal faz-se necessário os seguintes exames para o diagnóstico: hemograma completo, dosagem dos níveis de cálcio sérico, níveis de creatinina, desidrogenase láctica (DHL), beta2-microglobulina, velocidade de hemossedimentação VHS), além do estudo de medula óssea, para os quais a combinação de aspirado medular/mielograma e biópsia de medula óssea é preferencial (Stifter et al. 2010).

**Tabela 2** - Sensibilidade diagnóstica dos testes ou combinação de testes usados para triagem de gamopatias monoclonais.

	N	Teste simples (Soro) (%)			Combinações de Ensaio (%)		
		EPS	IFE	FLC	EPS + FLC	EPS + IFE + FLC (Soro);	Testes (Soro + Urina)
MM	467	87,6	94,4	98,6	100	100	100
WM	26	100	100	73,1	100	100	100
SMM	191	94,2	98,4	81,2	99,5	100	100
MGUS	524	81,9	92,8	42,4	88,7	97,1	100
Plasmocitoma	29	72,4	72,4	55,2	86,2	89,7	89,7
POEMS	31	74,2	96,8	9,7	74,2	96,8	96,8
AL	581	65,9	73,8	88,3	96,2	97,1	98,1
LCDD	18	55,6	55,6	77,8	77,8	77,8	83,3

Fonte – Adaptado de Willrich e Katzmann (2016).

**Legenda** - EPS, eletroforese de proteínas sérica; IFE, Imunofixação/imunoeletroforese; FLC, free light chain por nefelometria; MM, mieloma múltiplo; WM, Macroglobulinemia de Waldenström's; SMM, mieloma múltiplo *smoldering*; MGUS, gamopatia monoclonal de significado indeterminado; POEMS, polineuropatia, organomegalia, endocrinopatia, proteína monoclonal, lesões de pele; AL, amiloidose de cadeia leve (AL); LCDD, doença de depósito de cadeia leve.

Também é fundamental a avaliação óssea, com no mínimo radiografia de crânio, bacia, coluna cervical, torácica e lombar, ossos longos, entretanto, atualmente o recomendado devido a maior sensibilidade e especificidade, é o uso de tomografia de corpo inteiro de baixa voltagem ou Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET-CT), na busca de lesões osteolíticas. A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de corpo inteiro ou coluna e pelve, pode ser necessária nos casos suspeitos de MM *smoldering*, para a busca de lesões ósseas focais, assim como é necessária nos casos de lesões osteolíticas que envolvam a coluna, para afastar compressão medular e determinar a necessidade de procedimentos como vertebroplastia ou cifoplastia (Rajkumar e Kumar 2016).

Em 2014, o *Internacional Myeloma Working Group* (IMWG), atualizou os critérios diagnósticos de MM, conforme apresentado na Tabela 3, incorporando como definidores de

MM sintomático, a presença de plasmocitose medular acima de 60%, dosagem de FLC mostrando uma relação da cadeia leve afetada versus não afetada  $\geq 100$ , desde que a concentração absoluta da cadeia leve afetada seja  $\geq 100$  mg/L, e pelo menos uma lesão óssea focal que tenha acima de 5 mm avaliada por RNM.

**Tabela 3** - Critérios diagnósticos revisados em 2014 para mieloma múltiplo e mieloma múltiplo assintomático pelo *Internacional Myeloma Working Group* (IMWG).

<b>Mieloma Múltiplo Sintomático</b>	
<b>Eventos definidores de Mieloma Múltiplo</b>	<p><b>Evidência de dano em órgãos-alvo que possa ser atribuído à doença proliferativa de plasmócitos:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmócitos monoclonais na medula óssea <math>\geq 10\%</math> ou biópsia diagnóstica ou plasmocitoma extra-medular, <b>associado</b> a um dos achados abaixo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercalemia – cálcio sérico <math>&gt;1</math> mg/dL do limite superior da normalidade ou <math>&gt;11</math> mg/dL;</li> <li>• Insuficiência renal – clearance de creatinina <math>40</math> mL/min ou creatinina sérica <math>&gt;2</math> mg/dL;</li> <li>• Anemia – hemoglobina <math>&gt;2,0</math> g/dL abaixo do Limite superior de normalidade ou <math>\leq 10,0</math> g/dL;</li> <li>• Lesões ósseas – <math>\geq 1</math> lesão lítica na radiografia, na Tomografia computadorizada ou no exame de Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET/CT)</li> </ul> </li> </ul>
	<p><b>Um ou mais dos seguintes biomarcadores de malignidade:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmócitos monoclonais na medula óssea <math>\geq 60\%</math>;</li> <li>• Relação da cadeia leve afetada versus não afetada <math>\geq 100</math>, desde que a concentração absoluta da cadeia leve afetada seja <math>\geq 100</math> mg/L;</li> <li>• Mais de uma lesão focal <math>\geq 5</math>mm na Ressonância nuclear magnética (RNM).</li> </ul>
<b>Eventos definidores de Mieloma Múltiplo Assintomático ou <i>Smoldering</i></b>	<p><b><u>Ambos</u> os critérios abaixo devem ser encontrados:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plasmócitos monoclonais na medula óssea entre <math>10\%</math> e <math>60\%</math> e/ou proteína monoclonal sérica (IgG ou IgA) <math>\geq 3</math> g/L ou proteína monoclonal urinária <math>\geq 500</math> mg em 24h;</li> <li>• Ausência de eventos definidores de MM ou de amiloidose.</li> </ul>

Fonte – Adaptado de Rajkumar et al. (2014).

### 1.1.4 Alterações Moleculares e Citogenéticas

Embora o MM ainda seja considerada uma única doença, os estudos têm mostrado que as neoplasias de células plasmáticas apresentam diferentes padrões de alterações citogenéticas ao diagnóstico. Através de técnicas de hibridização fluorescente “in situ” (FISH) feitas em medula óssea, observou-se que cerca de 40% dos MM são caracterizados por trissomias nas células tumorais e 30% demonstram translocações envolvendo o locus da cadeia pesada de imunoglobulina (IgH) no cromossomo 14q32. Cerca de 15% apresentam concomitantemente trissomias e translocações no IgH, (Rajkumar e Kumar 2016). Esta classificação tornou-se fundamental na estratificação de risco dos pacientes, sendo atualmente utilizada como determinante na escolha do tratamento (Rajkumar 2020).

Acredita-se que trissomias e translocações do IgH sejam as anormalidades citogenéticas iniciais da doença e ocorram ainda na fase de MGUS. Alterações citogenéticas chamadas de secundárias {ganho do braço longo do cromossomo 1; deleção do braço curto dos cromossomos 1 17 13 [del(1p); del(17p); del(13)]; ativação do gene RAS e translocações envolvendo o gene *MYC*} acontecem ao longo da evolução da doença e podem influenciar o curso evolutivo, resposta ao tratamento e prognóstico dos pacientes (Kumar et al. 2012; Bianchi e Anderson 2014). Esses eventos são apontados como os fatores desencadeantes no desenvolvimento e evolução do MM.

Com o tratamento da doença, e após períodos de remissão obtidos com os tratamentos instituídos, nota-se a erradicação de alguns clones, porém os tumores podem seguir vários caminhos evolutivos no curso da doença de um paciente.

Keats et al. (2012), utilizando-se de análises gênicas em amostras coletadas em diferentes pontos durante o curso da doença de 28 pacientes com mieloma múltiplo, descobriram que os genomas de pacientes com risco padrão [cariótipos normais ou trissomias isoladas, t(11;14) e t(6;14)] sofrem poucas mudanças ao longo do tempo. Contudo, aqueles que ao diagnóstico apresentam-se com alto risco citogenético, sofrem significativamente mais mudanças ao longo do tempo. Nesse trabalho foi possível demonstrar que os clones aparentemente competem em si e se sobrepõe aos demais com o passar do tempo e evolução da doença, variando de acordo com a terapia utilizada, fazendo com que em dado momento seja selecionado um clone mais resistente à terapia e que, em geral, levará a um comportamento clínico mais agressivo.

### 1.1.5 Prognóstico e Estratificação de risco no Mieloma Múltiplo

A sobrevida do paciente com mieloma múltiplo tem aumentado nos últimos anos, mas apesar de todos os avanços e novas terapias, mantém-se como uma doença incurável, com uma média de sobrevida de 5-7 anos. Os fatores que influenciam e definem o prognóstico podem ser relativos ao próprio paciente, ao estágio do tumor, alterações biológicas (citogenéticas) e resposta à terapia. Dentre os fatores relacionados ao paciente, são considerados relevantes clinicamente: a idade (>75 anos), o acometimento ou não da função renal, e um pior *performance status* (Eastern Cooperative Oncology Group - ECOG >2).

Os relacionados ao tumor incluem: estágio tumoral avançado de acordo com a classificação de Durie-Salmon, alterações citogenéticas de alto risco [translocações: t(4;14), t(14;16), t(14;20); deleções - del(17), del(17p), cariótipos não hiperdiplóides]; leucemia de células plasmáticas, expressão gênica desfavorável e nível elevado de DHL (Bianchi e Anderson 2014; Palumbo et al. 2015; Rajkumar e Kumar 2016).

A classificação do estágio tumoral do mieloma múltiplo é realizada pelo sistema de classificação de Durie-Salmon, vigente desde 1975 – Anexo 1 (Durie e Salmon 1975) e em 2005 foi elaborado o *Internacional Staging System* (ISS) (Greipp et al. 2005), que utiliza como marcadores de atividade tumoral os níveis de  $\beta$ 2-microglobulina ( $s\beta$ 2M) e albumina sérica. Em 2015 o *International Myeloma Working Group* (IMWG) publicou uma revisão do ISS incorporando os achados citogenéticos e o nível de DHL, como representado na Tabela 4, e assim como no ISS original, as curvas de sobrevida global mostram diferenças significativas entre si, com taxas de sobrevida global em 5 anos de 82%, 62%, e 40%, conforme ISS I, II, ou III respectivamente (Palumbo et al. 2015).

A doença de alto risco (ISS III) é mais comum em pacientes com idade avançada, baixo *performance status* e índice de comorbidades aumentado. As principais características clínicas dessa doença são presença de doença extramedular, início rápido dos sintomas clínicos, doença agressiva na recaída, presença de células plasmáticas circulantes e policlonais reduzidas na medula óssea, e altos níveis de cadeia leve livre no soro (Goldschmidt et al. 2019).

**Tabela 4** - Fatores de risco no mieloma múltiplo, o *Internacional Staging System* e o *ISS* revisado (R-ISS).

Fatores prognóstico	Critérios
<b>ISS (2005)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• I: <math>\beta 2M &lt; 3,5\text{mg/L}</math>, albumina <math>\geq 3,5 \text{ mg/dL}</math></li> <li>• II: Não preenche criterios para ISS I ou III</li> <li>• III: <math>\beta 2M \geq 5,5\text{mg/L}</math></li> </ul>
<b>Anormalidades cromossômicas/ FISH</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto risco: Presença de del(17p) e /ou translocação t (4;14) e /ou translocação t (14;16)</li> <li>• Risco padrão: Não ter alterações de alto risco</li> </ul>
<b>DHL</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Normal: DHL sérico <math>&lt; \text{LSN}</math></li> <li>• Elevado DHL sérico <math>\geq \text{LSN}</math></li> </ul>
<b>O novo modelo de estratificação para MM (R-ISS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• I R-ISS: ISS -I, risco citogenético padrão, DHL normal</li> <li>• II R-ISS: Não preenche critérios para R-ISS I ou III</li> <li>• III R-ISS: ISS III e um dos seguintes: risco citogenético alto ou DHL elevada</li> </ul>

Fonte – Adaptado de Palumbo et al. (2015)

**Legenda** - FISH: hibridização fluorescente “in situ”;  $\beta 2M$ :  $\beta 2$ -microglobulina; DHL: desidrogenase láctica; MM: Mieloma múltiplo, LNS: limite superior da normalidade.

### 1.1.6 Tratamento do Mieloma Múltiplo

O tratamento do MM evoluiu nas últimas décadas e com isso, a mediana de sobrevida global (SG) dos casos de MM recém-diagnosticados melhorou progressivamente ao longo do tempo, passando de 3,9 anos para os casos diagnosticados entre 2004 e 2007, para 6,3 anos para aqueles diagnosticados entre 2008 e 2012 e uma SG mediana que ainda não foi alcançada nos pacientes diagnosticados após 2012 (Hoyos e Borrello 2019; Nandakumar et al. 2019).

A introdução de novas classes de medicamentos como inibidores de proteassoma (IPs), medicamentos imunomoduladores (IMiDs) e de anticorpos monoclonais (mAbs) tem sido o principal determinante da melhoria observada da SG, juntamente com o aprimoramento e melhoria dos cuidados de suporte instituído.

No entanto, a principal causa de morte em pacientes com MM ainda é o desenvolvimento de doença resistente a medicamentos e progressão (D'agostino et al. 2019). O tratamento do MM recém diagnosticado inicia-se por uma fase chamada de indução, que é considerada a mais importante, seguida de transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) se paciente elegível, consolidação e manutenção, a depender da resposta inicial e tratamento das recaídas.

A escolha do tratamento varia de acordo com cada país, dependendo da disponibilidade de drogas, leitos para transplante, mas em geral, no esquema de indução são utilizados esquemas compostos por 2 (terapia dupla) ou 3 drogas (terapia tríplice), sendo uma delas corticóide em altas doses. Os protocolos quimioterápicos mais comuns são: Lenalidomida e Dexametasona (Rd); Bortezomib, Lenalidomida e Dexametasona (VRD); Bortezomib, Talidomida e Dexametasona (VTD); Bortezomib, Ciclofosfamida e Dexametasona (VCD), e nos últimos dois anos a adição de anticorpos monoclonais como Daratumumab (anti-CD38), Elotuzumab (anti-SLAMF7), novos inibidores de proteassoma como Carfilzomib e Ixazomib e os novos imunomoduladores como a Pomalidomida (Rajkumar e Kumar 2016; D'agostino et al. 2019), além do grande avanço nas pesquisas com CAR-T *cells* específicos para MM (Swan et al. 2019).

Nos pacientes tratados em hospitais do Sistema Único de Saúde (SUS), de acordo com as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo, regidas pela Portaria nº 708, agosto 2015, os esquemas disponíveis são mais restritos e em geral composto por Ciclofosfamida, Talidomida e Dexametasona (CTD) ou Talidomida e Dexametasona (TalDexa), para os pacientes elegíveis a transplante de TCTH ou Melfalano, Talidomida e Prednisona (MPT) ou Melfalano e Prednisona (MP) para os idosos ou não elegíveis, com taxas de resposta, sobrevida global e sobrevida livre de progressão inferiores aos esquemas utilizados no mundo, assim como, quando comparado aos pacientes tratados na medicina privado em nosso próprio país (Brasil 2015).

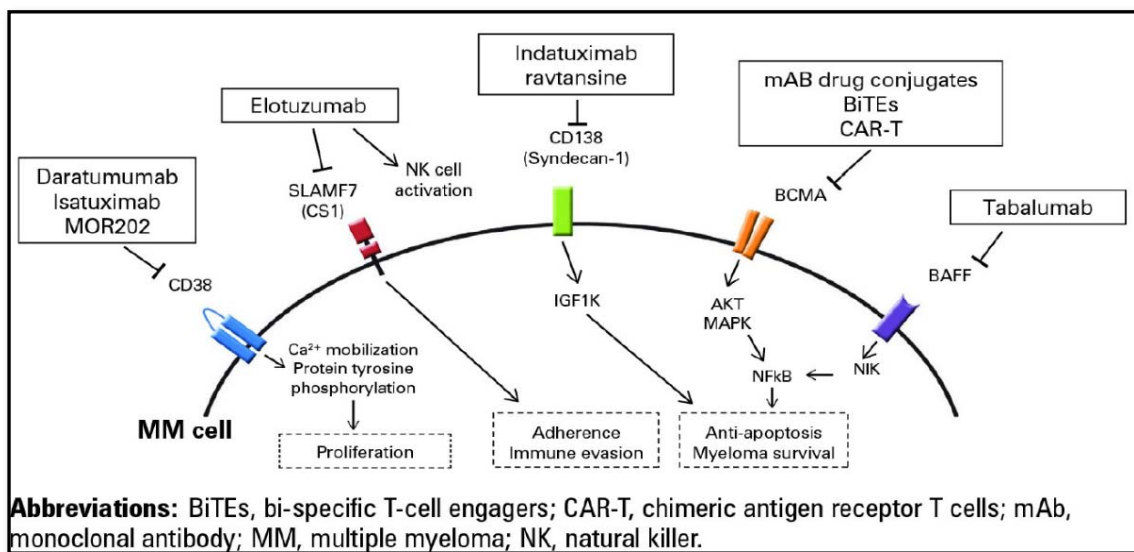
Os esquema de resgate são escolhidos de acordo com a disponibilidade e em geral, utilizando-se de esquemas de drogas aos quais o paciente ainda não foi previamente exposto, particularmente nos casos em que o retratamento ocorra antes de 2 anos do esquema inicial (Palumbo e Anderson 2011; Bianchi e Anderson 2014; Bianchi et al. 2014; Rajkumar e Kumar 2016).

Embora a obtenção de boas taxas de repostas seja um fator preditivo universalmente reconhecido de bom resultado, o controle a longo prazo da doença, ao invés da erradicação completa da mesma, ainda é o objetivo de tratamento do MM nos dias atuais, que na prática, mesmo aqueles casos que negativam a doença residual mínima (DRM) acabam recaindo ao longo do tempo, mantendo a natureza incurável desta neoplasia.

O MM é a neoplasia hematológica que mais sofreu avanços no tratamento nos últimos anos, com diversos medicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA nos últimos 10 anos, como as combinações a base de Carfilzomib, Datarumumab, Elotuzumab, Ixazomib, Pomalidomida, e o uso de CAR-T *cell*. A eficácia e boa tolerabilidade



dessas novas abordagens terapêuticas permitiu seu uso combinado em terapia de indução, consolidação e manutenção, resultando em resposta clínica melhor e sustentada, em níveis sem precedentes, garantindo maior sobrevida global e livre de progressão (Bianchi e Anderson 2014; D'agostino et al. 2019). Sendo assim, as imunoterapias com anticorpos monoclonais têm demonstrado um imenso potencial como mais uma ferramenta para o tratamento dos pacientes (Figura 4).



Fonte – Braunstein e Diefenbach (2019)

**Figura 4** – Atuais alvos terapêuticos para imunoterapia de pacientes com MM.

## 1.2 ASPECTOS GERAIS DO SISTEMA IMUNE NO CÂNCER

No campo da imunidade tumoral, vários aspectos têm sido explorados no contexto de terapias específicas cujo principal são moléculas que participam dos mecanismos de ativação e inibição da resposta imune. Em particular, os mecanismos de inibição são promovidos por moléculas co-inibidoras como CTLA-4, PD-1 / PD-L1, TIM-3 e LAG-3, as quais podem efetivamente diminuir as funções efetoras dos linfócitos T necessárias para destruição das células tumorais (Sturgill e Redmond 2017).

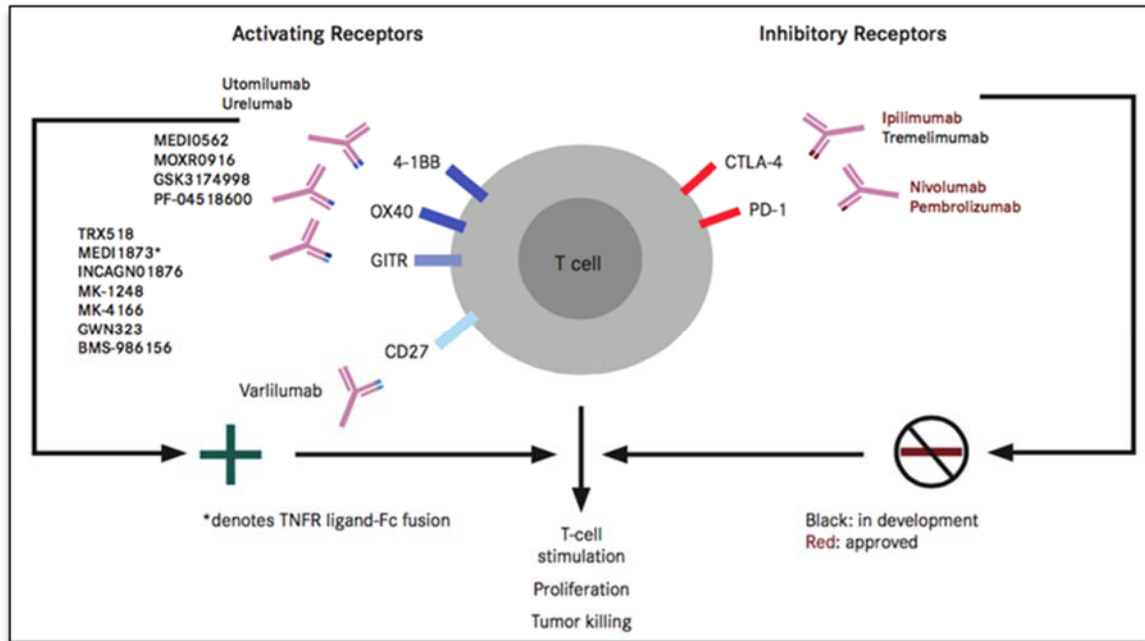
As descobertas de mecanismos da resposta imune que são fundamentais para efetiva eliminação tumoral, assim como pelo escape tumoral tem sido foco no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (So et al. 2008; Linch et al. 2015; Maly e Schirmer 2015).

Várias proteínas tem sido descritas como importantes na interação entre os linfócitos T e outras células do sistema imune, como células dendríticas, monócitos/macrófagos, linfócitos B e neutrófilos (Cheuk et al. 2004; Bartkowiak e Curran 2015). Nesse contexto, para uma eficaz ativação dos linfócitos T são necessários dois eventos: (i) o primeiro sinal, envolvendo o reconhecimento do peptídeo do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) por um receptor específico de células T (TCR) e (ii) o segundo sinal, que envolve a ligação do receptor coestimulatório CD28 pelos seus ligantes B7.1/B7.2 (CD80 / CD86), sendo ambos conhecidos como *priming* de células T *naive* (Sturgill e Redmond 2017).

Além dos mecanismos da ativação inicial, uma sinalização adicional é necessária para orientar a diferenciação das células T e potencializar o desenvolvimento de subconjuntos de células efetoras e de memória, eventos esses que possibilitarão uma robusta atividade de morte tumoral *in vivo*. Os receptores do fator de necrose tumoral (TNFRs), incluindo TNFR induzido por glicocorticóides (GITR; CD357), CD27, OX40 (CD134) e 4-1BB (CD137), são uma família de proteínas responsável pela transdução desses sinais coestimuladores adicionais (Sturgill e Redmond 2017). Alguns estudos clínicos em andamento mostram o potencial dessas moléculas como novas abordagens terapêuticas contra o câncer. Na Figura 5, encontra-se detalhamento de imunoterápicos em uso e de moléculas em fase de estudos clínicos (Moran et al. 2013; Sturgill e Redmond 2017).

A sinalização através de receptores do fator de necrose tumoral (TNFRs) promove uma cascata de eventos críticos, incluindo ativação, diferenciação e desenvolvimento de células T de memória. Os trabalhos tem analisado não só como as moléculas estão expressas nas membranas das células, assim como suas formas solúveis, buscando utilizar-se de anticorpos agonistas ou antagonistas a essas proteínas (tanto as solúveis como as de membrana) para promover o aumento da atividade das células T (Moran et al. 2013).

Os membros da superfamília dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR), a OX40 (CD134) e 4-1BB (CD137) são proteínas coestimuladoras da resposta imune celular e interagem com os seus ligantes (OX40L e 4-1BBL, respectivamente) (Maly e Schirmer 2015). Inicialmente, essas proteínas foram descritas presentes em células T, cuja função é promover a proliferação e sobrevivência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (Cheuk et al. 2004; So et al. 2008; Curti et al. 2013; Maly e Schirmer 2015).



Fonte – Adaptado de Sturgill e Redmond (2017).

**Figura 5** - Drogas com anticorpos monoclonais aprovadas ou em fase de testes, visando os receptores de células T. Os receptores inibidores podem ser inativados usando anticorpos bloqueadores, impedindo que os sinais negativos sejam transduzidos, impedindo a supressão da ativação das células T. Estão sob investigação muitos anticorpos agonistas que têm como alvo receptores de ativação dentro da família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFRs).

O mecanismo de ação de OX40 e 4-1BB, e o modo como efetivamente interferem na regulação da resposta imune tem sido amplamente estudado, assim como suas implicações na gênese de doenças autoimunes. A ideia central é de que as duas moléculas são expressas em células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> efectoras e são capazes de desempenhar funções antagônicas na regulação da resposta imune, pois dependendo do estímulo antigênico podem ter ação protetora, contra o surgimento e desenvolvimento de neoplasias, assim como parecem ter efeitos patogênicos no estímulo inicial de fenômenos autoimunes (So et al. 2008; Linch et al. 2015).

Foi demonstrado que moléculas OX40 e 4-1BB podem ter alvos comuns e levarem por exemplo, a ativação de alguns genes como os da família Bcl-2, que levarão ao aumento da regulação de proteínas antiapoptóticas, promovendo uma maior proliferação e sobrevivência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, cursando com aumento de secreção de citocinas e diferenciação de células T citotóxicas (Cheuk et al. 2004).

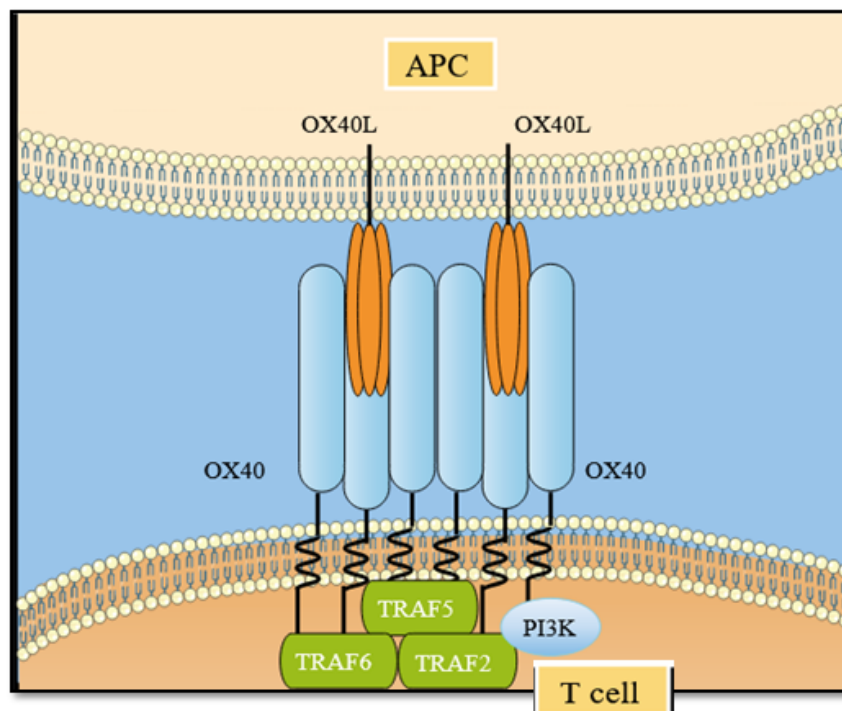
### 1.2.1 A Molécula Coestimuladora OX40 (CD134) e seu ligante OX40L (CD252)

A molécula OX40 (também conhecida como CD134 ou TNFRSF4) é caracterizada como um receptor expresso nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante o processo de ativação antígeno-específico. Sua expressão é estimulada após a ligação do receptor de células T (TCR/CD3), na presença de citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, IL-2 e TNF- $\alpha$ . Sua expressão após o estímulo antigênico é rápida, tendo uma duração um pouco maior nas células TCD4<sup>+</sup> do que nas células TCD8<sup>+</sup>. Na ausência de sinais de ativação poucas células T maduras expressam OX40.

Em humanos, uma proporção significativa do infiltrado inflamatório tumoral de células TCD4<sup>+</sup> expressam a molécula OX40 e são capazes de reconhecer os antígenos tumorais. Portanto, infere-se que um maior número de positividade destas células TCD4/OX40<sup>+</sup> numa amostra tumoral poderia servir como um marcador prognóstico no seguimento desses pacientes após o tratamento. Também, a ativação de células TCD8<sup>+</sup> demonstram uma maior expressão da molécula OX40 em modelos animais e humanos (Linch et al. 2015, Aspeslagh et al. 2016, Fu et al. 2020).

A expressão de OX40 regula a expansão das células T de memória e efetoras, com ação protetora sobre o surgimento de tumores e doenças infecciosas, todavia, sugere-se que tenha um efeito negativo e contribua para a etiopatogenia de alergia e doenças autoimunes (Buchan et al. 2018). Estudos com camundongos deficientes na expressão das moléculas coestimuladoras OX40<sup>-</sup> e seu ligante (OX40L<sup>-</sup>), mostraram redução da expansão clonal de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, confirmando a importância da expressão dessas moléculas (Moran et al. 2013; Aspeslagh et al. 2016).

O ligante de OX40 (OX40L) é uma proteína transmembrana do tipo II, sendo expresso na membrana celular ou podem ser secretados e apresentados na forma solúvel. OX40L é expresso nas células dendríticas, monócitos, neutrófilos, mastócitos, células indutoras de tecido linfoide, células musculares lisas, células endoteliais e células B ativadas (Fu et al. 2020) (Figura 6).



Fonte – Adaptado de Vinay e Kwon (2012)

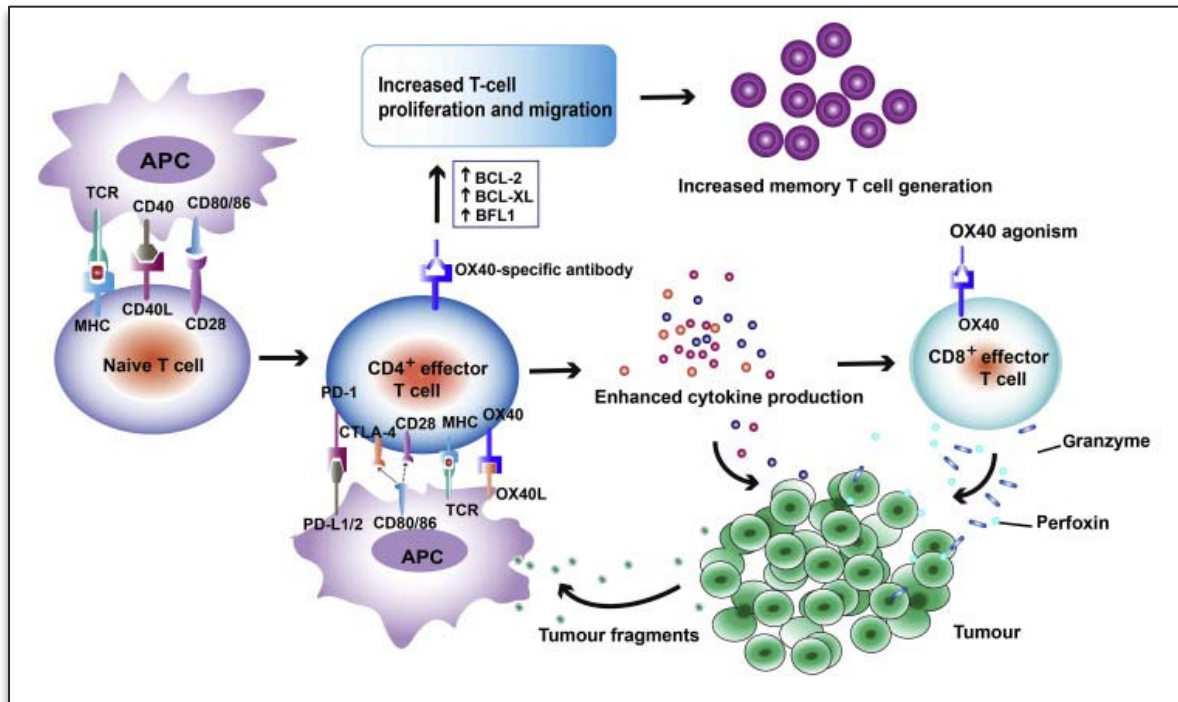
**Figura 6** – Interação da molécula de OX40 expressa por linfócitos T com seu ligante (OX40L) na membrana de células apresentadoras de antígenos (APC).

A interação entre OX40 e OX40L induz a expansão e proliferação de células T e diminui a imunossupressão das células T reguladoras (Treg) para melhorar a resposta imune ao antígeno específico. O OX40L pode deflagrar os sinais OX40 em células T ativadas, além de fornecer sinais através das interações célula-célula e promover aumento da regulação de proteínas anti-apoptótica nas células T melhorando a sobrevivência destas, eleva a produção de citocinas e induz a expansão da célula T CD4<sup>+</sup> de memória.

As interações de OX40L expressos em células B com OX40 das superfícies de células TCD4<sup>+</sup>, promove a expansão e diferenciação de linfócitos T helper 2 (Th2). A interação OX40/OX40L possibilita a ativação da célula NK, com aumento de produção de citocinas e da capacidade de citotoxicidade destas células, amplificando a análise e destruição das células alvo. Os mastócitos, através da via OX40/OX40L podem induzir a proliferação de células T. Ademais, o OX40 desempenha um importante papel na hemostasia e desenvolvimento das células Treg (Deng et al. 2019; Fu et al. 2020).

Curti et al. (2013), realizaram um ensaio clínico fase I usando um anticorpo monoclonal de camundongo (mAb), agonista de moléculas OX40 em pacientes com cânceres sólidos metastáticos e observaram uma regressão da lesão metastática em 12 de 30 pacientes. O OX40 como um potente alvo imunoestimulante, esquematicamente representado na Figura 7,

forneendo uma ferramenta que pode influenciar favoravelmente as propriedades antitumorais das células T circulantes, células B e células Treg intratumorais (Curti et al. 2013; Fu et al. 2020).



Fonte – Adaptado de Fu et al. (2020).

**Figura 7** – Imagem esquemática dos possíveis benefícios da ligação do OX40-OX40L na imunoterapia contra o câncer. Após a apresentação de antígenos tumorais, a ligação do OX40 pode promover a sobrevivência celular CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (não-regulatória), sustentar a expressão de proteína antiapoptótica (BCL-XL, BCL-2 e BFL1), melhorar a produção de citocinas de IL-2, IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$ , amplificar as respostas imunes de células T específicas contra antígenos tumorais (efeito *boost*) e aumentar a geração de células T de memória específica contra o tumor.

### 1.2.2 A molécula coestimuladora 4-1BB (CD137) e seu ligante 4-1BBL

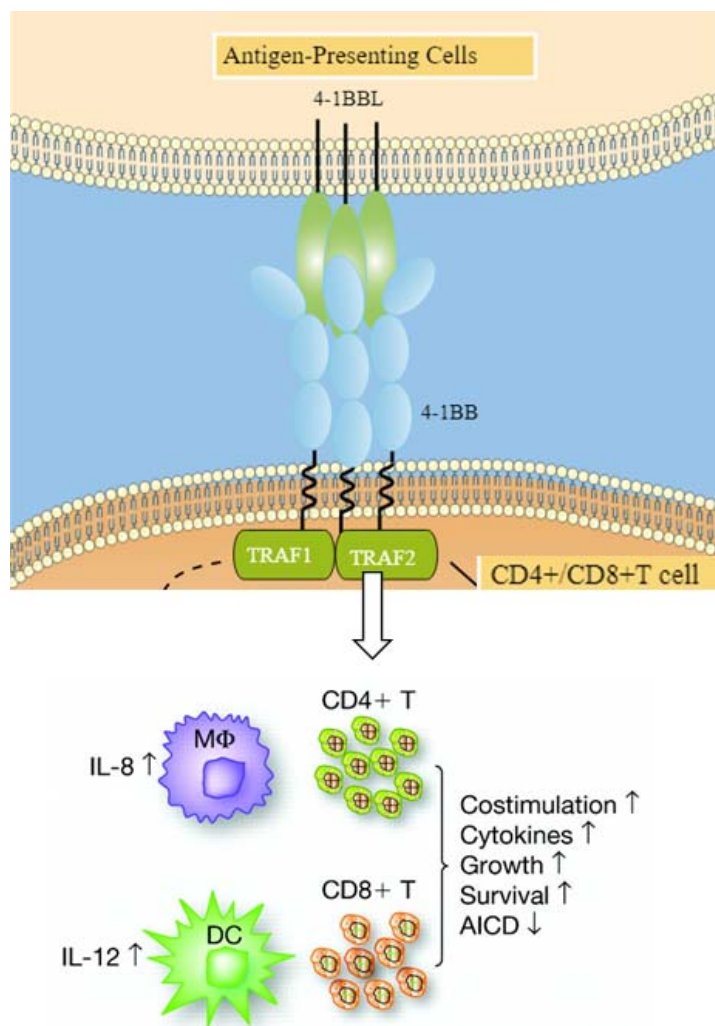
Enquanto a função e o mecanismo de ação do OX40 estão mais bem compreendidos, as ações de outra molécula coestimuladora, a 4-1BB é mais complexa e ainda com várias lacunas a serem respondidas. O 4-1BB (CD137) é uma proteína transmembrana membro da superfamília do TNFR, com 50 a 55-kDa, descoberta originalmente nas células T, mas pode estar expressa em uma variedade de células do sistema imune como as células dendríticas ativadas (DCs), monócitos, neutrófilos, células B e células natural killer (NK), promovendo uma função efetora na ativação de todas estas células. Diferente das moléculas OX40, o 4-1BB

promove um estímulo mais potente de coestimulação de células TCD8<sup>+</sup> e menos potente nas células TCD4<sup>+</sup> (Cheuk et al. 2004; Vinay e Kwon 2011; Campana et al. 2014).

*In vitro*, os efeitos do 4-1BB são bastante diversos e incluem progressão do ciclo celular em linfócitos, indução de produção de citocinas, prevenção da ativação dos mecanismos de morte celular e indução de genes antiapoptóticos (Vinay e Kwon 2011). Alguns autores mostraram que a expressão de 4-1BBL pelos monócitos é induzida por IL-1 $\beta$ , lipopolissacarídeos e phorbol myristate acetato (Schwarz et al. 2005). A ativação dos monócitos pelo anti-4-1BB aumentou a produção de IL-8 e TNF $\alpha$ , porém causou a redução dos níveis de IL-10. Outro achado interessante, foi que a ligação de 4-1BB com o 4-1BBL expresso nos monócitos levou a redução dos níveis de linfócitos B (Kienzle e Von Kempis 2000) (Figura 8).

Os linfócitos B tem um papel fundamental na regulação imune, pois além de secretarem as imunoglobulinas e anticorpos específicos são importantes na otimização da resposta dos linfócitos T. Os anticorpos produzidos pelas células B neutralizam os efeitos dos vírus, entretanto podem contribuir para a gravidade de doenças autoimunes, como lúpus e artrite reumatoide (Vinay e Kwon 2011). Foi demonstrado por Zhang et al. (2010b) que o 4-1BB estava expresso nos linfócitos B quando monócitos de sangue periférico eram estimulados por mitógenos, mas não quando linfócitos B purificados eram usados .

A expressão de 4-1BB também regula a ligação CD40/Anti-Ig quando em combinação com Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), mas não quando se utiliza IL-2, IL-6, IL-15 e TNF- $\alpha$ . Diante da adição de IL-4, IL-10 ou IL-21 às células B expostas ao anti-CD40/anti-Ig observa-se a redução da expressão dos níveis de 4-1BB (Vinay e Kwon 2011). A expressão de 4-1BB foi documentada em células Natural Killer (NK) ativadas, mas não em células em latência. Apesar da ativação do 4-1BB, com seu agonista, não ter demonstrado qualquer influência na função citolítica das células NK sobre as células tumorais, *in vivo*, o tratamento com anti-4-1BB provocou destruição e morte das células NK, presumidamente via aumento de produção de IFN- $\gamma$  (Vinay e Kwon 2011).



Fonte - Adaptado de Vinay e Kwon (2012)

**Figura 8** – Mecanismos envolvidos na interação do 4-1BB e seu ligante (4-1BBL).

Estudos em modelo animal deficiente de 4-1BB, tiveram redução do número de células NK, demonstrando a importância do 4-1BB na regulação das células NK, muito embora ainda não elucidado através de qual o mecanismo de ação (Vinay e Kwon 2011). O bloqueio do ligante do 4-1BB, o 4-1BBL, não mostrou uma importante modificação do fenótipo destes animais, no que se refere à autoimunidade (So et al. 2008).

As terapias agonistas 4-1BB promove respostas mais potentes e estimulam a proliferação das células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> e o aumento da produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e de granzimas. As células T CD4<sup>+</sup> também podem ser estimuladas a expandir e produzir citocinas pró-inflamatórias. O papel da estimulação 4-1BB nas células Treg, no entanto, é controverso, pois a terapia com agonista 4-1BB pode inibir a diferenciação de células efectoras convencionais em Treg, ao mesmo tempo em que inibe a supressão de Treg, ou, por outro lado, manter a expansão do Treg e sua capacidade de imunossupressão (Bartkowiak e Curran 2015).



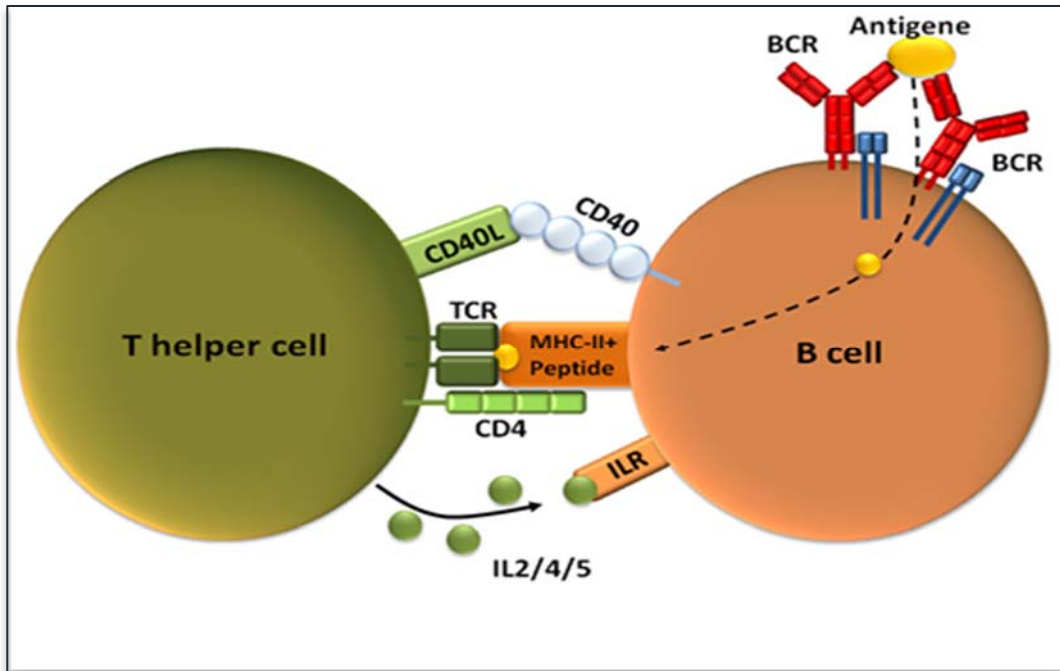
### 1.2.3 Proteína CD40 e seu ligante CD40L

O CD40 e seu ligante (CD40L) fazem parte da superfamília do TNF. O CD40 é uma proteína do tipo I, constitutivamente expressa na superfície das células B, na membrana das células apresentadoras de antígenos (APC), nas células epiteliais, células musculares lisas, plaquetas e células progenitoras hematopoiéticas, além de serem expressas em alguns tumores, tais como: mama, ovários, fígado, melanoma, linfomas e também no MM (Korniluk et al. 2014). A molécula de CD40 não é expressa em plasmócitos maduros normais, mas somente nas células plasmocitárias anormais do MM (Huang et al. 2015; Kamińska et al. 2016).

A ativação do CD40 resulta na regulação de moléculas coestimuladoras (como CD80 e CD86) e no complexo receptor de histocompatibilidade maior, bem como na liberação de citocinas inflamatórias (Ara et al. 2018). O CD40L, também chamado de CD154 é uma glicoproteína de membrana, do tipo II, com 39 kDa, expressa predominantemente nas células TCD4<sup>+</sup> ativadas e plaquetas, sendo que mais de 95% do CD40L circulante é secretado pelos grânulos  $\alpha$  após ativação plaquetária (Fanslow et al. 1994; Ara et al. 2018).

Há evidências de que os sinais dados pela ligação do CD40L são essenciais para o processo de maturação e *switching* da classe de imunoglobulina após a estimulação antigênica, via células apresentadoras de antígenos e esse conhecimento veio através de pacientes com a Síndrome do Hiper-IgM ligado ao X. Nessa síndrome, as células T não expressam CD40L funcional e os indivíduos tendem a ter infecções bacterianas de repetição desde muito cedo, por déficit na imunidade humoral e não expressarem níveis adequados das imunoglobulinas de outras classes que não a IgM (Fanslow et al. 1994). A ligação entre CD40 e CD40L induz proliferação e diferenciação em células B de memória e troca de classe de imunoglobulina (Figura 9).

As interações CD40-CD40L são importantes na indução do aumento de moléculas de apresentação dos antígenos e da produção de citocinas, tais como IL-10 e IL-12, por macrófagos, com subsequente aumento de ativação das células T e respostas antitumorais (Banchereau et al. 1994; Huang et al. 2015).



Fonte - Adaptado de Lederman et al. (1992)

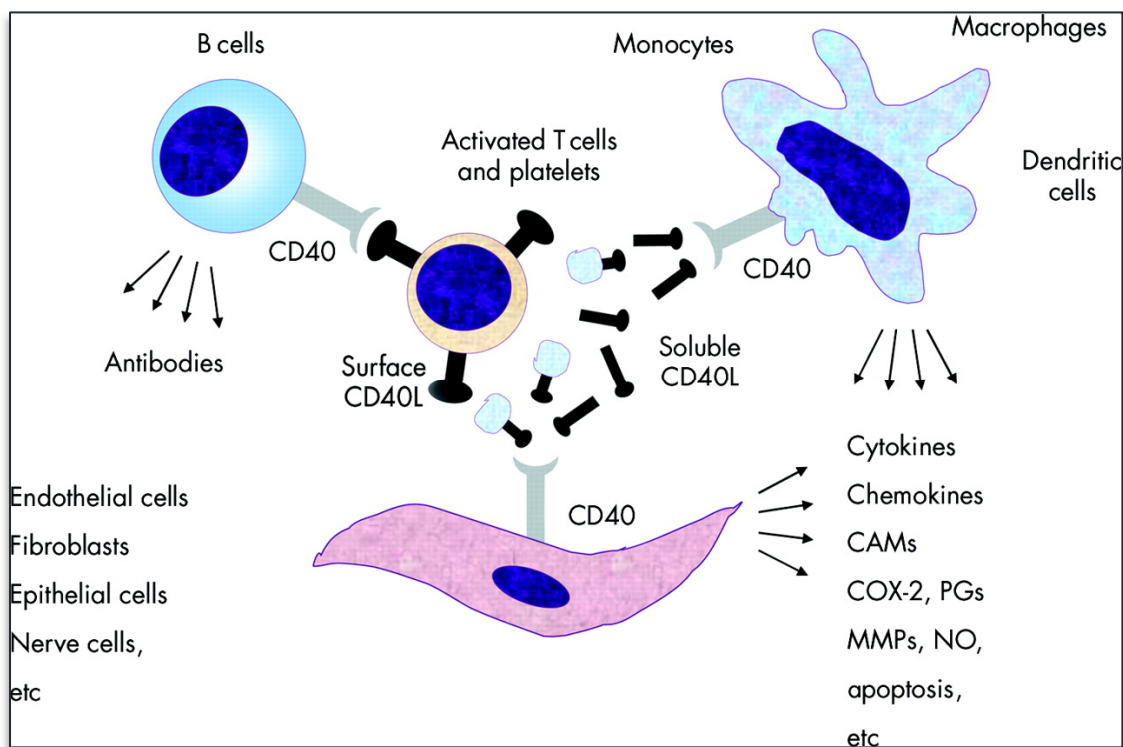
**Figura 9** - Interação entre a molécula CD40 expressa nos linfócitos B com o seu ligante (CD40L) na superfície dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> efetor (T helper – Th).

Foi demonstrado, entretanto, que em modelos animais o CD40 é essencial não só para a imunossupressão mediada pelas células supressoras mielóides (do inglês *myeloid-derived suppressor cells* - MDSC), mas também para a expansão de células Treg. O bloqueio da interação CD40-CD40L por anticorpo anti-CD40 inibiu o desenvolvimento de Treg e reforçou a eficácia do sistema imunomodulador em modelos tumorais (Bergmann e Pandolfi 2006; Pan et al. 2010).

Além da participação na regulação imunológica, evidências sugerem que a ligação do CD40 ao seu ligante, pode induzir de forma direta a apoptose de células tumorais e como também induzir o crescimento tumoral, uma vez que células tumorais podem expressar o CD40. Esse efeito paradoxal depende do nível da sinalização via CD40L: maior sinalização induz a morte das células tumorais, enquanto menor sinalização promove o crescimento tumoral. O papel indireto na promoção do crescimento tumoral é resultado da angiogênese, que é mediada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e outras quimiocinas. Em modelos animais, viu-se que o CD40-CD40L promoveu angiogênese por induzir a produção de VEGF a partir de células endoteliais e da ativação de plaquetas (Huanget al. 2015).

O CD40L solúvel (sCD40L) é um trímero funcional de 18 kDa, que é liberado pelos linfócitos T ativados e plaquetas. A função fisiopatológica do sCD40L tem sido investigada nas doenças cardiovasculares e certas doenças autoimunes. Pacientes com angina instável têm níveis plasmáticos elevados de sCD40L, e o aumento de nível sérico tem sido considerado um importante fator na estratificação de risco nas doenças cardiovasculares (Figura 10) (Danese et al. 2004).

Nos tumores, a investigação centrou-se no papel do sCD40L ligado a membrana em relação às respostas antitumorais. Percebeu-se que as células mononucleares do sangue periférico (do inglês *peripheral blood mononuclear cell* - PBMCs) de pacientes com câncer tinham uma população relativamente maior de MDSCs, definidas como células CD33<sup>+</sup>HLA-DR, e essas expressavam níveis mais elevados de CD40 (Huang et al. 2015).



Fonte: Adaptado de Danese et al. (2004)

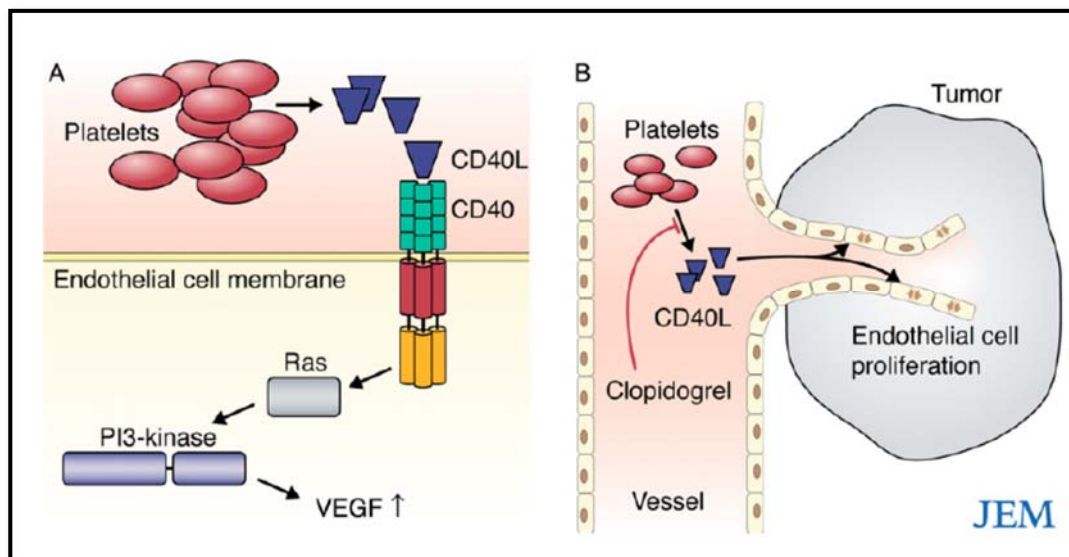
**Figura 10** - Efeitos pleiotrópicos resultantes da interação de células T CD40L<sup>+</sup> ativadas, plaquetas CD40L<sup>+</sup> ativadas ou CD40L solúvel com células imunes e não imunes.

A proliferação de células T e a produção de IFN- $\gamma$  diminuiu quando as células T estimuladas foram co-cultivadas com uma quantidade de MDSCs autóloga. A adição de MDSCs enriquecidas com sCD40L recombinante monomérico, teve um efeito inibidor na proliferação de células T. Células PBMCs cultivadas in vitro com sCD40L também mostrou

uma expansão de células T reguladoras ( $CD4^+CD25^{\text{high}}Foxp3^+$ ), bem como indução de citocinas, como IL-10 e IL-6. Adicionalmente, mensurou-se níveis maiores de células  $TCD4^+$  com expressão de PD-1 em pacientes com câncer do que em doadores saudáveis. O sCD40L também inibiu a produção de IL-12 na ativação de monócitos (Huang et al. 2015).

Em pacientes com câncer, o sCD40L é proveniente principalmente das plaquetas ativadas em proporção maior do que de células T, evidência apoiada no fato de que pacientes oncológicos têm ativação plaquetária importante, bem como ativação inadequada de células T. Sendo assim, acredita-se que o bloqueio da produção de sCD40L possa melhorar as respostas antitumorais (Huang et al. 2015).

Agentes antiagregantes, como aspirina e clopidogrel, demonstraram reduzir significativamente a produção de sCD40L em pacientes com diabetes tipo II e doença arterial coronariana estável, condições nas quais a ativação plaquetária é um fator primordial da patogênese (Azar et al. 2006; Santilli et al. 2006). Uma análise retrospectiva de 682 pacientes com câncer de próstata, mostraram benefício significativo com a combinação de drogas antiagregantes e radioterapia, interferindo com o processo de angiogênese induzido pelo tumor, dando mais suporte clínico às hipóteses aventadas, como exemplificado na Figura 11 (Bergmann e Pandolfi 2006).



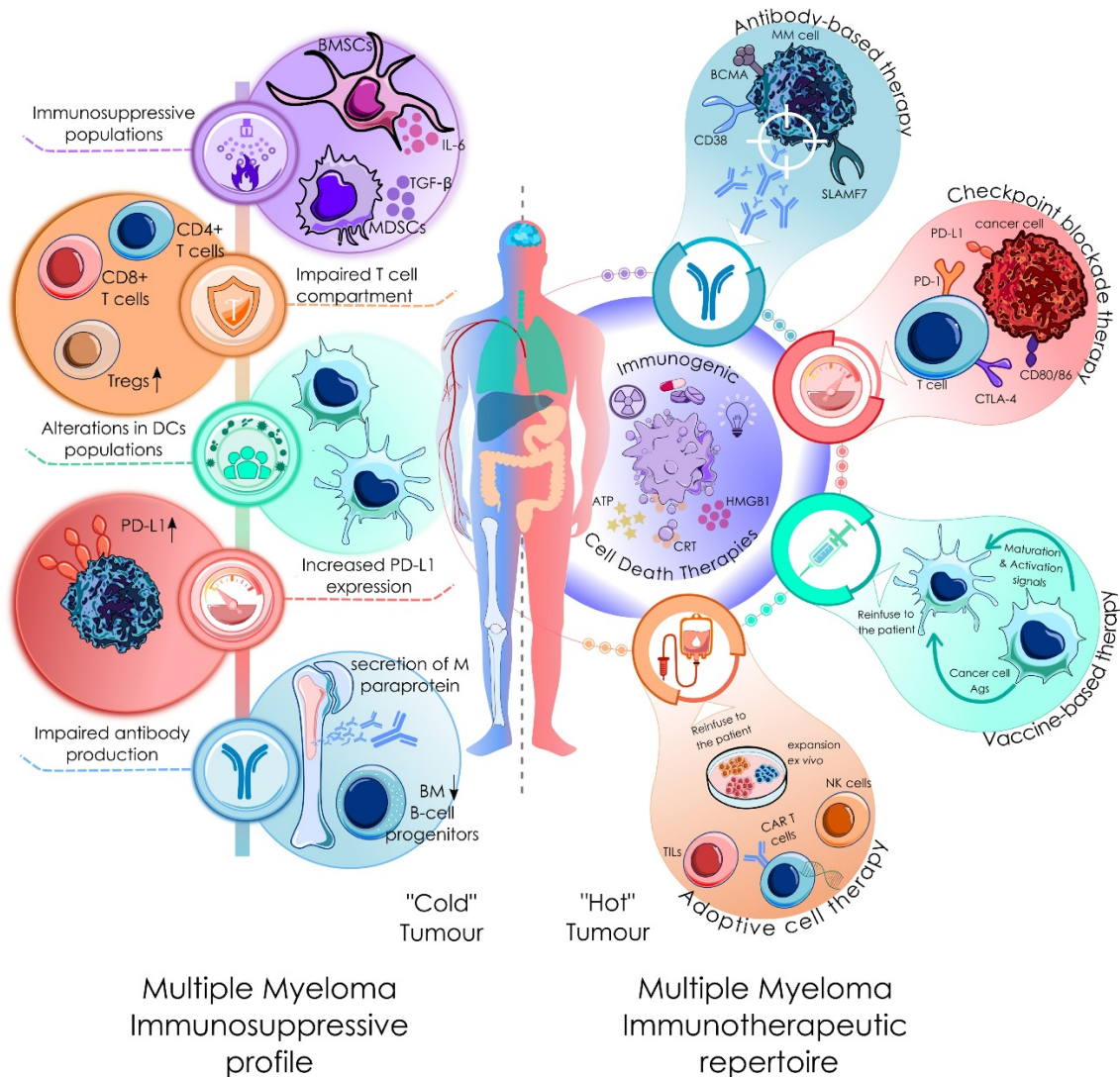
Fonte – Bergmann e Pandolfi (2006)

**Figura 11** - A sinalização via interação de CD40 e do seu ligante (CD40L) participa da angiogênese.

### 1.3 SISTEMA IMUNE NO MIELOMA MÚLTIPLO

Os pacientes com MM apresentam alterações no sistema imune (Figura 12), sendo as principais: i) déficit na produção de imunoglobulina devido à redução dos progenitores de células B da medula óssea; ii) alteração do perfil imunológico das células T, caracterizada pelo aumento do número de células T reguladoras (Treg), alteração da relação CD4/CD8 e do número de células T CD4<sup>+</sup>, dentre outros; iii) aumento de expressão do PD-L1, um dos ligantes de inibição da resposta imune, iv) níveis elevados de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs), que tem a capacidade de inibir atividade funcional de linfócitos T, e estão associadas a progressão da doença e um desfecho clínico desfavorável. Além disso, pacientes com MM apresentam alterações na capacidade de apresentação de antígenos, com alguns estudos que relataram níveis reduzidos de células dendríticas e macrófagos (Binsfeld et al. 2014; Rodríguez-Otero et al. 2017; Serrano-del Valle et al. 2019).

Embora muitas neoplasias linfoides, incluindo o MM, expressem HLA classe II e, portanto, serem capazes de apresentação direta de antígeno, a apresentação mediada por células apresentadoras de antígenos (APC), continua sendo o mecanismo dominante e pode ser potencializado utilizando-se de anticorpos monoclonais contra alvos tumorais específicos, desta forma, o status funcional das APCs torna-se crítico. As células dendríticas (DCs) isoladas de pacientes com MM apresentam defeitos funcionais e expressam/produzem níveis mais baixos de moléculas cruciais para a iniciação da resposta imune incluindo interleucina 12 (IL-12), HLA-DR, CD40, CD86 e CD80. Este fenótipo é provavelmente devido à exposição a citocinas produzidas pelas células tumorais e seu microambiente circundante, incluindo Fator de Crescimento Transformador Beta, do inglês, *Transforming Growth factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ), IL-6 e IL-10 (Rutella e Locatelli 2012).



Fonte – Adaptado de Serrano-del Valle et al. (2019).

**Figura 12** – Alterações descritas no sistema imune dos pacientes com MM e possíveis abordagens terapêuticas.

No MM, as células Treg têm múltiplos mecanismos de imunossupressão, incluindo a produção das citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGFβ, e depleção de IL-2 da medula óssea e vários grupos correlacionaram a quantidade de células Treg em MM (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>) com estágio da doença e resposta ao tratamento (brimnes et al. 2010; Rutella e Locatelli 2012). Pacientes com MM que atingem remissão e sobrevida longa (ou seja, SLP por mais de 10 anos) apresentaram elevado número de células efectoras (células T, células NK, CDs, plasmócitos normais) e reduzido de Treg, enfatizando a importância de um sistema imunológico ativo para controlar a evolução e progressão da doença (Rodríguez-Otero et al. 2017).

Dessa forma, o entendimento de que as moléculas coestimuladoras são necessárias e indispensáveis a uma resposta imune adequada, trabalhando em sinergia e levando à

amplificação da função das células T efectoras, justifica-se avaliar a expressão destas moléculas (OX40, 4-1BB e CD40) e de seus ligantes, as interações entre as diversas células do sistema imune e como se comportam nos pacientes com mieloma múltiplo. Uma melhor compreensão de como essas moléculas coestimuladoras se apresentam no mieloma múltiplo, podem influenciar e ter impactos nas futuras aplicações clínicas e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

Estudos clínicos utilizando-se de agonistas para essas proteínas, já estão em curso, mas o perfil genético da população Brasileira, particularmente nos estados do Nordeste, nos quais a miscigenação entre as raças negra, branca e indígena é muito comum, pode influenciar a resposta a essas novas terapias. Este é o primeiro estudo em Pernambuco a avaliar o perfil destas proteínas em pacientes com neoplasia hematológica, podendo contribuir como base para estudos intervencionistas que em breve, espera-se, estejam disponíveis em nosso meio.



# OBJETIVOS

---



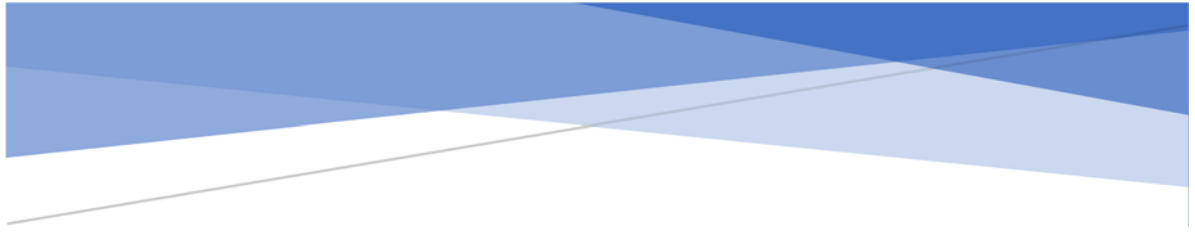
## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os níveis de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras OX40, CD40, CD40L e 4-1BB no sangue periférico e medula óssea dos pacientes com mieloma múltiplo.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar os níveis de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras no sangue periférico dos pacientes e controles;
- Determinar os níveis solúveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L no sangue periférico dos pacientes e controles;
- Verificar se as concentrações séricas de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras OX40, CD40, CD40L no sangue periférico dos pacientes podem ser possíveis marcadores prognósticos e preditivos de morte;
- Associar o perfil de expressão linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras em sangue periférico com a sobrevida em 40 meses;
- Associar os níveis percentuais de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras em sangue periférico com o escore prognóstico ISS e óbito nos pacientes;
- Associar os níveis percentuais de linfócitos B e T e das moléculas coestimuladoras na medula óssea com o escore prognóstico ISS e óbito nos pacientes;
- Correlacionar os níveis de expressão CD20+, CD3+, OX40+, CD40+, CD40L+ entre sangue periférico e medula óssea nos pacientes.



# MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 DETALHAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo realizado no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP e no A.C.Camargo Cancer Center. O período da coleta dos dados clínicos e das amostras biológicas foi de maio de 2016 a dezembro de 2019.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) sob nº. CAAE 51156615.0.0000.5205 (ANEXO 4), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. Todos os participantes foram incluídos no estudo após assinatura do Termo de Consentimento livre esclarecido (TCLE - Apêndice 2).

#### 3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

**Pacientes:** foram incluídos 40 pacientes com Mieloma Múltiplo, com idade até 79 anos, estágio clínico de Durie-Salmon – III A ou B.

**Controles:** os indivíduos controles foram homens e mulheres saudáveis com idade entre 40 a 79 anos, sem diagnóstico prévio ou atual de doenças oncológicas, sem sinais clínicos de infecções aguda.

#### 3.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Para inclusão no estudo, os pacientes receberam informações sobre o projeto e foram incluídos no trabalho após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram incluídos de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

##### 3.3.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com gamopatia monoclonal em investigação de mieloma múltiplo;
- Pacientes com biópsias prévias de áreas medulares ou extramedulares que foram sugestivos ou compatíveis com mieloma múltiplo ou plasmocitoma extramedular;
- Pacientes virgens de tratamento, excetuando-se uso de corticoide em doses de até 1 mg/kg/dia de prednisona ou até 10 mg/dia de dexametasona por até 10 dias.

### 3.3.2 Critérios de exclusão

- Uso de imunossupressores ou com infecção ativa;
- Idade igual ou superior a 80 anos;
- Não permitir as coletas de amostras de sangue ou medula óssea para as análises sorológicas ou material inadequado para análise;
- Insucesso na coleta de material medular (aspirado medular seco) ou insucesso na coleta de fragmento ósseo na biópsia de medula óssea (se um dos dois materiais forem coletados, serão incluídos no estudo);

## 3.4 PROCEDIMENTOS PARA CAPTAÇÃO E ACOMPANHAMENTO DOS PARTICIPANTES

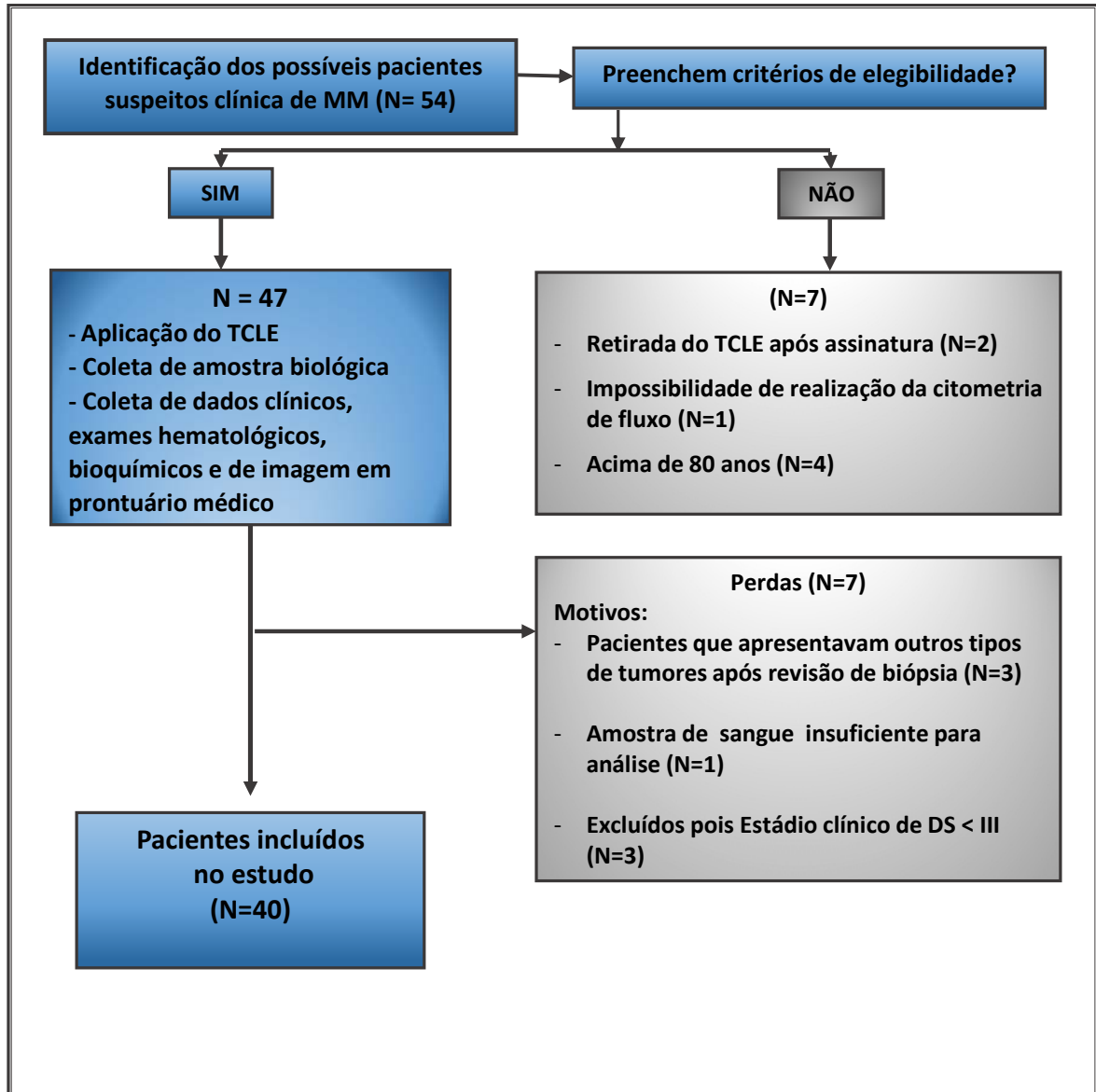
Os pacientes foram selecionados no ambulatório de hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, sendo incluídos após o consentimento em participar do estudo e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 2).

O grupo controle foi coletado, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 3), sendo constituído de acompanhantes dos pacientes e funcionários do IMIP, que concordaram em participar da pesquisa e após avaliação clínica para selecionar os participantes elegíveis, seguindo os critérios de inclusão para os controles com idade de 40 a 79 anos que foram: ausência de uso prolongado de imunossupressores, ausência de história clínica de infecção pelo vírus da imunodeficiência humana 1 e 2 (HIV 1 e 2), e vírus linfotrópico humano 1 e 2 (HTLV 1 e 2); ausência de sinais clínicos de infecção; ausência de história clínica de hepatites virais e de doença autoimune; e ausência de história prévia de qualquer doença crônica, dentre elas antecedente pessoal de qualquer tipo de tumor.

Os dados clínicos como desfecho e taxa de resposta foram coletados no momento do diagnóstico e ao longo do tempo do estudo. Amostras biológicas dos pacientes foram coletadas apenas ao diagnóstico. Os critérios utilizados para categorizar o grau de resposta foram baseados nos critérios do *International Myeloma Working Group* (IMWG) – (Anexo 2). Os dados clínicos e de tratamento foram recuperados dos prontuários.

No período de maio de 2016 a janeiro de 2019 foram identificados 54 pacientes, e desses, foram incluídos 47 pacientes com diagnóstico confirmado e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Houve 4 perdas dos 47 pacientes incluídos, após a revisão do diagnóstico, 03 pacientes apresentaram tumores não hematológicos e 01 paciente por falta

de amostra suficiente para realização dos testes laboratoriais. Optou-se pela análise apenas dos casos com estágio clínico de Durie-Salmon III, para melhor uniformidade dos casos. Detalhes no fluxograma a seguir (Figura 13).



**Legenda** - TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido; PPP- Plasma pobre em plaquetas

**Figura 13** -Fluxograma de capturação dos pacientes acompanhados no ambulatório de onco-hematologia do Hospital de Câncer de Pernambuco, com suspeita clínica de mieloma múltiplo.

## 3.5 TÉCNICAS DE COLETA, PROCESSAMENTO E TESTES LABORATORIAIS

### 3.5.1 Coleta e preparação de amostras biológicas

Nos pacientes com suspeita de mieloma múltiplo, foram coletados 8 mL de sangue periférico e 4 mL de aspirado medular, em tubo com anticoagulante ácido etilenodiamino tetraacético - EDTA (BD Vacutainer®) para realização de citometria de fluxo e ELISA.

As amostras de aspirado medular foram coletadas por médico hematologista, utilizando-se agulhas do tipo Illinois. Os sítios de coleta foram esternal ou em cristas ilíacas anteriores ou posteriores de acordo com a preferência do médico ou situação clínica do paciente.

A biópsia de medula óssea foi realizada através da técnica por punção com agulha modelo Jamshidi, em umas das cristas ilíacas posteriores, com expectativa de fragmento ósseo de pelo menos 2,0 cm, como preconizado pela literatura (Lee et al. 2008) mas devido a fragilidade óssea nestes pacientes evitou-se múltiplas tentativas de coleta, aceitando-se fragmentos menores que os acima descritos. Os fragmentos de medula óssea eram fixados em formol tamponado e enviados ao serviço de patologia local.

### 3.5.2 Testes laboratoriais e de imagens

Os testes laboratoriais utilizados para o estadiamento e diagnóstico de mieloma múltiplo faziam parte da rotina do serviço de onco-hematologia do HCP e foram registrados no formulário de coleta de dados da pesquisa (APÊNDICE A), baseando-se nos registros de prontuários dos pacientes ou através de busca no sistema eletrônico do laboratório de análises clínicas do HCP (laboratório CIAC - <http://laboratoriociac.com.br/>).

Os valores de referência do laboratório estão detalhados no ANEXO 3. Os valores de cálcio utilizados na análise foram corrigidos de acordo com o nível de albumina sérica, conforme a fórmula: [Cálcio corrigido = Cálcio total +  $[0,8 \times (4 - \text{albumina})]$ ] (Tessier e Rose 1958).

Como exames de imagem para *screening* de lesões osteolíticas de mieloma múltiplo aceitou-se radiografias, tomografias, ressonâncias ou PET-CT de acordo com o que havia sido solicitado pela equipe e disponível para consulta (Registrados no APÊNDICE A), assim como a informação ou não de realização de Ecocardiograma, para avaliar possibilidade de amiloidose associada ou informação sobre a necessidade ou não de terapia dialítica de substituição.

### 3.5.3 Determinação da concentração solúveis de sCD40L, sOX40 e s4-1BB

Os testes foram realizados no Laboratório de Pesquisa Translacional do IMIP. Um volume de 3 mL de sangue total coletado com anticoagulante EDTA, foi centrifugado a 1800 RPM, por 5 minutos a uma temperatura de 4° C para obtenção do plasma rico em plaquetas. Posteriormente, o plasma foi separado em alíquotas de 1 mL e centrifugado a 14000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Foram feitas alíquotas de 500 µL e congeladas em freezer a – 80°C, até a realização dos testes laboratoriais.

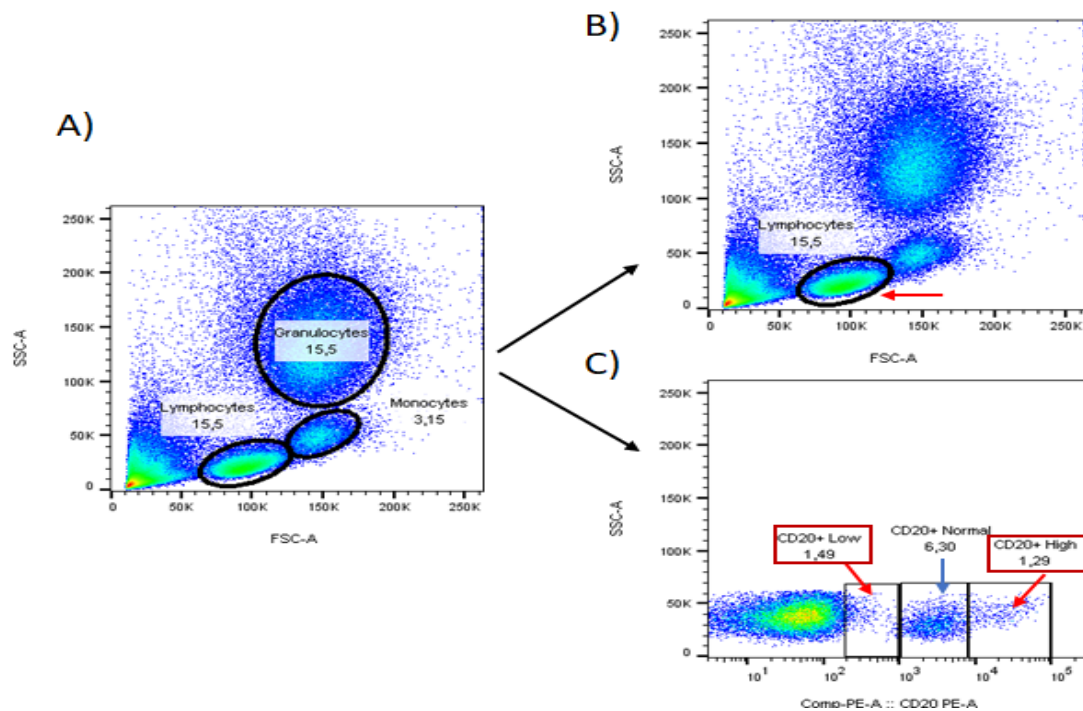
Um volume total de 100 uL foram utilizados para a determinação das concentrações sérica de sCD40L, s4-1BB, sOX40, por *enzyme immunosorbent assay* (ELISA) utilizando os kits Human sCD40L, s4-1BB, sCD134/OX40 Platinum ELISA (eBioscience, Vienna, Austria), seguindo as instruções do fabricante. Para a leitura da absorbância foi utilizado a leitora de placas Human Reader HS (Human, Wiesbaden, Germany). A leitura das absorbâncias foi realizada em um comprimento de onda de 450 nm. As concentrações foram expressas em pg/mL.

### 3.5.4 Determinação da expressão de linfócitos T e B e da expressão de OX40, CD40 e CD40L na superfície celular dos leucócitos e linfócitos

A alíquota de 50 µL de sangue periférico foi adicionada em tubo de poliestireno de citometria com 2 uL de soro humano AB+, e 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS® Lysing Buffer, Becton Dickinson, Mountain View, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas 2 lavagens consecutivas, adicionando 2 mL de phosphate buffered saline (PBS) 1x concentrado (pH 7,4) e centrifugando a 300 x g por 5 min a 22°C. Após a segunda lavagem, foi descartado o sobrenadante e as células foram marcadas com 5 µL de anticorpos monoclonais (BD Biosciences, CA) anti-CD3 (células T), anti-CD134 (OX40), anti-CD40L, anti-CD40 e anti-CD20 (células B), conjugados a fluorocromos diferentes, incubando-se à temperatura ambiente e protegido da luz por 20 minutos. Após a incubação, foi realizada uma última etapa de lavagem, em seguida foi realizada a aquisição no citômetro de fluxo FACSVerse (BD Biosciences, CA) (Figura 14). Foram adquiridos no mínimo 20.000 eventos celulares na região dos linfócitos. Os dados obtidos analisados com o programa BD FACSuite™ (BD Biosciences, CA) e os resultados percentuais foram comparados entre os pacientes e controles saudáveis. Os dados de citometria foram expressos em valores percentuais e os resultados apresentados pelos pacientes foram comparados aos dos controles saudáveis.

Numa alíquota de 50  $\mu$ L de medula óssea foi adicionado 2 mL de tampão de lise de hemácias (FACS<sup>®</sup> Lysing Buffer, Becton Dickinson, CA) e incubado por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, realizava-se a lavagem com 2 mL de PBS e posteriormente adicionava-se 5 $\mu$ L dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD20, anti-CD40, anti-CD40L, anti-CD134 (OX40), incubando-se à temperatura ambiente e protegido da luz por 20 minutos. Foi realizada duas etapas de lavagem e posteriormente a aquisição em citômetro de fluxo (FACSVerse, BD, Pharmingen<sup>®</sup>, San Diego, CA). Foram adquiridos entre 30.000-50.0000 eventos celulares em linfócitos e a análise dos resultados efetuado no *FACSuite* (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA) e expressas em valores percentuais.

As subpopulações celulares foram avaliadas de acordo com cada marcador de interesse em população geral, ou subpopulação de linfócitos. A Figura 14 mostra como foram realizadas a análises de populações CD20<sup>low</sup>, linfócitos CD20<sup>normal</sup> e CD20<sup>high</sup>. As células CD20 low são células B que expressam baixos números de moléculas CD20 na membrana e as células CD20 high, elevados números de moléculas na membrana. Essa separação é realizada através da intensidade de fluorescência do marcador CD20.



**Figura 14** - Exemplos dos painéis de citometria de fluxo de sangue periférico, delimitando os percentuais de expressão. A) linfócitos totais, monócitos e granulócitos; B) após selecionou-se apenas o *gate* de linfócitos; C) foram quantificadas os percentuais de expressão de subpopulações de linfócitos B (utilizando-se o marcador CD20) e o subdividindo de acordo com o padrão de fluorescência entre CD20<sup>low</sup>, CD20<sup>normal</sup> e CD20<sup>high</sup>.



## 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 3.6.1 Análises de associação

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi apresentada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central, mediana e interquartil (IQR).

Para as variáveis quantitativas, foi inicialmente aplicado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. As variáveis quantitativas deste estudo foram apresentadas em valores de mediana e intervalo interquartil (IQR: 25%-75%). O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparação entre dois grupos.

Análise por curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) foi realizada para cálculo dos melhores valores dos marcadores estudados associados com a ocorrência de óbito, de acordo com o valor de maior acurácia obtido. Para a análise de correlação entre variáveis foram determinados conforme o coeficiente de correlação de Spearman. Será considerado os seguintes níveis de correlação: correlação fraca:  $(r) = 0,3$  a  $< 0,5$ ; correlação moderada:  $(r) \geq 0,5$  a  $0,8$  e uma forte correlação coeficiente  $(r) \geq 0,8$ .

### 3.6.2 Análise de sobrevida

A taxa de sobrevida global (SG) foi calculada em meses, a partir da data do diagnóstico. O teste de Log-Rank foi utilizado para comparação entre os grupos.

A análise dos dados foi realizada pelo software *GraphPad Prism v8.0* (GraphPad Software, San Diego, CA). Para todas as análises foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .



# RESULTADOS

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES

A idade dos pacientes variou de 43 a 79 anos, com mediana de 60 anos (51,2; 66,7). Quando estratificados em faixa etária, 45% dos pacientes eram idosos (maiores de 60 anos), 32,5% tinham entre 51 e 60 anos e 22,5% menos de 50 anos. A maioria dos pacientes eram do sexo masculino 23 (57,5%), e quanto à cor da pele 26 pacientes (65%) se auto declararam pardos.

A mediana de tempo de sintomas até a definição diagnóstica foi de 6 meses (4;12). Os pacientes foram seguidos por até 45 meses, com mediana de seguimento de 17,5 meses (6,5;32,7). Dos 40 casos 10 casos (25%) evoluíram para óbito e 30 sobreviveram (75%), alguns não chegaram a iniciar terapia específica para o MM, devido a condições de desempenho comprometidas. A mediana de seguimento destes 10 casos que evoluíram para óbito foi de 6 meses (3,7;8,7).

Segundo os critérios de estadiamento de Durie-Salmon (DS), foram 30 casos com DS IIIA (75%) e 10 pacientes estágio IIIB (25%). Segundo o escore *International Staging System-ISS*, onze (11) casos apresentaram-se com ISS-1 (29,7%), 8 de ISS-2 (21,6%), e 18 de ISS-3 (48,6%), conforme mostra na Tabela 5.

**Tabela 5** - Descrição das frequências das características biológicas, desfecho clínico e distribuição dos casos conforme DS e ISS dos pacientes com mieloma múltiplo.

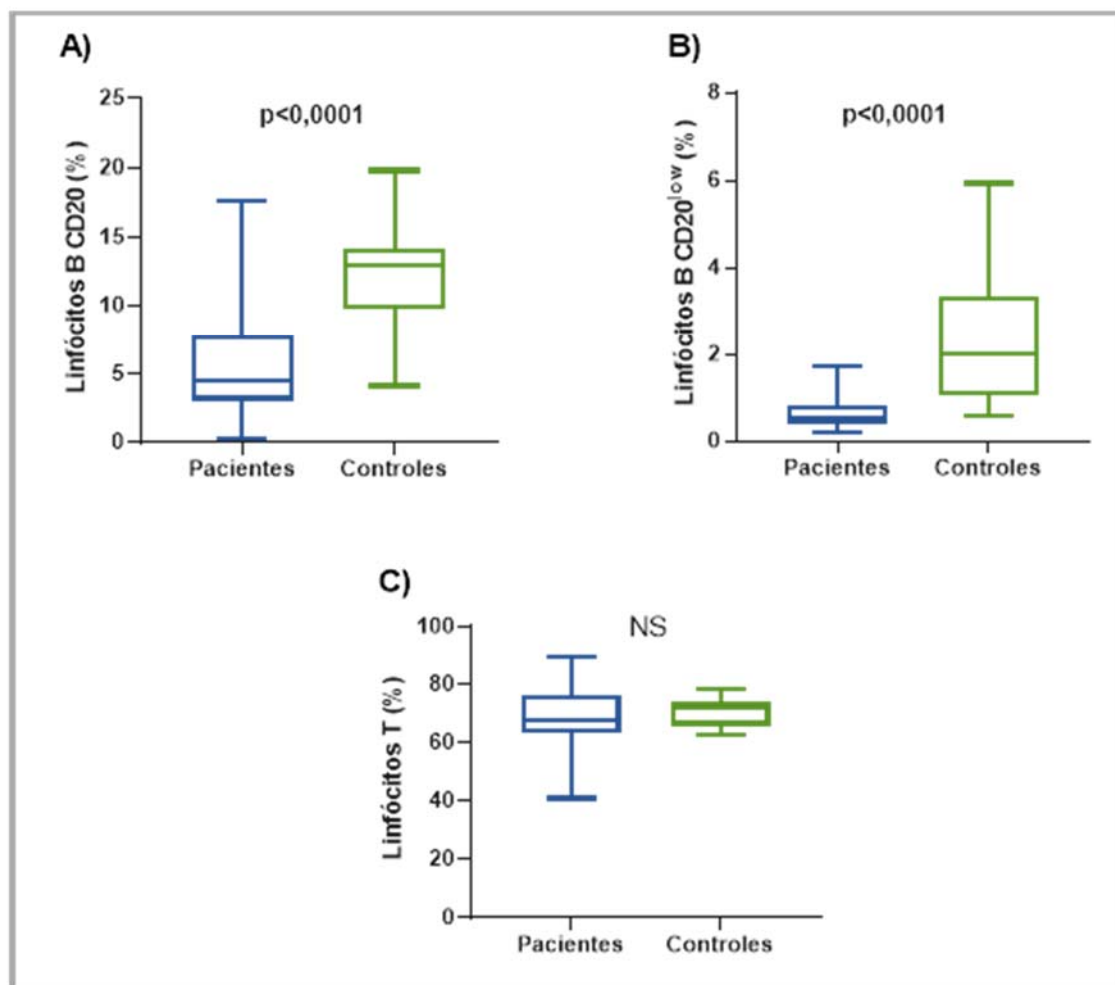
CARACTERÍSTICAS	N = 40 (100%)
<b>Idade (em anos) <sup>a</sup></b>	60 (51,2; 66,7)
<b>Tempo de Seguimento (em meses) <sup>a</sup></b>	17,5 (6,5;32,7)
<b>Faixa etária (anos)</b>	
≤ 50	9 (22,5%)
> 50 e ≤ 60	13 (32,5%)
> 60	18 (45%)
<b>Sexo</b>	
Masculino	23 (57,5%)
Feminino	17 (42,5%)
<b>Cor</b>	
Branca	5 (12,5%)
Parda	26 (65%)
Negra	9 (22,5%)
<b>Óbito</b>	
Sim	10 (25%)
Não	30 (75%)
<b>Classificação Durie-Salmon (DS)</b>	
IIIA	30 (75%)
IIIB	10 (25%)
<b>International Staging System (ISS) (n=37)</b>	
ISS -1	11 (29,6%)
ISS - 2	8 (21,6%)
ISS I- 3	18 (48,7%)

<sup>a</sup> Mediana (P<sub>25</sub>; P<sub>75</sub>); Legenda: DS: Durie- Salmon; ISS: *International Staging System*

## 4.2 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LINFÓCITOS T, B (CD20+) NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES E CONTROLES

- **Linfócitos B (CD20) e linfócitos T (CD3)**

Os valores percentuais de linfócitos B mensurados por citometria de fluxo em sangue periférico, foram analisados segundo dois parâmetros de expressão de moléculas de superfície, CD20 e CD20<sup>low</sup>, e para ambos, nota-se uma redução significativa dos níveis de linfócitos B nos pacientes com MM com relação aos controles saudáveis ( $p < 0,0001$ ; Figura 15).



**Figura 15** - Valores percentuais de linfócitos B CD20<sup>+</sup> e CD20<sup>low</sup> e de linfócitos T em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo (n=40) e de controles saudáveis. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney, foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

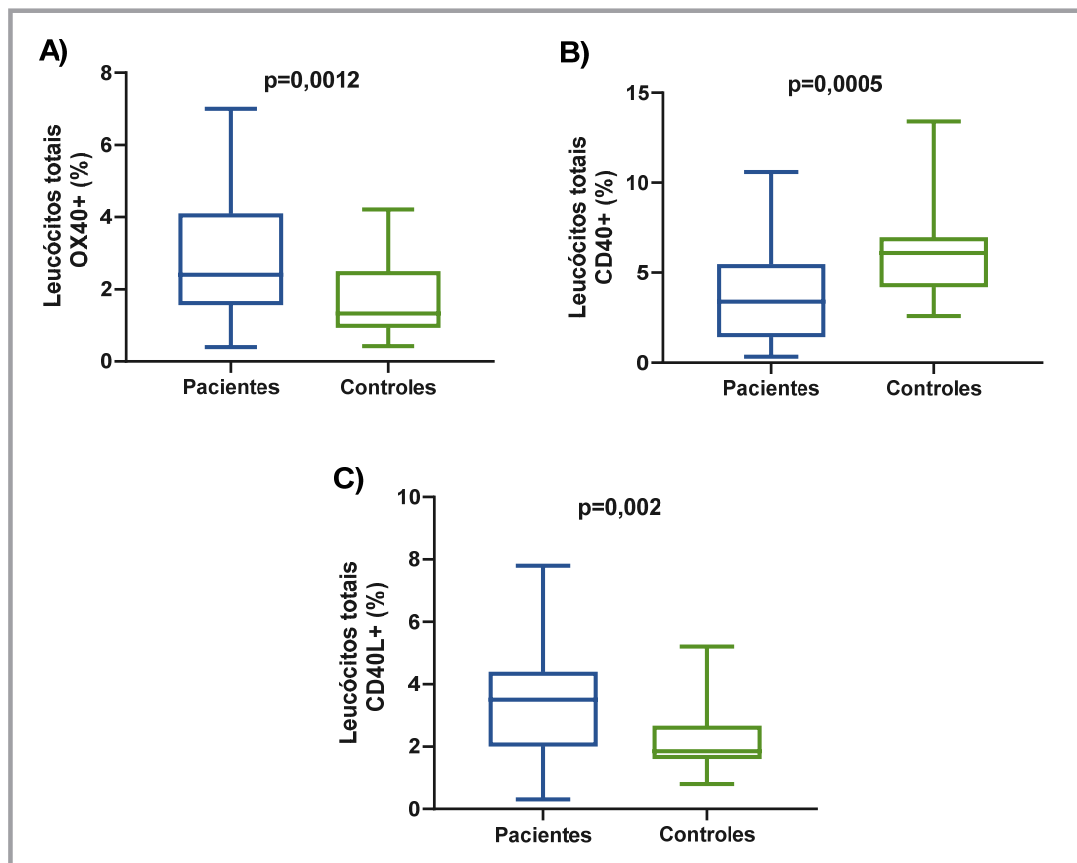
#### 4.3 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD40L NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES E CONTROLES

- **Leucócitos totais com expressão de OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup>**

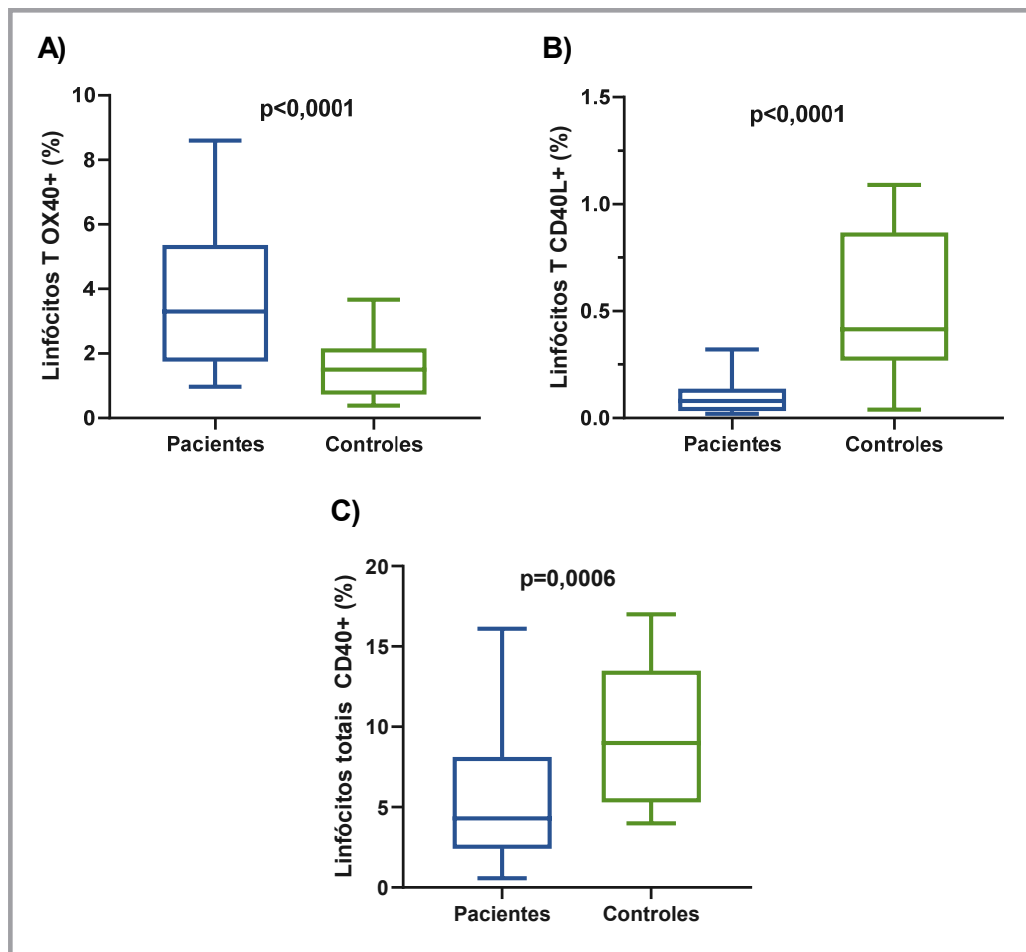
Comparativamente aos controles, os pacientes de MM apresentavam níveis elevados de leucócitos OX40<sup>+</sup> ( $p=0,0012$ ) e CD40L<sup>+</sup> ( $p=0,002$ ) e níveis reduzidos de CD40<sup>+</sup> ( $p=0,0005$ ), como demonstrado na Figura 16.

- **Níveis de linfócitos T com expressão de OX40+, CD40+ CD40L+**

Comparativamente aos controles, os pacientes de MM apresentavam níveis elevados de linfócitos T OX40<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ) e reduzidos de T CD40L<sup>+</sup> ( $p < 0,001$ ), e de linfócitos totais CD40<sup>+</sup> ( $p < 0,0006$ ), como demonstrado na Figura 17.



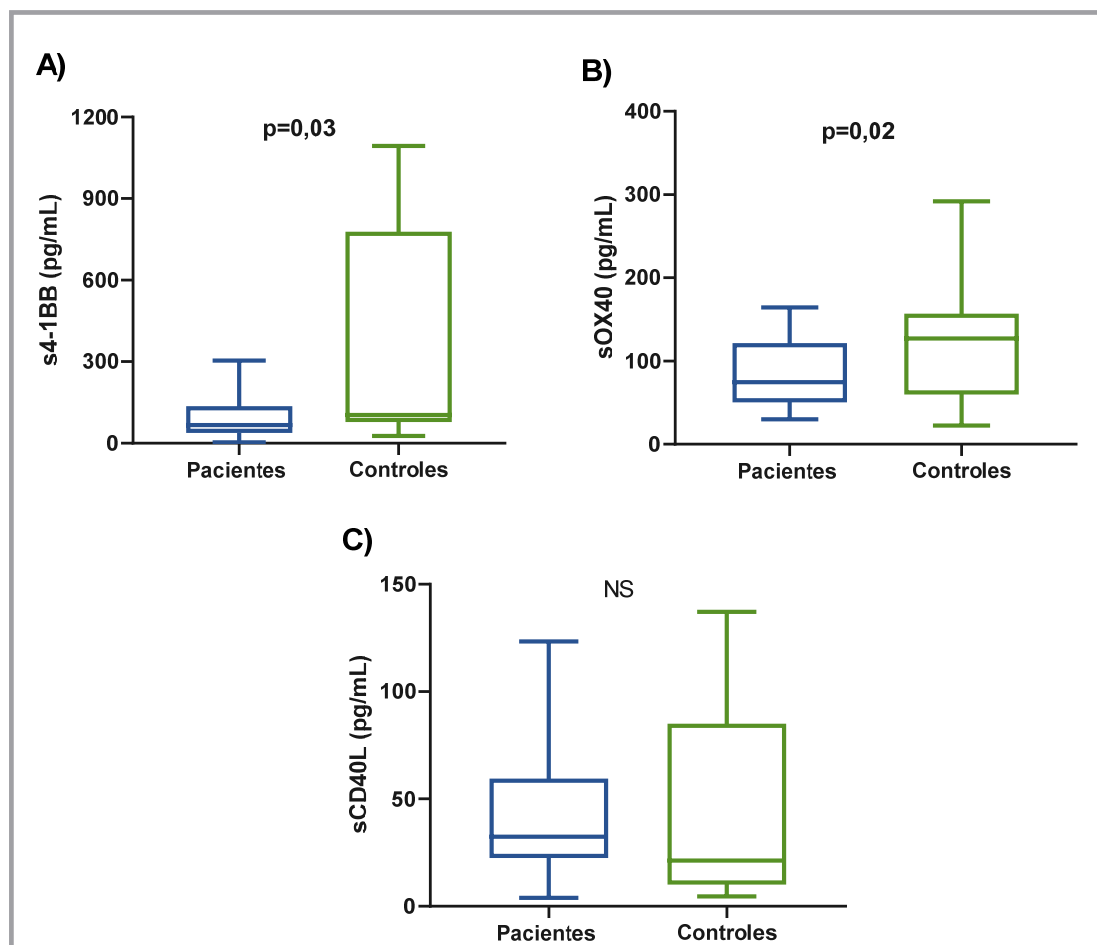
**Figura 16** - Valores percentuais de leucócitos totais OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD40L<sup>+</sup> em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo (n=40) e de controles saudáveis. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney, foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



**Figura 17** - Valores percentuais de A) OX40<sup>+</sup> e B) CD40L<sup>+</sup> em subpopulação de linfócitos T; C) CD40<sup>+</sup> em linfócitos, no **sangue periférico** de pacientes com mieloma múltiplo (n=40), comparativamente aos níveis de controles saudáveis. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney, foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

#### 4.4 ANÁLISE DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE s4-1BB, sOX40 e sCD40L NO SANGUE PERIFÉRICO

A mediana dos níveis séricos de s4-1BB e sOX40 foi menor nos pacientes quando comparada a dos controles ( $p < 0,03$  e  $p = 0,02$ , respectivamente). Para os níveis de sCD40L, não foi observada diferença significativa entre a mediana obtida dos pacientes e controles (Figura 18).

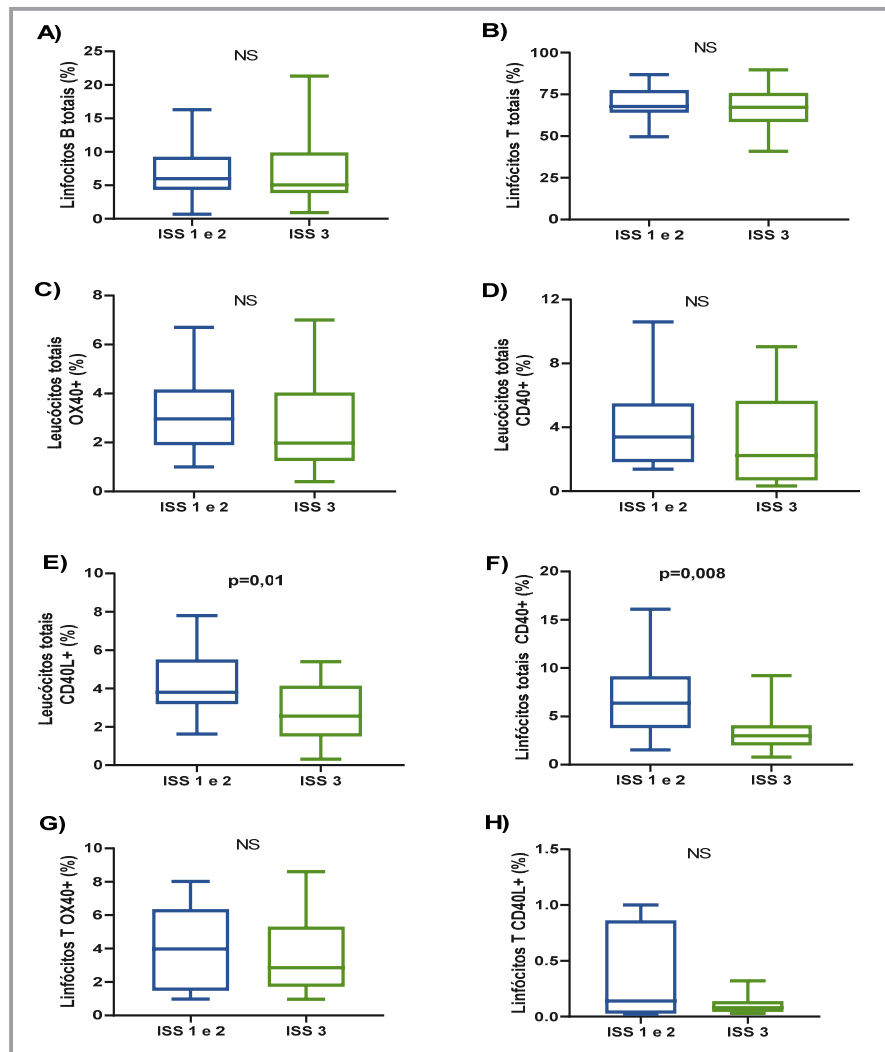


**Figura 18** - Dosagem sérica dos níveis de A) s4-1BB; B) sOX40 e C) sCD40L em [sangue periférico](#) de pacientes com mieloma múltiplo (n=40), comparativamente aos níveis de controles saudáveis. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste Mann Whitney, foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS E DE MOLÉCULAS OX40+, CD40+ e CD40L+ NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (ISS)

Nas análises de sangue periférico, não houve diferença entre os grupos ISS1-2 e ISS 3 para os níveis de linfócitos B (CD20), linfócitos T, leucócitos totais OX40<sup>+</sup> e CD40<sup>+</sup> (Figuras 19 A-D). O grupo de pacientes com ISS-3 apresentaram as medianas dos níveis de leucócitos totais CD40L<sup>+</sup> e de linfócitos totais CD40<sup>+</sup> menores quando comparado ao grupo ISS1 e 2 ( $p=0,01$ ;  $p=0,008$ , respectivamente) como mostrado na Figura 19 E-F.

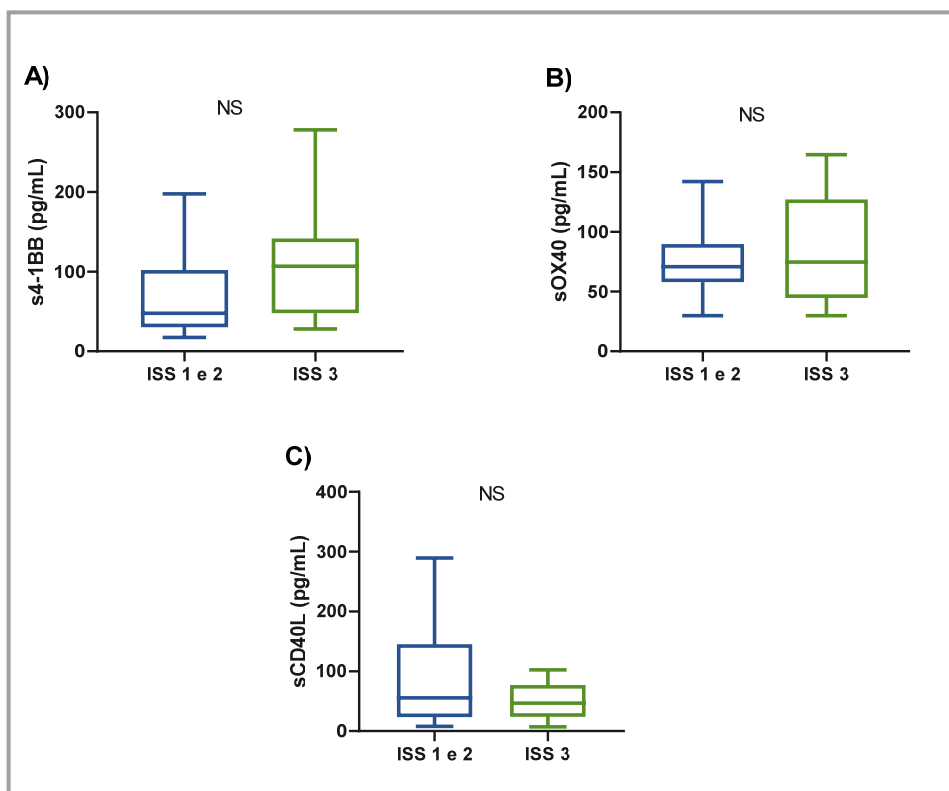




**Figura 19** - Análises de expressão de linfócitos B e T, moléculas OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, CD40L<sup>+</sup>, em sangue periférico de pacientes com mieloma múltiplo de acordo com o *International Staging System* (ISS). Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.6 ANÁLISE DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE s4-1BB, sOX40 e sCD40L NO SANGUE PERIFÉRICO DE ACORDO COM INTERNATIONAL STAGING SYSTEM (ISS)

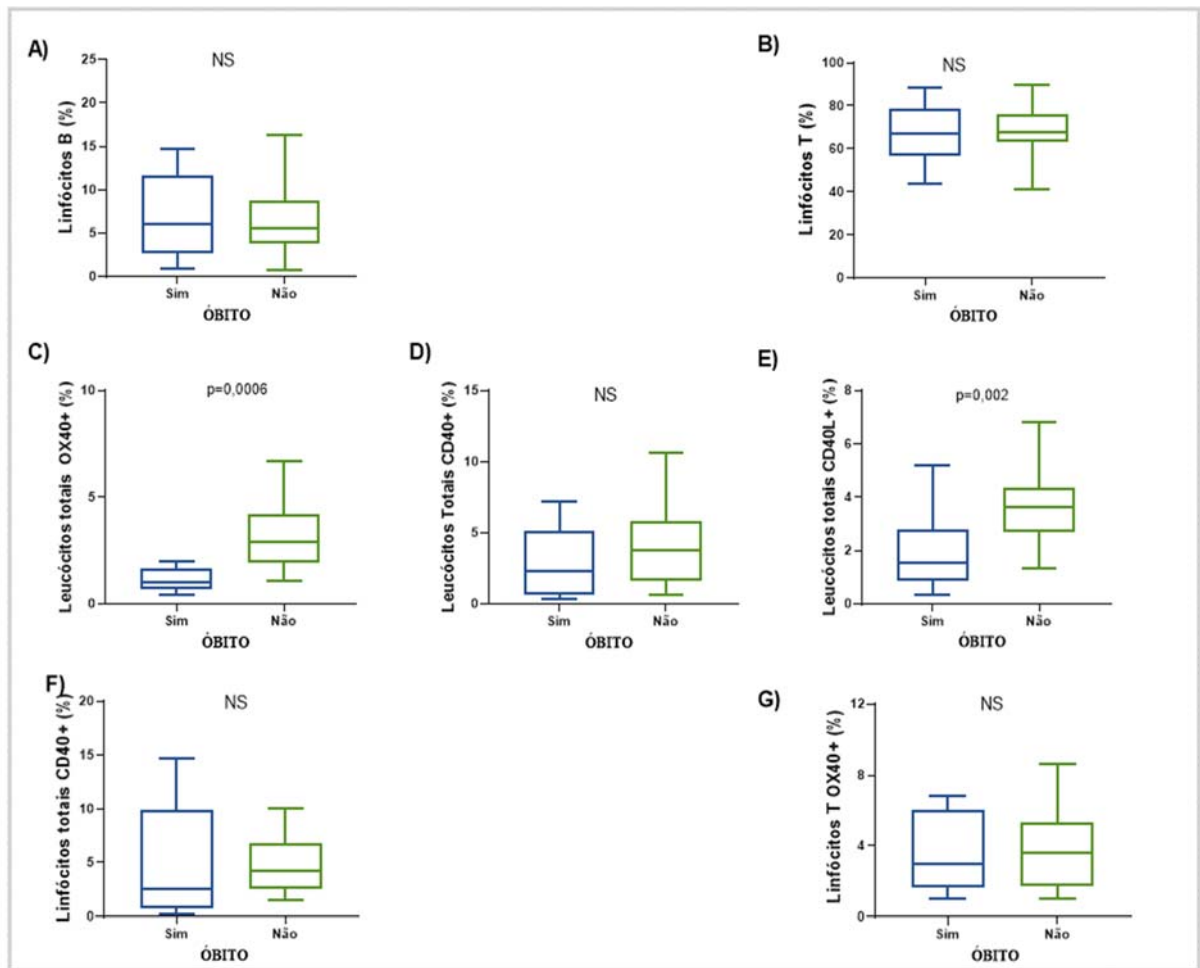
Não foram observadas diferenças significativas nas medianas dos níveis solúveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L entre os grupos ISS1-2 e ISS3 (Figura 20).



**Figura 20** - Valores de níveis séricos solúveis expressos em pg/mL. A) s4-1BB; B) sOX40 e C) sCD40L de pacientes com mieloma múltiplo de acordo com o *International Staging System* (ISS). Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.7 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS E DE MOLÉCULAS OX40+, CD40+ e CD40L+ ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA ÓBITO E SOBREVIVERAM

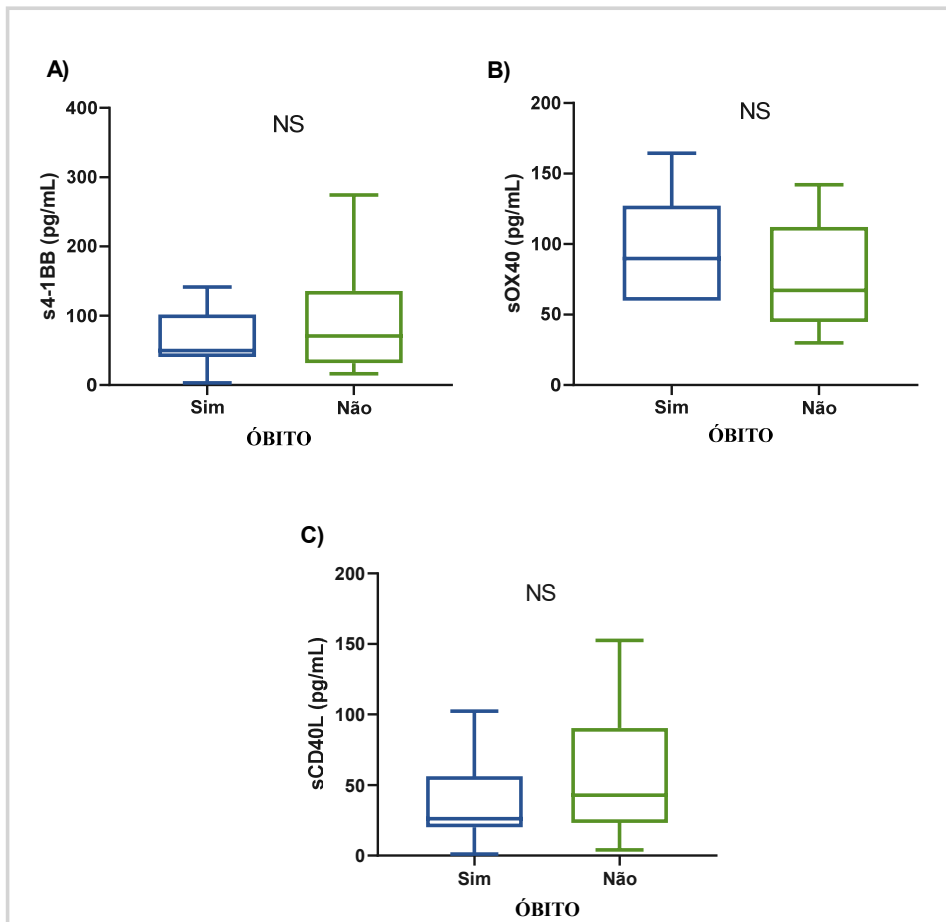
Nas análises de sangue periférico, foram observados níveis inferiores de leucócitos totais OX40+ e CD40L+ no grupo de pacientes que evoluiu para o óbito quando comparado ao grupo que sobreviveram ( $p < 0,05$ ). Para as demais análises, não foram observadas diferenças significantes entre os grupos avaliados (Figura 21).



**Figura 21** - Níveis percentuais de CDs. A) CD20 linfócitos B; B) CD3 linfócitos T; C) OX40 D) CD40; E) CD40L; F) Linfócitos CD40<sup>+</sup>; G) linfócitos T OX40 e linfócitos T CD40 em [sangue periférico](#) de pacientes com mieloma múltiplo de acordo com o óbito. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.8 ANÁLISE DOS NÍVEIS SOLÚVEIS DE s4-1BB, sOX40 e sCD40L ENTRE OS GRUPOS DE PACIENTES QUE EVOLUÍRAM PARA ÓBITO E SOBREVIVERAM

Não foram observadas diferenças significativas dos níveis de s4-1BB, sOX40 e sCD40L no sangue periférico entre os grupos que evoluíram para o óbito e sobreviveram (Figura 22)

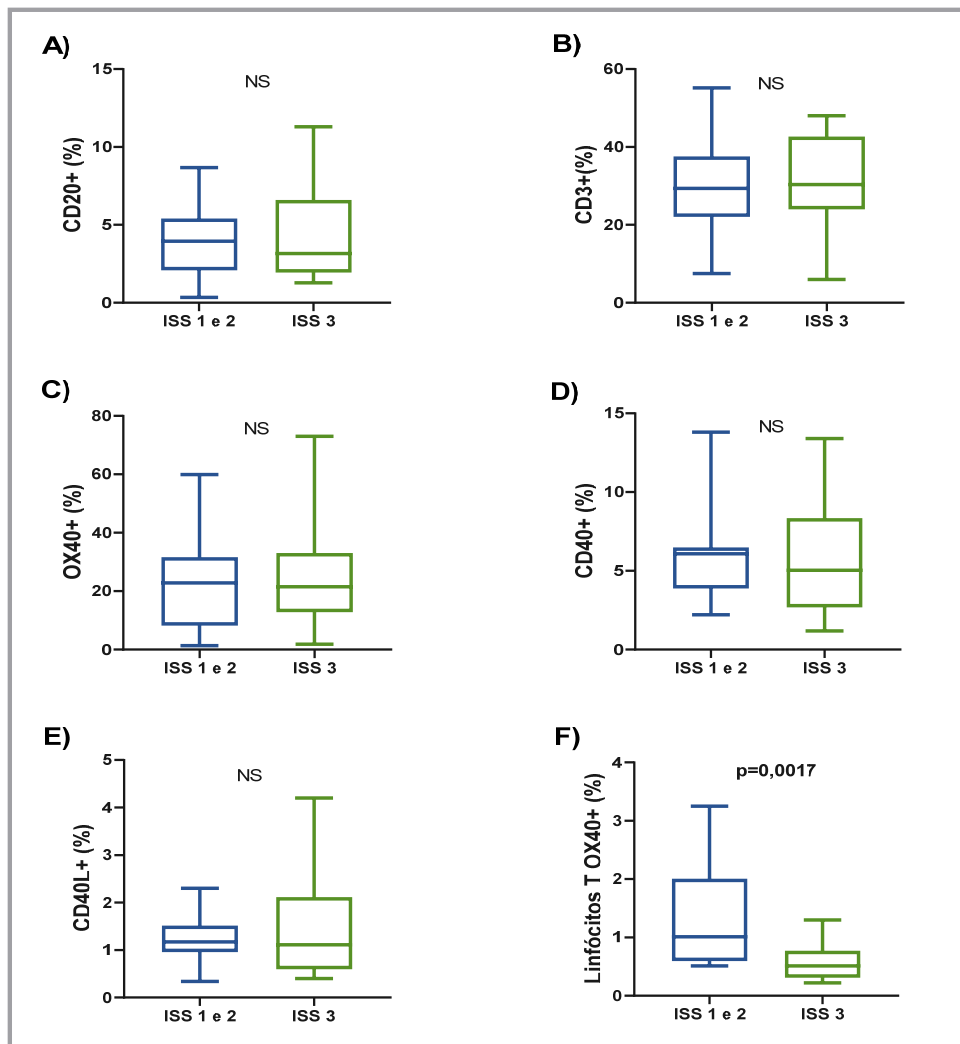


**Figura 22** - Níveis séricos. A) s4-1BBs; B) sOX40 e C) sCD40L em pacientes com MM de acordo com o óbito. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

## 4.9 ANÁLISE DOS NÍVEIS EXPRESSÃO DE CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> NA MEDULA ÓSSEA

### 4.9.1 De acordo com International Staging System (ISS)

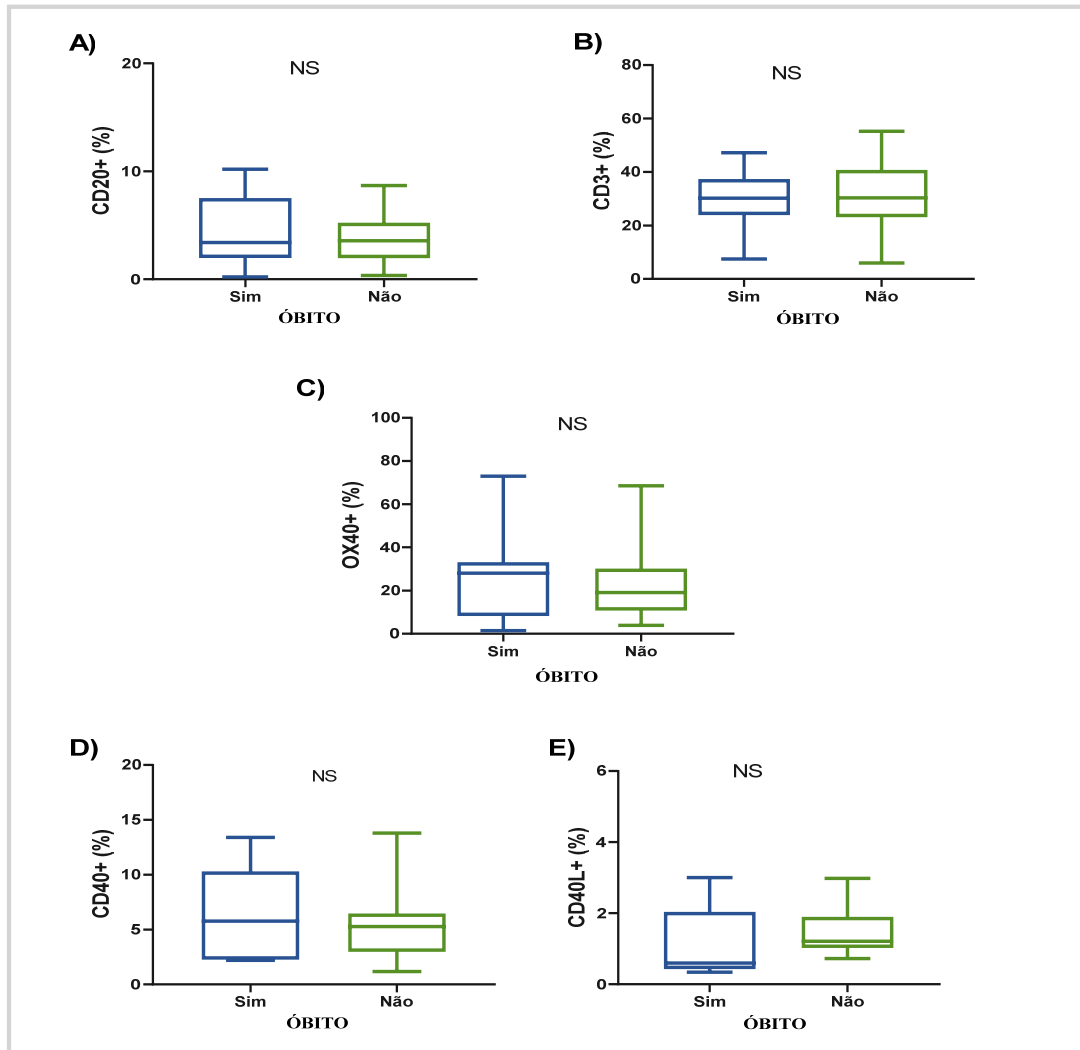
Nas amostras de medula óssea, não houve diferença entre os grupos ISS1-2 e ISS3 analisando-se a mediana de expressão de CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> (Figura 23). Nas análises de linfócitos T OX40<sup>+</sup>, verificou-se que um menor valor de mediana dos níveis desses linfócitos no grupo ISS3 quando comparado ao grupo ISS1 e 2 ( $p=0,0017$ ; Figura 23).



**Figura 23** - Valores percentuais de CDs. A) CD20<sup>+</sup> B) CD3<sup>+</sup>, C) OX40<sup>+</sup>, D) CD40<sup>+</sup>, E) CD40L<sup>+</sup> e F) linfócitos T/OX40<sup>+</sup>, em medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo, de acordo com o *International Staging System* (ISS). Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p<0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.9.2 Comparação entre os grupos de pacientes que evoluíram para óbito e sobreviveram

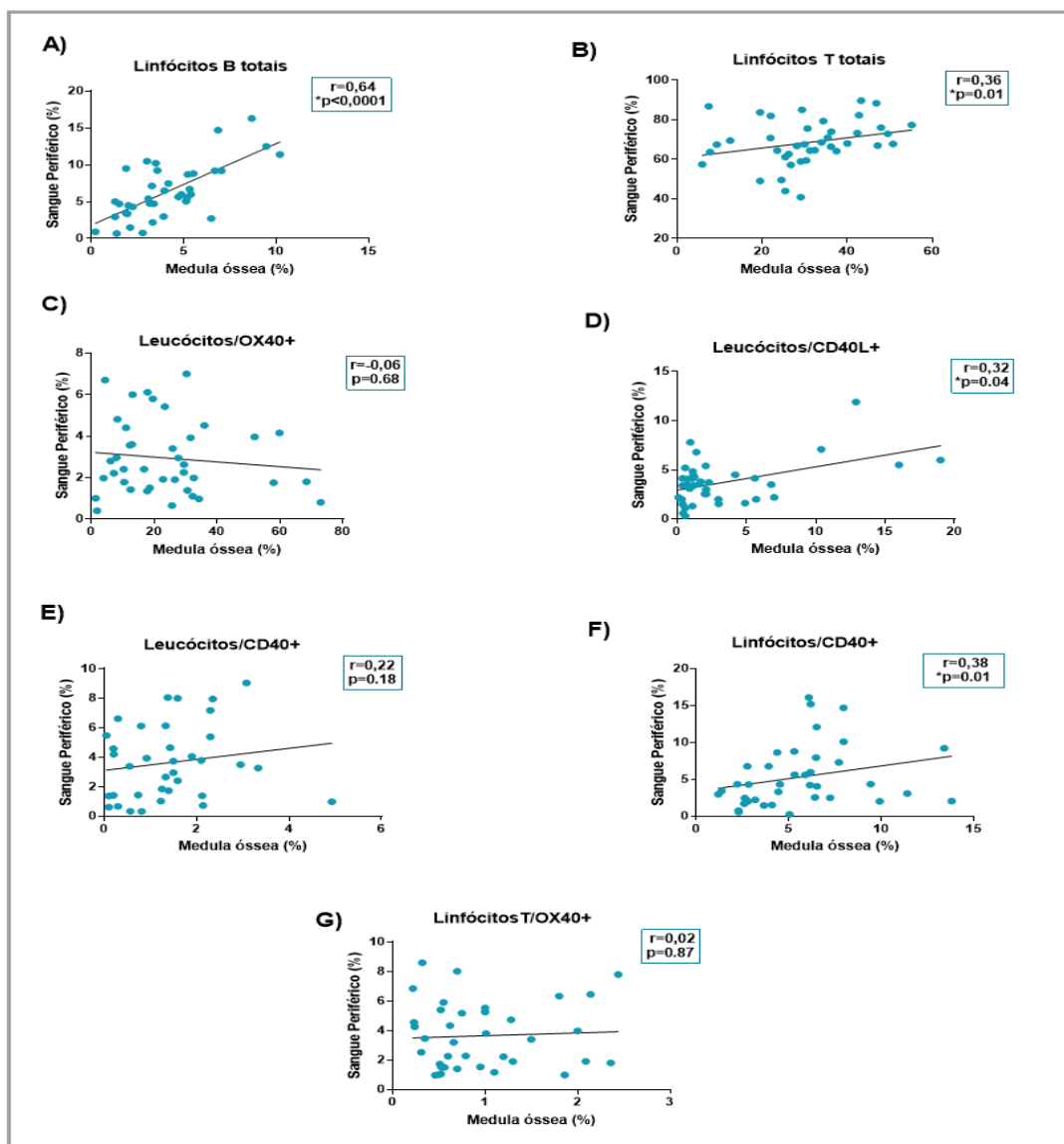
Nas amostras de medula óssea, não houve diferença dos valores de mediana de expressão de CD20<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> na medula óssea entre os grupos que foram para óbito e sobreviveram (Figura 24).



**Figura 24** - Níveis percentuais de CDs. A) CD20<sup>+</sup>; B) CD3<sup>+</sup>; C) OX40<sup>+</sup>, D) CD40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> em medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo de acordo com o óbito. Os gráficos estão representados com média e desvio padrão. Foi realizado teste de Mann Whitney para análise entre os grupos e foi considerado significativo  $p < 0,05$ . NS: não significativo.

#### 4.10 CORRELAÇÃO DOS NÍVEIS EXPRESSÃO DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS E DE MOLÉCULAS OX40+, CD40+ e CD40L+ ENTRE O SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA

Verificou-se que houve correlação moderada nos níveis de linfócitos B entre sangue periférico e medula óssea ( $r=0,64$  e  $p<0,001$ ). Também foi observado uma fraca correlação dos níveis de linfócitos T ( $r=0,36$  e  $p=0,01$ ), leucócitos/CD40L+ ( $r=0,32$  e  $p=0,04$ ) e linfócitos/CD40+ ( $r=0,38$  e  $p=0,01$ ; Figura 25).



**Figura 25** - Correlação dos valores percentuais de linfócitos. A) linfócitos B; B) linfócitos T; C) leucócitos OX40+; D) leucócitos CD40L+; E) leucócitos CD40+; F) linfócitos/CD40+ e G) linfócitos T/OX40+ entre sangue periférico e medula óssea dos pacientes. Teste de correlação de Spearman.  $P<0,05$

#### 4.11 ANÁLISE DA SOBREVIDA GLOBAL

Para determinar os valores de ponto de corte ideais (*cut-off*) para avaliar a capacidade diagnóstica de biomarcadores, foram realizadas análises por *Receiver Operating Characteristic* (ROC). Na análise da área sobre a curva (AUC, *area under curve*) foi encontrada baixa sensibilidade e especificidade de s4-1BB, sOX40, sCD40L e CD3, enquanto que para linfócitos B (CD20) e B CD20<sup>low</sup>, linfócitos totais OX40<sup>+</sup>, CD40<sup>+</sup>, e CD40L<sup>+</sup>, e de linfócitos T CD40<sup>+</sup> e T OX40<sup>+</sup> foram encontrados valores com significância estatística de acordo com o nível de sensibilidade e especificidade.

Apenas os níveis dos marcadores calculados pela curva ROC que estabeleceram um ponto de corte com significância estatística para a ocorrência de mortalidade foram listados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Parâmetros encontrados da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*)

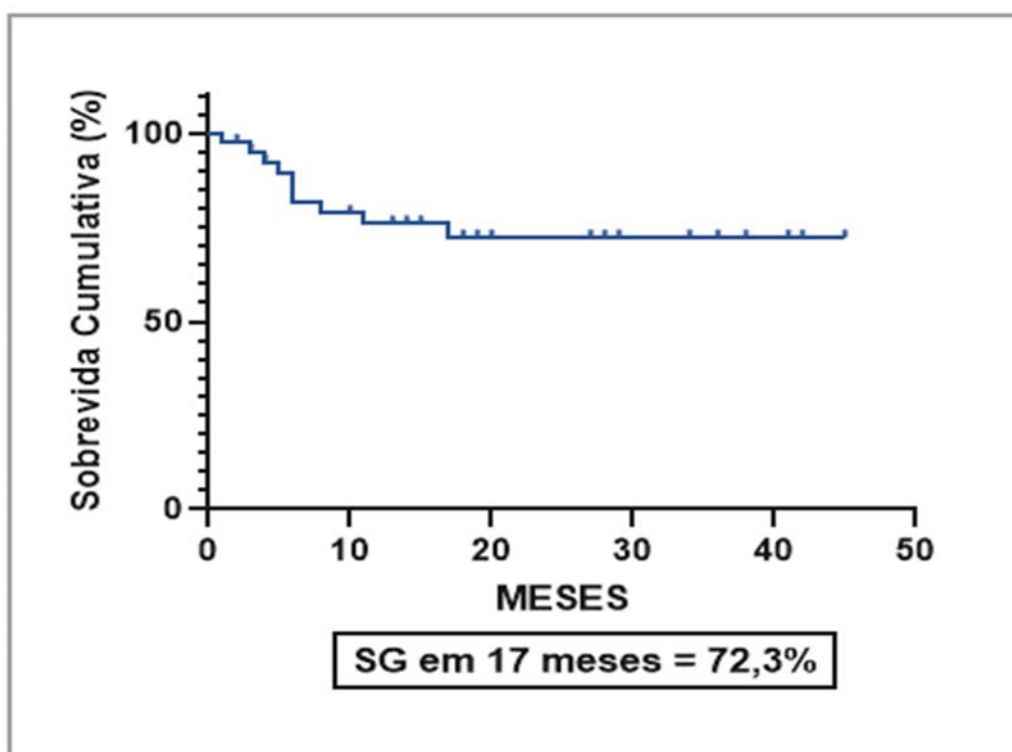
POPULAÇÕES	AUC	Ponto de corte (%)	Sensibilidade	Especificidade	Valor de p	IC 95%
LINFÓCITOS B	0,8891	< 9,110	0,871	0,826	<0,0001	0,805 – 0,972
LINFÓCITOS B (CD20 <sup>LOW</sup> )	0,9060	< 1,085	0,864	0,739	<0,0001	0,832 - 0,979
LEUCÓCITOS TOTAIS OX40 <sup>+</sup>	0,7424	<2,930	0,913	0,420	0,0012	0,616 - 0,868
LEUCÓCITOS TOTAIS CD40 <sup>+</sup>	0,7614	< 5,415	0,743	0,695	0,0006	0,644 - 0,878
LEUCÓCITOS TOTAIS CD40L <sup>+</sup>	0,7393	<3,095	0,904	0,615	0,002	0,607 - 0,871
LINFÓCITOS TOTAIS CD40 <sup>+</sup>	0,7648	<3,710	1,000	0,435	0,0004	0,648 - 0,880
LINFÓCITOS T OX40 <sup>+</sup>	0,7720	≥ 1,695	0,727	0,619	0,0008	0,649 – 0,894
LINFÓCITOS T CD40L <sup>+</sup>	0,9375	< 0,2750	0,875	0,772	<0,0001	0,858 - 1,0

AUC=*Area Under Curve*; IC=Intervalo de confiança.

- **Curva de sobrevida global dos pacientes de mieloma múltiplo**

Num seguimento de 45 meses, a mediana de sobrevida global foi de 72,3% em 17 meses, como demonstrado na Figura 26.





**Figura 26** – Curva de sobrevida global dos pacientes portadores de MM do Hospital de Câncer de Pernambuco. *Log-rank test*.

- **Curva de sobrevida global segundo os pontos de cortes da curva ROC**

Na análise de linfócitos B, foi observado uma sobrevida em 78% dos pacientes no grupo com níveis  $\geq 9,11\%$  desses linfócitos quando comparado ao que obteve níveis de linfócitos B  $< 9,11\%$  ( $p=0,31$ ) como mostra Figura 27. Na análise de linfócitos B CD20<sup>low</sup>, foi observado uma sobrevida de 85% dos pacientes com nível  $\geq 1,085\%$  e de 68%  $<1,085\%$  ( $p=0,36$ ).

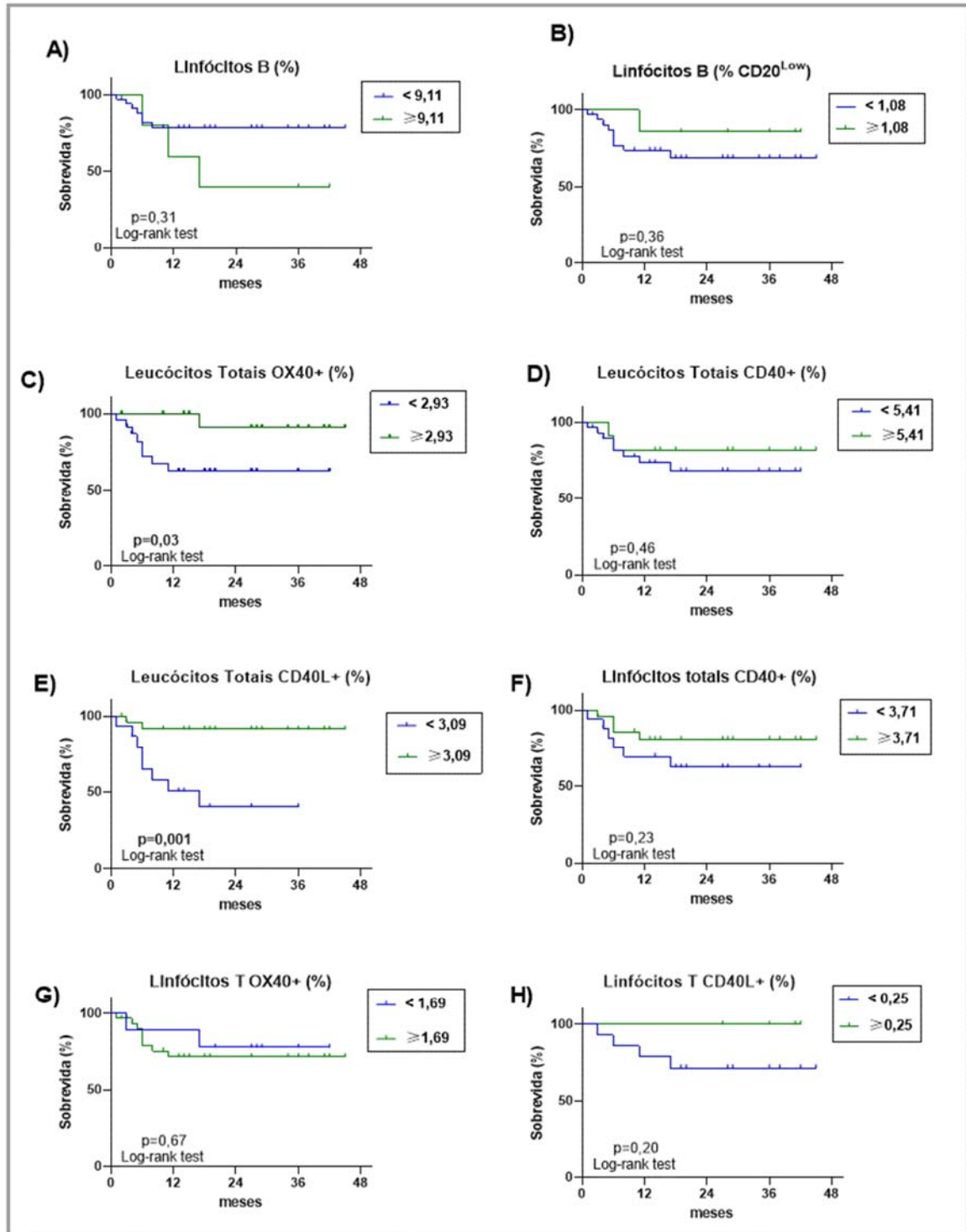
Na análise de leucócitos totais OX40<sup>+</sup>, foi observado uma sobrevida de 85% dos pacientes que obtiveram níveis  $\geq 2,93\%$  e de 62% com níveis  $<2,93\%$  ( $p=0,03$ ).

Na análise de leucócitos totais CD40<sup>+</sup>, foi observado uma sobrevida de 81% dos pacientes que obtiveram níveis  $\geq 5,41\%$  e de 68% dos pacientes com níveis  $< 5,41\%$  ( $p=0,46$ ).

Na análise de linfócitos totais CD40L<sup>+</sup>, foi observado uma sobrevida de 91% dos pacientes com níveis  $\geq 3,09\%$  e de 50% no grupo que apresentou níveis  $<3,09\%$  (mediana de 17 meses;  $p=0,001$ ) (Figura 27-E).

Na análise de linfócitos totais CD40<sup>+</sup>, foi observado uma sobrevida de 80% dos pacientes com níveis  $\geq 3,71\%$  e de 62% com níveis  $<3,71\%$  ( $p=0,23$ ). Na análise de linfócitos

T OX40+, foi observado uma sobrevida de 71% dos pacientes do grupo com níveis  $\geq 1,69\%$  e de 77% no grupo com níveis  $< 1,69\%$  ( $p=0,67$ ). Detalhes na Figura 27.



**Figura 27** - Sobrevida global entre os grupos de pacientes de acordo com os valores de cut-off obtido na curva ROC. Log-rank test. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .



# DISCUSSÃO

---

## 5 DISCUSSÃO

O mieloma múltiplo é uma doença heterogênea, com características clínicas e biológicas distintas entre si. Associada à nossa diversidade genética, nível socioeconômico baixo, alteração de status nutricional, faz com que o perfil clínico e imunológico dos pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Pernambuco, possa ser ainda mais complexo e desafiador. Os estudos envolvendo análises de moléculas mediadoras da resposta imune tem o propósito de descobrir potenciais marcadores prognósticos e, por consequência, buscar novos alvos de tratamento. Trata-se do primeiro estudo em Recife sobre os aspectos imunológicos dos pacientes portadores de mieloma múltiplo atendidos pelo Sistema Único de Saúde.

Dos pacientes analisados, foram observadas características clínicas semelhantes ao descrito na literatura, com mediana de idade de 60,5 anos. No Brasil, a mediana de idade como descrito por Hungria (2007) com dados de 16 instituições brasileiras e Todaro et al. (2011) em São Paulo, demonstraram mediana de 60,5 e 58,5 anos de idade, respectivamente (Hungria 2007; Todaro et al. 2011). Entretanto, é uma mediana de idade relativamente menor que os dados descritos no continente Europeu por Palumbo et al. (2011) que descreveu uma mediana de 70 anos de idade ao diagnóstico, e apenas 37% dos pacientes sendo diagnosticados abaixo dos 65 anos, enquanto em nossa casuística, 55% dos casos tinham abaixo de 60 anos.

Mieloma múltiplo é um tumor raro em indivíduos com idade abaixo de 30 anos com frequência de 0,5% dos casos e de 10,2% abaixo de 50 anos, diferindo de nossa amostra, na qual 22,5% dos casos tinham idade abaixo de 50 anos (Kazandjian 2016; Miller et al. 2019).

Em relação ao sexo, houve predomínio do sexo masculino (57,5%) em consonância ao que é encontrado na literatura, cuja prevalência foi maior em homens do que em mulheres, e maior frequência de cor parda ou negra (87,5%) (Miller et al. 2019; Hsieh et al. 2019).

O risco MGUS e MM entre indivíduos de ascendência afro-americana (AAs) é de duas vezes ou mais quando comparado aos caucasianos, com taxas similares de transformação de MGUS para MM em ambas as raças, com estudos descritivos, entretanto, sugerindo resultados de sobrevivência similares ou piores em AAs. Acredita-se que essa maior incidência se deva à presença mais frequente de lesões pré malignas (MGUS) em AAs. Na pretensão de elucidar tal hipótese, Landgren et al. (2014) conduziram uma coorte que incluiu 5.798 AAs e 28.939 pacientes europeus-americanos (EAs) no período entre 1973 e 2005 e seguiram-nos até 2006. Os autores confirmaram que a incidência de MM em AAs foi o dobro que nos EAs no grupo

geral, e três vezes maior no grupo com idade menor que 50 anos. Os AAs também tinham uma idade mais jovem quando diagnosticados com MGUS (Landgren et al. 2014). As diferenças raciais descritas não podem ser atribuídas exclusivamente às diferenças socioeconômicas e de acesso ao cuidado e pelo menos em parte, provavelmente serão devido a diferenças genéticas e biológicas subjacentes mais profundas (Kazandjian 2016).

O *International Staging System* (ISS), uma classificação poderosa e reprodutível de três estágios, é indiscutivelmente o método mais fidedigno de prognóstico (Moreau et al. 2017). Ele vem sofrendo ajustes e incorporando outros parâmetros (R-ISS), mas se mantém como o escore mais importante pois consegue refletir a sobrevida dos pacientes (uma vez que baseia em marcadores laboratoriais de atividade da doença), reduzindo os vieses durante o estadiamento. Utilizando-se o ISS-R, a média de SLP foi de 66 meses para pacientes com R-ISS estágio 1, 42 meses para pacientes com Estágio 2 e 29 meses no estágio 3. A SG em 5 anos foi de 82%, 62% e 40%, respectivamente. O tempo médio do SG não foi alcançado para pacientes com ISS-R 1, e foi de 83 e 43 meses para pacientes do ISS-R 2 e 3, respectivamente (Palumbo et al. 2015). Avaliando-se dados mais antigos, que utilizaram-se do ISS tradicional, a SG esperada foi de 62, 44 e 29 meses, para os ISS-1 2 e 3, respectivamente (Greipp et al. 2005).

Semelhante a dados brasileiros publicados por Hungria et al. (2008), nos quais a maioria dos portadores de MM apresentavam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico (ISS 1:6,4% 2:17,1% e 3:76,5%), em nossa casuística também houve predomínio do ISS- 3, com a seguinte distribuição: 29,7%; 21,6% e 48,6%, para os ISS-1 2 e 3, respectivamente.

Nossa mortalidade foi de 25% ao longo do período de 45 meses de seguimento, e destes 30% acontecerem nos primeiros 3 meses do diagnóstico. No MM a elevada mortalidade precoce é justificada por muitas anormalidades na função imune, inferindo uma significativa morbimortalidade por infecções. O risco de infecções normalmente se dá por bactérias capsuladas e é muito maior nos períodos de doença ativa, quando os pacientes estão mais imunossuprimidos pela combinação de doença e efeitos imunossupressores do tratamento. Este risco é maior nos primeiros 3 meses do diagnóstico e pode contribuir significativamente para os mais de 10% de mortalidade visto neste período (Pratt e Morris 2007; Xia et al. 2018). Acreditamos que a maior mortalidade precoce, em nossa casuística, está relacionada com a dificuldade de acesso e atraso no diagnóstico, comuns em nosso meio e em nosso trabalho, confirmado por uma mediana de 6 meses de intervalo entre os primeiros sintomas e o diagnóstico de MM.

Conforme descrito anteriormente, o MM é um exemplo de desregulação imune, e apresenta na imunoparesia secundária ao déficit na produção e nos níveis das imunoglobulinas

não acometidas, uma das suas características clínicas mais marcantes e relevantes, que se acredita, seja secundária à redução dos progenitores de células B da medula óssea. Assim como Rawstron et al. (1998), encontramos níveis inferiores de CD20 e CD20<sup>low</sup>, em comparação aos controles. Esses autores observaram que pacientes com mieloma apresentavam supressão de células B-progenitoras na medula como resultado do deslocamento das células normais de loci específicos na medula óssea por células plasmáticas neoplásicas, sendo que ambas expressam as moléculas de adesão CD38 e Syndecan-1. Além disso, a interação das células plasmáticas de mieloma com células estromais da medula óssea, produzem fatores que induzem ativamente apoptose das células B-progenitoras. Esses autores não encontraram populações fenotipicamente distintas de células B no sangue dos pacientes com MM e nem de aumento nos níveis de qualquer subconjunto de células B (Rawstron et al. 1998).

Corroborando esses dados, Pessoa de Magalhães et al. (2013), demonstrou que ao mesmo tempo em que há uma depleção de células B nos pacientes com MGUS e MM sintomático quando comparados a grupo controle, foi possível demonstrar que naqueles pacientes que conseguem obter controle da doença, mantendo-a estável e por longo tempo, há uma normalização tanto na medula óssea quanto no sangue periférico da quantidade de células B, devido ao aumento em medula óssea dos precursores normais de células B e *homing* de células plasmáticas normais, bem como células B periféricas pré centro-germinativo.

Na análise de correlação entre os dados de CD20 obtidos em sangue e medula, encontramos uma correlação moderada ( $r=0,64$ ;  $p<0,001$ ), reforçando os dados de que a depleção de células B na medula óssea implica em níveis mais baixos no periférico, e corroboram para o maior risco de infecções nesses pacientes.

Analisando-se os linfócitos T totais (CD3<sup>+</sup>), não foi possível demonstrar diferenças entre os valores séricos dos pacientes e controles em nossa casuística. Entretanto, é descrito que no MM há alteração do perfil imunológico das células T, caracterizada pelo aumento do número de células T reguladoras (Tregs), alteração na relação CD4/CD8 e alteração do número de células T CD4<sup>+</sup>.

Pacientes com mieloma múltiplo podem apresentar uma variedade de anormalidades numéricas e funcionais das células T. Subconjuntos de células T são frequentemente anormais, com inversão da razão CD4/CD8 (Mills e Cawley 1983) e uma proporção anormal Th1/Th2 CD4<sup>+</sup> (Ogawara et al 2005). A análise do receptor de células T (TCR) revelou uma grave interrupção da diversidade do repertório global das células T (Mariani et al. 2001) com expansões oligoclonais marcadas de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Tais expansões monoclonais de

células TCD8<sup>+</sup> ocorrem em indivíduos saudáveis com idade crescente, mas são muito mais exuberantes e frequentes em pacientes com paraproteinemia (Moss et al. 1996).

Os clones oligoclonais são persistentes, com um fenótipo de células T citotóxicas (Raitakari et al. 2003) e maior frequência na medula óssea, e sua presença se correlaciona com maior sobrevida (Raitakari et al. 2003; Pérez-Andres et al. 2006). Não está claro se as células T oligoclonais são dirigidas contra células plasmáticas malignas ou um alvo não relacionado, como antígenos virais, embora as respostas T-vírus específicas não pareçam estar prejudicadas no MM (Maecker et al. 2003).

As células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs), com potencial de inibir a função celular T, estão aumentadas no MM e seus níveis se correlacionam com o estágio da doença e o desfecho clínico. Foi demonstrado que as MDSC podem mediar a supressão de respostas de células T específicas do mieloma através da indução de anergia de células T e desenvolvimento de Treg no microambiente do MM (Malek et al. 2016).

A expressão do OX40 em sangue periférico, avaliada nos leucócitos totais e na subpopulação de linfócitos T dos pacientes em nosso estudo foi significativamente maior que nos controles. O OX40 é descrito por vários autores, como sendo expresso nos infiltrados linfocitários tumorais (TIL) do carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, câncer de ovário, câncer gástrico, carcinoma escamoso de pele, câncer de mama e câncer colorretal.

Um estudo realizado em pacientes com câncer gástrico por Martins et al. (2018), mostrou níveis mais elevados de linfócitos T OX40 nos pacientes quando comparado aos controles, e os estádios mais avançados apresentavam níveis séricos ainda mais alto de OX40, que aqueles com estágio mais precoces (Martins et al. 2018).

Apesar de nossos achados se assemelharem, demonstrando níveis mais elevados de OX40 em leucócitos totais no sangue periférico com relação aos controles, quando comparamos os pacientes entre si, em relação ao desfecho óbito e nos com ISS menor (ISS-1 versus ISS-3), verificamos que os níveis de linfócitos T OX40<sup>+</sup> foram baixos, ao contrário dos dados relatados no câncer gástrico por Martins et al. (2018). Não foi possível realizar coleta de amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis para comparar os níveis de OX40<sup>+</sup> encontrados na medula dos pacientes.

No entanto, os dados obtidos dos níveis de OX40<sup>+</sup> no sangue podem nortear a possibilidade de utilizar drogas agonistas de OX40 devido aos seus efeitos antitumorais, pois desencadeia a inibição de células Treg, permitindo que as células dendríticas alcancem os linfonodos drenantes e promova ativação e proliferação de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> antitumorais ampliando resposta imune humoral e celular contra o tumor (Deng et al. 2019).

Os pacientes com MM em comparação aos quadros de MGUS e controles saudáveis, apresentam níveis elevados de células Treg ativadas (CD45RA<sup>-</sup>FoxP3<sup>hi</sup>) sugerindo que um perfil imunossupressor na progressão do MGUS para o MM. A diferença significativa entre pacientes do MGUS e controles saudáveis mostra que no estágio inicial da mielomagenese, anormalidades fenotípicas das células imunes vão acontecendo nos pacientes, levando à senescência celular e falha funcional (Wang et al. 2018). Outros autores demonstraram o papel das células Treg na imunossupressão e evasão imune no MM (Braga et al. 2014; Frassanito et al. 2015). Hipotetizamos que uma possível explicação para a maior sobrevida dos casos com níveis mais elevados de OX40 poderia estar relacionado redução dos níveis de células Treg.

A estimulação do OX40 em células Treg Foxp3<sup>+</sup> ativadas aboliu completamente a capacidade das Treg de suprimir a proliferação de células T e a produção de citocinas. Além disso, a sinalização OX40 para as Treg não parece afetar sua sobrevivência e proliferação, mas parece reprimir a expressão de Foxp3. Assim, o OX40 representa um potente regulador negativo não só para Treg naturais Foxp3<sup>+</sup>, mas também para Treg geradas a partir de células T efectoras ativadas, sugerindo que o OX40 controla um importante “*checkpoint*” na homeostase das células Treg. O OX40 desempenha um papel duplo na ativação de células T, sendo sem dúvida uma molécula coestimuladora potente para células T efectoras, mas também um poderoso regulador negativo do Foxp3<sup>+</sup> Treg (Leshner e Song 2009).

Kim et al. (2016), verificaram em modelos experimentais de MM, que os níveis de expressões de OX40, 4-1BB e GITR em células TCD4<sup>+</sup> apresentavam redução quando submetidos ao tratamento com talidomida. Houve uma maior diferenciação em células TCD4<sup>+</sup> em Treg com redução na expressão de OX40 e aumento de expressão do GITR. Dessa forma, a talidomida tem um papel relevante na diferenciação de células T reguladoras.

Além disso, foram relatados que o uso da talidomida em associação ao corticóide (TM/DX) foi responsável pela redução da expressão de moléculas coestimuladoras em células T efectoras, porém manteve-se preservada em células Treg, demonstrando que tratamento combinado de TM/DX poderia melhorar ainda mais esses efeitos imunomoduladores através da regulação da expressão de GITR, OX40 e 4-1BB em células TCD4<sup>+</sup> (Kim et al. 2017). Esses dados reforçam a hipótese de que tratamento com imunomoduladores em pacientes com MM que apresentam os níveis elevados de OX40 na membrana celular de leucócitos pode ter impacto nesta mudança de expressão, demonstrando que a redução nos níveis de expressão de OX40, com o tratamento seria importante para reconstituição da resposta imune contra as células tumorais.



Outros estudos fase I utilizando-se estes anticorpos agonista do OX40 estão em curso e comparativamente àqueles que promovem o bloqueio do CTLA-4 (Ipilimumab), o uso de anti-OX40 demonstrou menor toxicidade e menor risco de desenvolvimento de doenças autoimunes, colites, dentre outros, e teve como efeito adverso mais comum a leucopenia. Estudos com bloqueio duplo ou triplo, combinando-se o anti-OX40 com anti-CTLA-4 e/ou anti-PD-1 estão sendo realizados em diferentes tumores, dentre eles linfomas, leucemias e mieloma múltiplo (Linch et al. 2015).

Nos pacientes com MM observamos níveis baixos de OX40 solúvel, ao contrário do que foi relatado por Sawada et al. (2019). Esses autores verificaram altos níveis solúveis de sOX40 em pacientes com câncer colorretal avançado. Os mesmos achados foram descritos na Leucemia de células T do adulto (ATL), por Tanaka et al. (2019), que verificaram altos níveis de sOX40 no sangue de pacientes com ATL forma leucêmica, sugerindo que níveis elevados de sOX40 poderiam ser úteis como um marcador de diagnóstico diferencial nesse tipo de leucemia.

O 4-1BB é expresso na superfície de células dendríticas (CD), que são fundamentais na apresentação de antígenos e possuem a capacidade de estimular as células T *naive* (Swallow et al. 1999; Cheuk et al. 2004). No MM há descrição de defeitos em células dendríticas de sangue periféricos (CD), como um número reduzido de células dendríticas plasmocitóides (PDCs), CDs mielóides (MDCs) ou monócitos em sangue periférico (Rodríguez-Otero et al. 2017; Serrano-del Valle et al. 2019). Essa deficiência de CD poderia implicar, hipoteticamente, em menor expressão de 4-1BB no MM e por consequência níveis reduzidos de s4-1BB, como os encontrados em nossa casuística.

Salih et al. (2001), mostrou que uma forma solúvel de 4-1BBL estava presente em altos níveis no soro de alguns pacientes com doenças hematológicas (linfomas, leucemias e síndromes mielodisplásicas) e em baixos níveis em doadores saudáveis, indicando que a liberação de 4-1BBL solúvel da superfície celular regularia as interações 4-1BB-4-1BBL entre células *in vivo*. A conversão de 4-1BBL a uma forma solúvel ativa alteraria tanto as respostas celulares proximais quanto distais, incluindo sobrevivência celular e respostas coestimulatórias ou inflamatórias, que são mediadas através da via 4-1BB. Vários subtipos de linfomas e leucemias expressam 4-1BBL, porém a precisa função desta proteína nas neoplasias onco-hematológicas ainda não é totalmente conhecida (Vinay e Kwon 2012; Campana et al. 2014; Bartkowiak e Curran 2015).

Em câncer colorretal, Lima et al. (2020) publicou recentemente que os níveis de s4-1BB apresentavam um decréscimo nos estágios mais avançados de doença, quando comparados aos

estágios mais precoces e os níveis mais baixos dessa molécula, estaria associada à progressão do câncer colorretal. Wilcox et al. (2002), observaram que em modelo animal, a utilização de agonistas anti-4-1BB, aumentou a habilidade de células dendríticas em ativar *in vitro* a proliferação de células T respondendo tanto a aloantígenos como a antígenos próprios. Também se demonstrou *in vitro* que a ativação de células dendríticas pelo anti-4-1BB durante infecções virais, levou a fosforilação da via STAT3, fortalecendo a resposta de células T CD8<sup>+</sup> e promoveram a eliminação do vírus (Zhang et al. 2010a). Esses achados demonstram que a ligação do 4-1BBL é importante para as células dendríticas efetoras (Vinay e Kwon 2011).

Células P815 transfectadas para expressar o 4-1BBL e co-incubadas com células B humanas tiveram um aumento de sobrevivência, aumento do índice de proliferação e desregulação dos níveis de TNF  $\alpha$  e  $\beta$ , sugerindo que a expressão de 4-1BB nos linfócitos B é funcional (Zhang et al. 2010b, Vinay e Kwon 2011). A identificação de linfócitos B 4-1BB<sup>+</sup> nos centros germinativos das tonsilas, indicam um possível papel na imunidade humoral. A sugestão de que 4-1BB nos linfócitos B são fisiologicamente funcionantes, foi demonstrada utilizando-se células B de murinos tratadas com anti-4-1BB isoladamente ou em combinação com proteínas indutoras de autoimunidade (Cheuk et al. 2004; Vinay e Kwon 2011). A redução significativa de linfócitos B em nossos pacientes também poderia explicar os níveis mais reduzidos de s4-1BB.

O nível de expressão de 4-1BBL nas células tumorais parece ser importante. Níveis mais elevados destas moléculas coestimuladoras aparentam ser mais efetivos em induzir uma resposta imune adequada antitumoral (Cheuk et al. 2004).

Outra molécula que tem demonstrado importância na regulação imune contra células tumorais, é o CD40. Expressão substancial do CD40 foi detectada em uma variedade de tumores sólidos, incluindo câncer de bexiga (78%), melanoma (57,7%), câncer de mama (53%), câncer de pulmão (51,9%), câncer de cólon (79%) bem como as malignidades da linhagem B. Em grande parte destes tumores, a expressão CD40, mostrou-se associada à maior sobrevivência; no entanto, os resultados contrários foram reportados nos cânceres de pulmão e esôfago, onde expressão elevada de CD40 correlacionou-se com prognóstico ruim. Curiosamente, em comparação ao tecido tumoral os tecidos normais apresentaram níveis muito baixos ou nenhuma expressão de CD40, ressaltando o potencial do CD40 como um alvo imunológico específico do câncer (Piechutta e Berghoff 2019).

Nos tumores hematológicos, o CD40 é amplamente expresso na superfície das células tumorais de linhagem linfóide B, e a sinalização desregulada do CD40 é sugerida como contribuinte da linfomagênese. A sinalização via CD40 constitutivo das células B induziu a

ativação seletiva e constitutiva da via NF- $\kappa$ B, da proteína c-Jun N-terminal cinases (JNKs) e cinases reguladas por sinal extracelular. Modelos murinos, com maior expressão da proteína LMP1/CD40, desenvolveram linfomas de células B, mostrando assim que a interação das vias de sinalização induzidas pela sinalização CD40 constitutiva é suficiente para iniciar um processo tumorigênico (Hojer et al. 2014).

Os plasmócitos anômalos do MM expressam CD40, enquanto as células T helper (Th) expressam o ligante CD40 (CD40L), e a medula óssea dos portadores de MM possuem níveis significativamente aumentados das células T helper (Wang et al. (2017).

Wang et al. (2017) descobriram que as células Th da MO autólogas ativadas permitia o crescimento de células MM de forma *in vitro* e dependente de CD40L. As células do MM secretavam quimiocinas que atraíam as células Th da MO, e a secreção foi aumentada pela estimulação via CD40. Em paralelo, as células Th se localizavam próximas às células do MM e contribuíam para a proliferação dos plasmócitos anômalos. Nos experimentos de cultura de MO em soro autólogo, com cerca de 14 dias, as células MM e células Th mutuamente estimulavam umas às outras, e as células MM exigiram células Th para maior expansão *in vitro*, nos camundongos. Em nosso estudo, os pacientes com MM apresentaram níveis reduzidos de leucócitos CD40<sup>+</sup> e linfócitos totais CD40<sup>+</sup> no sangue comparativamente aos controles. Possivelmente, a redução de CD40<sup>+</sup> foi devido aos níveis baixos de linfócitos B totais encontrados nos nossos pacientes.

Nossos achados estão em consonância com Wang et al. (2017) com níveis mais elevados de leucócitos CD40L<sup>+</sup> no sangue periférico dos pacientes com relação aos controles, porém quando avaliamos no ambiente medular dos pacientes, não conseguimos demonstrar diferenças significativas do CD40L entre os grupos nos pacientes com relação ao ISS ou evolução para óbito.

Categorizando de acordo com ISS, constatou-se que os pacientes com ISS 1 e 2, apresentavam níveis de expressão de CD40 em linfócitos, e de CD40L nos linfócitos T, superiores aos casos com ISS-3. É possível que, os pacientes com doença mais agressiva apresentassem um “esgotamento” de linfócitos T e, portanto, com expressão reduzida desta molécula coestimuladora, fundamental para a ativação da resposta T.

Tumores imunologicamente "frios" são hipo-responsivos às células T e imunoterapias, e alguns estudos iniciais demonstraram que anticorpos agonistas do CD40 promoveram aumento da resposta dos linfócitos T citotóxicos contra antígenos tumorais pouco antigênicos, promovendo uma efetiva resposta das células T (Moran et al. 2013). A combinação de um agonista de CD40 com quimioterapia, foi apresentado por Byrne e Vonderheide (2016) e

confirmaram a possibilidade de converter um tumor imunologicamente "frio" a um tumor com rico infiltrado de células T, com a expansão das células T clonais e com diminuição de células Treg causando a destruição tumoral com respostas imunes duradouras e sustentadas.

As respostas inatas e adaptativas do sistema imunológico são cuidadosamente orquestradas por reguladores solúveis e ligados à membrana, que estabelecem os efeitos mais eficientes para prevenir o desenvolvimento do câncer. As células tumorais, no entanto, também são capazes de induzir uma variedade de fatores solúveis que favorecem o recrutamento e têm um efeito imunossupressor pois ajuda as células tumorais a evitar respostas imunes hospedeiras. Acredita-se que as MDSCs e as Treg desempenham um papel crítico na geração desses fatores solúveis derivados do tumor.

Em relação ao mieloma múltiplo, Tsirakis et al. (2012), demonstraram em estudo do tipo caso controle, avaliando 56 pacientes que os níveis de sCD40L eram maiores nos casos comparativamente aos controles, e os níveis detectados pós tratamento em pacientes que apresentavam respostas completas ou parciais eram menores, sugerindo que os níveis de CD40/CD40L tinham relação com a angiogênese nos pacientes.

Achados semelhantes foram reportados por Kamińska et al. (2016), que encontraram níveis mais elevados de sCD40L sérico nos pacientes com MM do que em controles, assim como, correlação positiva com estados mais avançados de doença, nos quais as medianas sCD40L eram de 595 1592 e 1790 pg/ml nos estádios I, II e III de Durie Salmon respectivamente, e notou-se também que haviam diferenças estatisticamente significante entre esses estádios. Estes autores, verificaram correlação positiva entre os níveis de sCD40L com os níveis de IL-6 e seu receptor solúvel (sIL-6R), molécula de adesão celular vascular solúvel 1, do inglês *soluble vascular cell adhesion molecule 1* (sVCAM-1), fator de crescimento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), alguns marcadores de atividade do MM (DHL e percentual de células plasmocitárias em medula óssea) e  $\beta$ -tromboglobulina, indicando que os níveis séricos de sCD40L podem estar relacionados com a angiogênese aumentada nos pacientes com MM. Esta correlação entre os níveis de sCD40L e  $\beta$ -tromboglobulina sinalizam que os níveis de sCD40L nos pacientes com MM derivam de ativação plaquetária (Kamińska et al. 2016).

Nas análises dos níveis solúveis de sCD40L, em relação aos controles não conseguimos demonstrar diferenças estatisticamente significante entre os grupos em nossa amostra, mas a mediana era superior nos casos. É provável que uma amostragem maior pudesse ter encontrado resultados semelhantes aos de Tsirakis et al. (2012) e Kamińska et al. (2016).

Nas análises por estratificação de acordo com o ISS ou evolução para óbito, havia tendência de mediana inferior dos níveis séricos de sCD40L nos casos de ISS-3 ou naqueles que foram à óbito, opondo-se aos achados dos autores acima citados.

Nas análises da sobrevida dos pacientes com MM, utilizando-se como ponto de corte o nível de melhor acurácia medida pela curva ROC, os marcadores que teriam melhor associação com a chance de sobrevivência seriam os níveis percentuais de expressão de OX40  $\geq 2,93\%$  e de CD40L  $\geq 3,09\%$ , mensurados em leucócitos totais do sangue periférico ao diagnóstico.

Segundo Massarelli et al. (2019), a alta expressão do OX-40, mensurada por imunohistoquímica no infiltrado tumoral de pacientes com tumor de pulmão não pequenas células (NSCLC), está associada a prognóstico favorável e com melhor sobrevida global. Além disso, verificou-se que havia sobreposição entre células co-expressando o OX40 e PD-L1. Os níveis altos de expressão de OX-40 potencialmente identificariam um subgrupo único de NSCLC, que pode se beneficiar da co-estimulação com anticorpos agonistas OX-40 e potencialmente aumentar a eficácia das terapias de checkpoint imunológico existentes.

A imunoterapia contra o câncer é pelo menos desde 2011, quando da aprovação pelo FDA do uso do anti-CTLA-4 para os casos de melanoma, uma abordagem que revolucionou o tratamento oncológico. Foi demonstrado que um alto número de células T citotóxicas específicas do tumor (CTL) está associado ao aumento da sobrevida em pacientes com mieloma múltiplo. Xie et al. (2019), avaliaram a eficácia da lenalidomida em associação a vacinação Eps8cocktail-CTLs, verificando um estímulo efetivo na atividade antitumoral desta vacina com tendências crescentes de expressão para marcadores de células T (CD28, CD40L, 41BB e OX40). Em comparação com CTLs não estimulados e CTLs Eps8cocktail, as CTLs Eps8cocktail tratadas com lenalidomida apresentaram atividade anti-mieloma superior em modelos de MM humanizado, incluindo o atraso no crescimento da carga tumoral devido ao aumento da função imunológica.

Pacientes com níveis CD40L  $\geq 3,09\%$  em leucócitos, apresentaram melhor sobrevida e podemos supor, baseado nos achados de Xie et al. (2019), que esses casos apresentem um maior número de células TCD4<sup>+</sup> ativadas residuais, as quais até poderiam propiciar e ajudar no crescimento tumoral das células do MM a nível medular, mas conservariam sua capacidade imunológica. Adicionalmente, as células T expressando CD40L podem fornecer sinais para linfócitos B, induzindo a proliferação, *switching* de classe imunoglobulina, secreção de anticorpos, resgate da capacidade de apoptose da célula B, além de um papel no desenvolvimento de centros germinais e na sobrevivência das células B da memória. Estes

fatos, justificariam e colaborariam para que os casos com maior expressão de CD40L apresentem melhor desfecho clínico e serviria como marcador prognóstico.

A escassez de dados na literatura encontrada até o presente momento sobre o perfil de coestimuladores da resposta imune em tumores hematológicos, somada ao fato de que diferentemente dos tumores sólidos, o ambiente e as células tumorais, envolvem o próprio sistema imune, torna o MM particularmente interessante e desafiador, e dificulta a comparação entre nossos dados e outros estudos. Além do que, resultados opostos ou contraditórios podem ser encontrados já que não há ainda uma padronização na forma de avaliar esses marcadores e, portanto, os resultados controversos poderiam ser decorrentes de tal fato. Apesar disso, os resultados deste estudo mostram possíveis novos alvos terapêuticos para tratamento do MM. Espera-se que a continuidade desta linha de pesquisa, com a ampliação dos números de amostras e marcadores, possa esclarecer e fortalecer os resultados aqui obtidos.



CONCLUSÃO

---

## 6 CONCLUSÃO

Com os resultados desse estudo, conclui-se:

- Os valores percentuais de expressão de linfócitos B (CD20<sup>+</sup>) e das moléculas coestimuladoras (OX40, CD40/CD40L) no sangue são diferentes entre os pacientes e controles;
- A presença do mieloma múltiplo não promoveu mudança dos níveis quantitativos de linfócitos T no sangue dos pacientes, pois não apresentaram diferença dos níveis dessas populações celulares com relação ao grupo controle;
- Os pacientes apresentaram níveis reduzidos s4-1BB e sOX40 com relação aos controles, mas não foram capazes de predizer maior risco para progressão a óbito ou alguma relação com o ISS;
- Baixos níveis de leucócitos CD40L<sup>+</sup> e linfócitos totais CD40<sup>+</sup> no sangue periférico e elevados de linfócitos T OX40<sup>+</sup> na medula óssea encontrados no grupo ISS3 foram relacionados a progressão da doença;
- Baixos níveis de leucócitos totais de OX40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> encontrados no sangue de pacientes que evoluíram para o óbito mostraram ser importantes na predição de desfecho desfavorável;
- Os níveis de leucócitos totais OX40<sup>+</sup> e CD40L<sup>+</sup> definidos a partir do ponto de corte mostraram associação com sobrevida global;
- As análises de sangue periférico e medula óssea não demonstram correlação suficiente entre os níveis de expressão das moléculas estudadas para que seja possível inferir que os resultados sejam equiparáveis entre as amostras de sangue periférico em substituição à medula óssea;
- Foi possível determinar os níveis de coestimuladores da resposta imune no sangue periférico dos pacientes, sendo a forma de coleta menos invasiva para o paciente quando comparada a coleta de medula óssea.





# REFERÊNCIAS

---

## 7 REFERÊNCIAS

Ara A, Ahmed KA, Xiang J. Multiple effects of CD40-CD40L axis in immunity against infection and cancer. *Immunotargets Ther.* 2018 Jun 28;7:55-61.

Aspeslagh S, Postel-Vinay S, Rusakiewicz S, Soria JC, Zitvogel L, Marabelle A. Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. *Eur J Cancer.* 2016 Jan;52:50-66.

Azar RR, Kassab R, Zoghbi A, Aboujaoudé S, El-Osta H, Ghorra P, et al. Effects of clopidogrel on soluble CD40 ligand and on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J.* 2006 Feb;151(2):521.e1-521.e4.

Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:881-922.

Bartkowiak T, Curran MA. 4-1BB agonists: multi-potent potentiators of tumor immunity. *Front Oncol.* 2015 Jun 8;5:117.

Berenson JR, Anderson KC, Audell RA, Boccia RV, Coleman M, Dimopoulos MA, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: a consensus statement. *Br J Haematol.* 2010 Jul;150(1):28-38.

Bergmann S, Pandolfi PP. Giving blood: a new role for CD40 in tumorigenesis. *J Exp Med.* 2006 Oct 30;203(11):2409-12.

Bianchi G, Anderson KC. Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back. *CA Cancer J Clin.* 2014 Nov-Dec;64(6):422-44.

Bianchi G, Richardson PG, Anderson KC. Best treatment strategies in high-risk multiple myeloma: navigating a gray area. *J Clin Oncol.* 2014 Jul 10;32(20):2125-32.

Binsfeld M, Fostier K, Muller J, Baron F, Schots R, Beguin Y, et al. Cellular immunotherapy in multiple myeloma: lessons from preclinical models. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Dec;1846(2):392-404.

Braga WM, da Silva BR, de Carvalho AC, Maekawa YH, Bortoluzzo AB, Rizzatti EG, et al. FOXP3 and CTLA4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4(+) T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2014 Nov;63(11):1189-97.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 708, de 6 de agosto 2015: Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Mieloma Múltiplo. *Imprensa Nacional Diário Oficial da União, Brasília (DF) 2015 07 ago.; Sec.1:150.*

Braunstein M, Diefenbach C. The emerging role of upfront monoclonal antibodies for multiple myeloma [abstract]. *J Clin Oncol* 2019; 37(15 suppl). (Presented at 55<sup>th</sup> Annual Meeting, 31 de maio a 05 de junho de 2019, Chicago, Illinois-USA]

Brimnes MK, Vangsted AJ, Knudsen LM, Gimsing P, Gang AO, Johnsen HE, et al. Increased level of both CD4+FOXP3+ regulatory T cells and CD14+HLA-DR<sup>-</sup>/low myeloid-derived suppressor cells and decreased level of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Scand J Immunol*. 2010 Dec;72(6):540-7.

Buchan SL, Rogel A, Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood*. 2018 Jan 4;131(1):39-48.

Byrne KT, Vonderheide RH. CD40 Stimulation Obviates Innate Sensors and Drives T Cell Immunity in Cancer. *Cell Rep*. 2016 Jun 21;15(12):2719-32.

Callera F, Brasil AA, Casali AR, Mulin CC, Rosa ES, Barbosa Mde A, et al. Oncohematological diseases in the Vale do Paraíba, State of São Paulo: demographic aspects, prevalences and incidences. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2011;33(2):120-5.

Campana D, Schwarz H, Imai C. 4-1BB chimeric antigen receptors. *Cancer J*. 2014 Mar-Apr;20(2):134-40.

Chawla SS, Kumar SK, Dispenzieri A, Greenberg AJ, Larson DR, Kyle RA, et al. Clinical course and prognosis of non-secretory multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2015 Jul;95(1):57-64.

Cheuk AT, Mufti GJ, Guinn BA. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 2004 Mar;11(3):215-26.

Corrêa Netto NF. Epidemiologia do mieloma múltiplo e distúrbios relacionados no Brasil. 29 de março de 2019. Disponível em: <https://bit.ly/36XOwWf>. [2020 nov 15].

Curti BD, Kovacsovics-Bankowski M, Morris N, Walker E, Chisholm L, Floyd K, et al. OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. *Cancer Res.* 2013 Dec 15;73(24):7189-7198.

D'Agostino M, Bertamini L, Oliva S, Boccadoro M, Gay F. Pursuing a curative approach in multiple myeloma: a review of new therapeutic strategies. *Cancers (Basel).* 2019 Dec 13;11(12):2015.

Danese S, Sans M, Fiocchi C. The CD40/CD40L costimulatory pathway in inflammatory bowel disease. *Gut.* 2004 Jul;53(7):1035-43.

Deng J, Zhao S, Zhang X, Jia K, Wang H, Zhou C, et al. OX40 (CD134) and OX40 ligand, important immune checkpoints in cancer. *Onco Targets Ther.* 2019 Sep 6;12:7347-7353.

Dimopoulos MA, Terpos E, Niesvizky R, Palumbo A. Clinical characteristics of patients with relapsed multiple myeloma. *Cancer Treat Rev.* 2015 Dec;41(10):827-35.

Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer.* 1975 Sep;36(3):842-54.

Fanslow WC, Srinivasan S, Paxton R, Gibson MG, Spriggs MK, Armitage RJ. Structural characteristics of CD40 ligand that determine biological function. *Semin Immunol.* 1994 Oct;6(5):267-78.

Frassanito MA, Ruggieri S, Desantis V, Di Marzo L, Leone P, Racanelli V, et al. Myeloma cells act as tolerogenic antigen-presenting cells and induce regulatory T cells in vitro. *Eur J Haematol.* 2015 Jul;95(1):65-74.

- Fu Y, Lin Q, Zhang Z, Zhang L. Therapeutic strategies for the costimulatory molecule OX40 in T-cell-mediated immunity. *Acta Pharm Sin B*. 2020 Mar;10(3):414-33.
- Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 May 20;23(15):3412-20. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):6281. Harousseau, Jean-Luc [corrected to Avet-Loiseau, Herve].
- Goldschmidt H, Ashcroft J, Szabo Z, Garderet L. Navigating the treatment landscape in multiple myeloma: which combinations to use and when? *Ann Hematol*. 2019 Jan;98(1):1-18.
- Hoyer C, Frankenberger S, Strobl LJ, Feicht S, Djermanovic K, Jagdhuber F, et al. B-cell expansion and lymphomagenesis induced by chronic CD40 signaling is strictly dependent on CD19. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4318-28.
- Hoyos V, Borrello I. The immunotherapy era of myeloma: monoclonal antibodies, vaccines, and adoptive T-cell therapies. *Blood*. 2016 Sep 29;128(13):1679-87.
- Hsieh RW, Go RS, Abeykoon JP, Kapoor P, Kumar SK, Gertz MA, et al. Characteristics of long-term survivors with multiple myeloma: A National Cancer Data Base analysis. *Cancer*. 2019 Oct 15;125(20):3574-81.
- Huang J, Jochems C, Talaie T, Anderson A, Jales A, Tsang KY, et al. Elevated serum soluble CD40 ligand in cancer patients may play an immunosuppressive role. *Blood*. 2012 Oct 11;120(15):3030-8.
- Hungria, VT. Doença óssea em mieloma múltiplo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(1):60-6
- Hungria VT, Maiolino A, Martinez G, Colleoni GW, Coelho EO, Rocha L, et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. *Haematologica*. 2008 May;93(5):791-2.
- Kamińska J, Koper OM, Dymicka-Piekarska V, Motybel-Iwańczuk E, Ołdziej A, Kemonia H. Serum soluble CD40L concentration depending on the stage of multiple myeloma and its correlation with selected angiogenic cytokines. *Pol Arch Med Wewn*. 2016 May 31;126(5):321-9.

Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: a unique malignancy. *Semin Oncol.* 2016 Dec;43(6):676-681.

Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood.* 2012 Aug 2;120(5):1067-76.

Kienzle G, von Kempis J. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol.* 2000 Jan;12(1):73-82.

Kim BS, Kim JY, Kim EJ, Lee JG, Joo DJ, Huh KH, Kim MS, Kim YS. Role of Thalidomide on the Expression of OX40, 4-1BB, and GITR in T Cell Subsets. *Transplant Proc.* 2016 May;48(4):1270-4.

Kim EJ, Lee JG, Kim JY, Song SH, Joo DJ, Huh KH, et al. Enhanced immune-modulatory effects of thalidomide and dexamethasone co-treatment on T cell subsets. *Immunology.* 2017 Dec;152(4):628-37.

Korniluk A, Kemonia H, Dymicka-Piekarska V. Multifunctional CD40L: pro-and-anti-neoplastic activity. *Tumour Biol.* 2014 Oct;35(10):9447-57.

Kumar S, Fonseca R, Ketterling RP, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, et al. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood.* 2012 Mar 1;119(9):2100-5. Erratum in: *Blood.* 2014 Mar 6;123(10):1621.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003 Jan;78(1):21-33.

Kyle RA, San-Miguel JF, Mateos MV, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014 Oct;28(5):775-90.

Landgren O, Graubard BI, Katzmann JA, Kyle RA, Ahmadizadeh I, Clark R, et al. Racial disparities in the prevalence of monoclonal gammopathies: a population-based study of 12,482 persons from the National Health and Nutritional Examination Survey. *Leukemia.* 2014 Jul;28(7):1537-42.

Lederman S, Yellin MJ, Krichevsky A, Belko J, Lee JJ, Chess L. Identification of a novel surface protein on activated CD4+ T cells that induces contact-dependent B cell differentiation (help). *J Exp Med*. 1992 Apr 1;175(4):1091-101.

Lee SH, Erber WN, Porwit A, Tomonaga M, Peterson LC; International Council for Standardization In Hematology. ICSH guidelines for the standardization of bone marrow specimens and reports. *Int J Lab Hematol*. 2008 Oct;30(5):349-64.

Leshner A, Song WC. New complement regulator exposed. *Blood*. 2009 Sep 17;114(12):2363-4.

Lima PMA, Torres LC, Martins MR, da Matta MC, Lima JTO, de Mello MJG, et al. Soluble levels of sCD40L and s4-1BB are associated with a poor prognosis in elderly patients with colorectal cancer. *J Surg Oncol*. 2020 Apr;121(5):901-905.

Linch SN, McNamara MJ, Redmond WL. OX40 Agonists and Combination Immunotherapy: Putting the Pedal to the Metal. *Front Oncol*. 2015 Feb 16;5:34.

Maecker B, Anderson KS, von Bergwelt-Baildon MS, Weller E, Vonderheide RH, Richardson PG, et al. Viral antigen-specific CD8+ T-cell responses are impaired in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(6):842-8.

Malek E, de Lima M, Letterio JJ, Kim BG, Finke JH, Driscoll JJ, et al. Myeloid-derived suppressor cells: the green light for myeloma immune escape. *Blood Rev*. 2016 Sep;30(5):341-8.

Maly K, Schirmer M. The story of CD4+ CD28- T cells revisited: solved or still ongoing? *J Immunol Res*. 2015: 348746.

Mariani S, Muraro M, Pantaleoni F, Fiore F, Nuschak B, Peola S, et al. Effector gammadelta T cells and tumor cells as immune targets of zoledronic acid in multiple myeloma. *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):664-70.

Martins MR, Santos RLD, Jatahy KDN, Matta MCD, Batista TP, Júnior JIC, et al. Could OX40 agonist antibody promote activation of the anti-tumor immune response in gastric cancer? *J Surg Oncol*. 2018 Apr;117(5):840-844.

- Massarelli E, Lam VK, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Behrens C, Diao L, et al. High OX-40 expression in the tumor immune infiltrate is a favorable prognostic factor of overall survival in non-small cell lung cancer. *J Immunother Cancer*. 2019 Dec 16;7(1):351.
- Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, Rowland JH, Yabroff KR, Alfano CM, et al. Cancer treatment and survivorship statistics 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019 Sep;69(5):363-385.
- Mills KH, Cawley JC. Abnormal monoclonal antibody-defined helper/suppressor T-cell subpopulations in multiple myeloma: relationship to treatment and clinical stage. *Br J Haematol*. 1983 Feb;53(2):271-5.
- Moran AE, Kovacsovics-Bankowski M, Weinberg AD. The TNFRs OX40, 4-1BB, and CD40 as targets for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2013 Apr;25(2):230-7.
- Moreau P. How I treat myeloma with new agents. *Blood*. 2017 Sep 28;130(13):1507-13.
- Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017 Jul 1;28(suppl\_4):iv52-iv61.
- Moss P, Gillespie G, Frodsham P, Bell J, Reyburn H. Clonal populations of CD4+ and CD8+ T cells in patients with multiple myeloma and paraproteinemia. *Blood*. 1996 Apr 15;87(8):3297-306.
- Nandakumar B, Binder M, Dispenzieri A, Kapoor P, Buadi F, Gertz M, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma (MM) including high-risk patients. *J Clin Oncol*. 2019 May; 37(15):8039.
- Ogawara H, Handa H, Yamazaki T, Toda T, Yoshida K, Nishimoto N, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. *Leuk Res*. 2005 Feb;29(2):135-40.
- Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2011 Mar 17;364(11):1046-60.
- Palumbo A, Bringhen S, Ludwig H, Dimopoulos MA, Bladé J, Mateos MV, et al. Personalized therapy in multiple myeloma according to patient age and vulnerability: a report of the European Myeloma Network (EMN). *Blood*. 2011 Oct 27;118(17):4519-29.



Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised international staging system for multiple myeloma: a report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol*. 2015 Sep 10;33(26):2863-9.

Pan PY, Ma G, Weber KJ, Ozao-Choy J, Wang G, Yin B, et al. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res*. 2010;70(1):99-108.

Pérez-Andres M, Almeida J, Martin-Ayuso M, Moro MJ, Martin-Núñez G, Galende J, et al. Characterization of bone marrow T cells in monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and plasma cell leukemia demonstrates increased infiltration by cytotoxic/Th1 T cells demonstrating a skewed TCR-Vbeta repertoire. *Cancer*. 2006 Mar 15;106(6):1296-305.

Pessoa de Magalhães RJ, Vidriales MB, Paiva B, Fernandez-Gimenez C, García-Sanz R, Mateos MV, et al. Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*. 2013 Jan;98(1):79-86.

Piechutta M, Berghoff AS. New emerging targets in cancer immunotherapy: the role of Cluster of Differentiation 40 (CD40/TNFR5). *ESMO Open*. 2019 Jun 12;4(Suppl 3):e000510.

Pratt G, Morris TC. Review of the NICE guidelines for multiple myeloma. *Int J Lab Hematol*. 2017 Feb;39(1):3-13.

Raitakari M, Brown RD, Gibson J, Joshua DE. T cells in myeloma. *Hematol Oncol*. 2003 Mar;21(1):33-42.

Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov;15(12):e538-48.

Rajkumar SV, Kumar S. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2016 Jan;91(1):101-19.

Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2020 May;95(5):548-567.

Rawstron AC, Davies FE, Owen RG, English A, Pratt G, Child JA, et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. *Br J Haematol*. 1998 Jan;100(1):176-83.

Rodríguez-Otero P, Paiva B, Engelhardt M, Prósper F, San Miguel JF. Is immunotherapy here to stay in multiple myeloma? *Haematologica*. 2017 Mar;102(3):423-432.

Rutella S, Locatelli F. Targeting multiple-myeloma-induced immune dysfunction to improve immunotherapy outcomes. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:196063.

Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, et al. Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. *J Immunol*. 2001 Oct 1;167(7):4059-66.

Santilli F, Davì G, Consoli A, Cipollone F, Mezzetti A, Falco A, et al. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Jan 17;47(2):391-7.

Sawada R, Arai Y, Sagawa Y, Nagata Y, Nishimura T, Noguchi M, et al. High blood levels of soluble OX40 (CD134), an immune costimulatory molecule, indicate reduced survival in patients with advanced colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2019 Nov;42(5):2057-64.

Schwarz H, Valbracht J, Tuckwell J, von Kempis J, Lotz M. ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):1043-52.

Serrano-Del Valle A, Anel A, Naval J, Marzo I. Immunogenic cell death and immunotherapy of multiple myeloma. *Front Cell Dev Biol*. 2019 Apr 16;7:50.

Short KD, Rajkumar SV, Larson D, Buadi F, Hayman S, Dispenzieri A, et al. Incidence of extramedullary disease in patients with multiple myeloma in the era of novel therapy, and the activity of pomalidomide on extramedullary myeloma. *Leukemia*. 2011 Jun;25(6):906-8.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2020. *CA Cancer J Clin*. 2020 Jan;70(1):7-30.

So T, Lee SW, Croft M. Immune regulation and control of regulatory T cells by OX40 and 4-1BB. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Jun-Aug;19(3-4):253-62.

Sørrig R, Klausen TW, Salomo M, Vangsted AJ, Frølund UC, Andersen KT, et al. Immunoparesis in newly diagnosed multiple myeloma patients: effects on overall survival and progression free survival in the Danish population. *PLoS One.* 2017 Dec 7;12(12):e0188988.

Stifter S, Babarović E, Valković T, Seili-Bekafigo I, Stemberger C, Nacinović A, et al. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagn Pathol.* 2010 May 18;5:30.

Sturgill ER, Redmond WL. TNFR agonists: a review of current biologics targeting OX40, 4-1BB, CD27, and GITR. *AJHO.* 2017;13(11):4-15

Swallow MM, Wallin JJ, Sha WC. B7h, a novel costimulatory homolog of B7.1 and B7.2, is induced by TNFalpha. *Immunity.* 1999 Oct;11(4):423-32.

Swan D, Lynch K, Gurney M, O'Dwyer M. Current and emerging immunotherapeutic approaches to the treatment of multiple myeloma. *Ther Adv Hematol.* 2019 Jun 18;10:2040620719854171.

Tanaka Y, Takahashi Y, Tanaka R, Miyagi T, Saito M, Fukushima T. Association of high levels of plasma OX40 with acute adult T-cell leukemia. *Int J Hematol.* 2019 Mar;109(3):319-27.

Tessier H, Rose D. Calcium Ion concentration in milk. *J Dairy Sci.* 1958;41(3):351-9.

Todaro J, Bigonha J, Borducchi DM, Matos LL, Trufelli DC, Sales SM, et al. Multiple myeloma: five-year experience at a University Hospital. *Einstein (Sao Paulo).* 2011 Jun;9(2):145-50.

Touzeau C, Moreau P. How I treat extramedullary myeloma. *Blood.* 2016 Feb 25;127(8):971-6.

Tsirakis G, Pappa CA, Psarakis FE, Fragioudaki M, Tsioutis C, Stavroulaki E, et al. Serum concentrations and clinical significance of soluble CD40 ligand in patients with multiple myeloma. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(4):2396-401.

- Varettoni M, Corso A, Pica G, Mangiacavalli S, Pascutto C, Lazzarino M. Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients. *Ann Oncol.* 2010 Feb;21(2):325-30.
- Vinay DS, Kwon BS. 4-1BB signaling beyond T cells. *Cell Mol Immunol.* 2011 Jul;8(4):281-4.
- Vinay DS, Kwon BS. Immunotherapy of cancer with 4-1BB. *Mol Cancer Ther.* 2012 May;11(5):1062-70.
- Wang D, Fløisand Y, Myklebust CV, Bürgler S, Parente-Ribes A, Hofgaard PO, et al. Autologous bone marrow Th cells can support multiple myeloma cell proliferation in vitro and in xenografted mice. *Leukemia.* 2017 Oct;31(10):2114-21.
- Wang JN, Cao XX, Zhao AL, Cai H, Wang X, Li J. Increased activated regulatory T cell subsets and aging Treg-like cells in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case control study. *Cancer Cell Int.* 2018 Nov 19;18:187.
- Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, Otsuji M, Shin T, Flies DB, et al. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol.* 2002 May 1;168(9):4262-7.
- Willan J, Eyre TA, Sharpley F, Watson C, King AJ, Ramasamy K. Multiple myeloma in the very elderly patient: challenges and solutions. *Clin Interv Aging.* 2016 Apr 15;11:423-35.
- Willrich MA, Katzmann JA. Laboratory testing requirements for diagnosis and follow-up of multiple myeloma and related plasma cell dyscrasias. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Jun 1;54(6):907-19.
- Xia J, Wang L, Zhou X, Wang J, Wang H, Guo H. Early mortality in elderly patients undergoing treatment for multiple myeloma in real-world practice. *J Int Med Res.* 2018 Jun;46(6):2230-7.
- Xie X, Chen Y, Hu Y, He Y, Zhang H, Li Y. Lenalidomide Augments the Antitumor Activities of Eps8 Peptide-Specific Cytotoxic T Lymphocytes against Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2019 Dec;18(12):2258-69.

Zhang B, Zhang Y, Niu L, Vella AT, Mittler RS. Dendritic cells and Stat3 are essential for CD137-induced CD8 T cell activation-induced cell death. *J Immunol.* 2010a May 1;184(9):4770-8.

Zhang X, Voskens CJ, Sallin M, Maniar A, Montes CL, Zhang Y, et al. CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. *J Immunol.* 2010b Jan 15;184(2):787-95.



# APÊNDICES E ANEXOS

---

**Apêndice 1 – Formulário de pesquisa para coleta de dados clínicos, laboratoriais e informações sobre exames de imagem**

**FICHA CLÍNICA DE PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO**

*Projeto: Estudo da expressão das moléculas coestimuladoras OX40, 4-1BB e CD40 no mieloma múltiplo.*

Nome completo: \_\_\_\_\_

Idade ao diagnóstico: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Sexo: \_\_\_\_ [1=masculino 2= feminino] Raça: \_\_\_\_ [Legenda: 1=branca; 2=negra; 3=parda; 4= asiático; 5=indígena]

Faixa etária: \_\_\_\_ [Legenda: 1=20 a 30; 2= 31-40; 3=41-50; 4=51-60; 5=61-70; 6=71-80; 7=acima de 81 anos]

Hospital de origem: \_\_\_\_\_ [Legenda: 1-HCP; 2=HEMOPE; 3=HUOC; 4= IMIP; 5= outros]

Tempo do início dos sintomas até a primeira consulta com especialista: \_\_\_\_\_ (em meses)

Data de entrada: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Data do diagnóstico: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Início do tratamento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Fim do tratamento: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Estadiamento Durie-Salmon: \_\_\_\_\_ ISS: \_\_\_\_\_

Protocolo de tratamento utilizado: 1ª linha: \_\_\_\_\_ 2ª linha: \_\_\_\_\_ 3ª linha: \_\_\_\_\_

[Legenda: 1= MPT; 2= CTD; 3= CYBORD; 4=M/Dexa/Tal; 5= DEXA ISOLADA; 6=PAD; 7= Tal/Dexa; 8= MP; 9=OUTROS]

Data da resposta: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_ Resposta (IMWG): \_\_\_\_\_ [Legenda: 1= RC- resposta completa 2= RPMB-Resposta parcial muito boa 3= RP-resposta parcial 4=DE- doença estável 5=DP-doença progressiva]

**Manifestações clínicas ao diagnóstico**

	SIM	NÃO
-Alteração da função renal		
-Hipercalcemia		
-Anemia		
-Trombocitemia		
-Leucopenia		
-Dor óssea		
-Infecções de repetição		
-Fratura patológica		
-Plasmocitoma		
-Fraqueza		
-Febre		
-Perda de peso		
-Sangramento		
-Outras		

Escala de lesões ósseas ao raio X: \_\_\_\_ [Legenda: 1= osso normal; 2= osteopenia/osteoporose; 3= lesões osteolíticas; 4= fraturas patológicas]

Ressonância OU tomografias: \_\_\_\_ [Legenda: 1= positivo – presença de lesões líticas ou plasmocitomas 2= ausência 3= não realizada]

Ecocardiograma: \_\_\_\_\_ [Legenda: 1= amiloidose sim 2= amiloidose não 3= não realizado]

Insuficiência renal dialítica: \_\_\_\_\_ [Legenda: 1= sim 2= não]

**Exames laboratoriais**

Exames	pré tratamento Data: ___/___/___	Pós tratamento: reavaliação Data: ___/___/___
Glicose		
Ureia (g/dl)		
Creatinina (g/dl)		
Cálcio (g/dl)		
Proteínas totais		
Albumina (g/dl)		
Globulina		
Desidrogenase láctica (DHL)		
VHS		
Eletroforese proteínas séricas		
Fração albumina (g/dl)		
Fração alfa 1-globulina (g/dl)		
Fração alfa 2- globulina (g/dl)		
Fração beta-globulina (g/dl)		
Fração gama- globulina (g/dl)		
IgG (g/dl)		
IgM (g/dl)		
IgA (g/dl)		
Kappa		
Lambda		
Beta 2 microglobulina (mg/L)		
Imunofixação sérica		
TP (tempo de protrombina) /INR		
TTPa (tempo de tromboplastina		
fibrinogênio		
Hemoglobina (g/dl)		
Hematócrito (%)		
Leucócitos /ml		
Segmentados (%) e absoluto		
Linfócitos (%) e absoluto		
Monócitos (%) e absoluto		
Eosinófilos (%) e absoluto		
Plaquetas (unid/mm <sup>3</sup> )		
Número de plasmócitos no mielograma		
Bence Jones na urina (g/24hs)		
Imunofixação urinária		



## **Apêndice 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – paciente**

**Título: “Estudo da expressão das moléculas coestimuladoras OX40, 4-1BB e CD40 no mieloma múltiplo.”**

### **1) Introdução**

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa, o qual será realizado em parceria com outras instituições. Antes de você decidir se deseja ou não participar, é importante que você entenda por que o estudo está sendo realizado e o que ele envolverá se você concordar em participar. Por favor, leia atentamente as informações a seguir e sinta-se à vontade em perguntar.

### **2) Quais os objetivos deste estudo**

O projeto possui três objetivos principais:

- 1) Avaliar a expressão de moléculas do sistema imunológico em amostras do sangue e da medula óssea, dos pacientes com mieloma múltiplo pré e pós tratamento.
- 2) Revisão de lâminas e blocos de parafina de biópsias de medula óssea e realização de imunohistoquímica e revisão morfológica por um patologista com experiência em patologia hematológica, para avaliar células e marcadores que tentam definir o comportamento do mieloma múltiplo
- 3) Correlacionar com os aspectos clínicos, laboratoriais, bem como os tratamentos instituídos para o mieloma múltiplo, obtidos através de um questionário médico com informações que serão pesquisadas e retiradas do seu prontuário.

Os dados coletados nesta pesquisa referentes às entrevistas ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal e na Instituição Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP), sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientador, no endereço abaixo informado por período de no mínimo 5 anos.

As amostras de biópsias, lâminas e blocos de parafina (sobras do material utilizado para o diagnóstico) serão enviadas para o Hospital A. C. Carmargo em São Paulo, para a revisão do caso. O excedente será devolvido para ser arquivado no setor de Patologia do HCP.

Não haverá informação que o identifique e apenas os médicos participantes do estudo terão acesso aos seus dados. Os exames laboratoriais que serão anotados pela pesquisa, serão consultados no seu prontuário médico e são os mesmos realizados de rotina pelo seu médico.

### **3) Riscos e benefícios dos procedimentos para as coletas dos exames**

Serão coletados 20 ml de sangue (5 tubos) no momento da aceitação da participação no estudo e mais 5 ml de amostra de medula óssea, pelo médico que estiver realizando o seu exame mielograma. Sempre que possível, coletaremos as amostras de sangue no mesmo momento de coleta de exames laboratoriais de rotina pelo laboratório da instituição.

Estas coletas são seguras e apresentam baixos riscos, somente dor leve no momento da punção. Caso ocorram sangramentos no local da coleta, será orientado que o senhor(a) comprima com o dedo o local da coleta por 5 minutos que o sangramento cederá, podendo ainda ser feito compressa com gelo no local. Além disto, caso haja a formação de um pequeno hematoma, não é necessária nenhuma medida específica pois o mesmo desaparecerá dentro de no máximo 7 dias.

O exame de mielograma, também é um exame seguro e já faz parte de seus exames obrigatórios para diagnóstico e seguimento do mieloma múltiplo. A biópsia de medula óssea, será realizada conforme protocolo da instituição e será sempre coletada por um médico hematologista. De todos é o procedimento de maior risco, podendo causar dor no momento da coleta, sangramento leve e raramente, infecções. Qualquer anormalidade deverá ser comunicada imediatamente ao médico assistente que o acompanhe.

É importante frisar que todos os testes realizados já fazem parte da rotina de investigação e seguimento de sua doença e apenas coletaremos uma amostra um pouco maior para o estudo.

É provável que as informações advindas do estudo, não tragam um benefício direto ao seu tratamento, uma vez que se trata de estudo experimental e não haverá qualquer intervenção terapêutica pelo estudo.

#### **4) Direitos do Participante**

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se o assim preferir, sem penalização ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação. Ao assinar este termo você não abre mão de nenhum direito legal.

#### **5) Confidencialidade**

Apenas a equipe do estudo terá acesso aos seus dados. Seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida Cruz Cabugá 1597 – Santo Amaro, Recife-PE, CEP: 50.040-000, Tel.: (81) 32178197 – e-mail: [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br)** ). Horário de funcionamento – segunda a sexta-feira das 8-16 horas.

Para qualquer dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato com os médicos responsáveis pela condução do estudo (Reijane Assis– telefones (11) 3217-8014 ou 3217-8202 ou pelo email: [reijaneassis@gmail.com](mailto:reijaneassis@gmail.com)

**Assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar deste estudo como voluntário (a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

**Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritivos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.**

Ao assinar este termo de consentimento, não abrirei mão dos meus direitos legais.

Receberei uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Impressão Digital  
(opcional)

\_\_\_\_\_  
**Nome Completo do Paciente de Pesquisa**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do Paciente de Pesquisa**

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
**Data**

\_\_\_\_\_  
Nome Representante Legal e relação do Representante Legal com o paciente

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Representante Legal

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
**Data**

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo de Consentimento

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
**Data**

### **Apêndice 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Controles**

**Título: “Estudo da expressão das moléculas coestimuladoras OX40, 4-1BB e CD40 no mieloma múltiplo.”**

#### **1) Introdução**

Você está sendo convidado (a) para participar como voluntário do projeto de pesquisa, o qual será realizado em parceria com outras instituições. Antes de você decidir se deseja ou não participar, é importante que você entenda por que o estudo está sendo realizado e o que ele envolverá se você concordar em participar. Por favor, leia atentamente as informações a seguir e sinta-se à vontade em perguntar.

#### **2) Quais os objetivos deste estudo?**

1. Avaliar a expressão de moléculas do sistema imunológico em amostras do sangue de voluntários saudáveis e comparar com os níveis encontrados no sangue de pacientes com Mieloma Múltiplo.

Os dados coletados nesta pesquisa referentes às entrevistas ficarão armazenados em pastas de arquivo no computador pessoal e na Instituição Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP), sob a responsabilidade da pesquisadora e do orientador, no endereço abaixo informado por período de no mínimo 5 anos.

As amostras de sangue serão analisadas em conjunto com a dos pacientes e não haverá informação que o identifique e apenas os médicos participantes do estudo terão acesso aos seus dados.

#### **1) Riscos e benefícios dos procedimentos para as coletas dos exames**

Serão coletados 20 ml de sangue (5 tubos) no momento da aceitação da participação no estudo. Estas coletas são seguras e apresentam baixos riscos, somente dor leve no momento da punção. Caso ocorram sangramentos no local da coleta, será orientado que o senhor(a) comprima com o dedo o local da coleta por 5 minutos que o sangramento cederá, podendo ainda ser feito compressa com gelo no local. Além disto, caso haja a formação de um pequeno hematoma, não é necessária nenhuma medida específica pois o mesmo desaparecerá dentro de no máximo 7 dias.

#### **2) Direitos do Participante**

Sua participação é voluntária e você pode retirar seu consentimento ou ainda descontinuar sua participação em qualquer momento, se assim preferir, sem penalização ou prejuízo de qualquer natureza. Não haverá nenhum custo a você proveniente deste estudo, assim como não haverá qualquer tipo de remuneração pela sua participação.

#### **3) Confidencialidade**

Apenas a equipe do estudo terá acesso aos seus dados. Seu anonimato é garantido e possíveis publicações científicas resultantes deste estudo não o (a) identificará em nenhuma circunstância como participante. Os dados obtidos serão tratados sob estritas condições de confidencialidade.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (**Avenida Cruz Cabugá 1597 – Santo Amaro, Recife-PE, CEP: 50.040-000, Tel.: (81) 32178197 – e-mail: [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br)** ).  
Horário de funcionamento – segunda a sexta-feira das 8-16 horas.

Para qualquer dúvida relacionada ao estudo, por favor, sinta-se à vontade para entrar em contato com os médicos responsáveis pela condução do estudo (Reijane Assis– telefones (11) 3217-8014 ou 3217-8202 ou pelo email: [reijaneaassis@gmail.com](mailto:reijaneaassis@gmail.com)).

#### **Assinaturas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF: \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com a pesquisadora responsável, concordo em participar deste estudo como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Concordo que os dados coletados para o estudo serão usados para os fins descritivos acima, e que serão mantidos sob sigilo e confidencialidade.

Ao assinar este termo de consentimento, não estarei abrindo mão dos meus direitos legais.

Receberei uma cópia assinada e datada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

\_\_\_\_\_  
Nome Completo do Controle Voluntário da Pesquisa

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente de Pesquisa

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Responsável pela Obtenção do Termo de Consentimento

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

**Apêndice 4** - Imagem ilustrativa de alta expressão de CD20<sup>HIGH</sup> nos pacientes comparado aos controles

Nos pacientes notou-se a ocorrência de níveis mais elevados de expressão de CD20 de alto padrão de fluorescência (acima de  $10^4$ ), denominado CD20<sup>high</sup> que não era visualizados nos controles, como mostra a Figura 15, sendo exemplificado 4 casos e 4 controles.

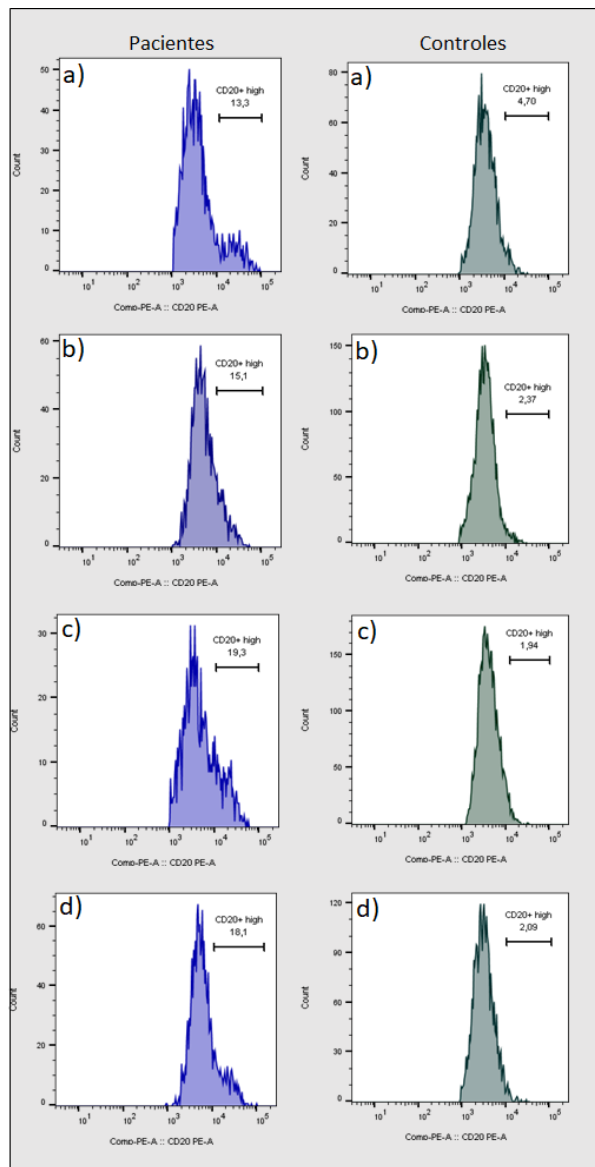


Figura dos histogramas mostram os valores percentuais de expressão de CD20<sup>high</sup> dos pacientes (à esquerda), nitidamente mais elevados que os dos controles (à direita).

**Anexo 1 - Estadiamento de Durie-Salmon**

Estádios	Critérios
<b>Estádio I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baixa carga tumoral (<math>\leq 0,6</math> células x <math>10^{12}/m^2</math>) *</li> </ul> <p><b>Todos os seguintes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hemoglobina (Hb) maior que 10g/dL.</li> <li>○ Cálcio sérico menor ou igual a 12mg/dL.</li> <li>○ Baixa taxa de produção de componente monoclonal               <ul style="list-style-type: none"> <li>- IgG &lt;5g/dL; IgA &lt;3g/dL</li> </ul> </li> <li>○ Proteinúria urinária monoclonal &lt;4g/24h</li> <li>○ Radiografia óssea normal ou lesão óssea única.</li> </ul>
<b>Estádio II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Serão admitidos nesse grupo os pacientes cujos dados não se encaixem nem no estágio I, nem no estágio III.</li> </ul>
<b>Estádio III</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta carga tumoral (<math>\geq 1,2</math> células x <math>10^{12}/m^2</math>) *</li> </ul> <p><b>Um ou mais dos seguintes</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Hemoglobina (Hb) menor que 8,5g/dL.</li> <li>○ Cálcio sérico maior que 12mg/dL.</li> <li>○ Altas taxas de produção do componente monoclonal               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ IgG &gt;7 g/dL; IgA &gt;5g/dL</li> </ul> </li> <li>○ - Proteinúria urinária monoclonal &gt;12g/24h</li> <li>○ Múltiplas lesões líticas, fraturas</li> </ul>
	<p>Os estádios serão subdivididos baseando-se na função renal:</p> <p><b>A:</b> Creatinina menor que 2 mg/dL</p> <p><b>B:</b> Creatinina maior ou igual a 2 mg/dL</p>

*\*Total body myeloma cell number = total body M-component synthetic rate cellular M / component synthetic rate*

$10^{12}$  células = ~ 1 kg ou 2.2 Ibs;  $m^2$  = superfície corpórea

**Anexo 2** – Critérios de Resposta segundo o *International Myeloma Working Group* (IMWG)

- **RESPOSTA COMPLETA ESTRITA (sRC):** Resposta completa conforme definição abaixo, relação  $\kappa:\lambda$  livre no sangue normal e ausência de plasmócitos na medula óssea por imunohistoquímica ou imunofenotipagem;
- **RESPOSTA COMPLETA (RC):** imunofixação negativa (soro e urina), plasmócitos na medula óssea  $\leq 5\%$  e desaparecimento de plasmocitoma extraósseo, nenhum aumento no tamanho e número de lesões líticas;
- **RESPOSTA PARCIAL MUITO BOA (RPMB):** proteína monoclonal detectável por imunofixação, mas não por eletroforese de proteínas séricas ou redução  $\geq 90\%$  no componente monoclonal no soro e componente monoclonal na urina  $< 100\text{mg}/24\text{h}$ ;
- **RESPOSTA PARCIAL (RP):** redução  $\geq 50\%$  do componente monoclonal no soro e redução  $\geq 90\%$  do componente monoclonal na urina 24h ou  $< 200\text{mg}/24\text{h}$ ;
- **DOENÇA ESTÁVEL:** não preenche critérios para RC, RPMB (VGPR), RP ou DP
- **DOENÇA PROGRESSIVA (DP):** aumento de 25% do pico monoclonal no soro (aumento absoluto deve ser  $\geq 0,5\text{g}/\text{dL}$ ) ou na urina (aumento absoluto deve ser  $> 200\text{mg}/24\text{h}$ ); novas lesões ósseas ou de partes moles ou aumento de lesões extraósseas ou de partes moles previamente existentes; ou desenvolvimento de hipercalcemia ( $>11,5\text{mg}/\text{dL}$ ) secundário ao mieloma.

\* não usaremos como critério a sRC por não termos disponível a pesquisa de cadeia kappa/lambda livre a nível de SUS.



**Anexo 3** – Quadro representando os valores de referência do laboratório terceirizado utilizado pelo Hospital de Câncer de Pernambuco-Laboratório CIAC.

Teste laboratorial	Valor de referência	Valor de referência por sexo	Valor de referência por idade
Hemoglobina (g/dL)		Homens: 13,5-18 Mulheres: 12-18	
Leucócitos (mm <sup>3</sup> )	4-10,8 x10 <sup>3</sup>		
Segmentados (mm <sup>3</sup> )	2-7,02 x10 <sup>3</sup>		
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	0,8-3,78 x10 <sup>3</sup>		
Monócitos (mm <sup>3</sup> )	0,16-1,21 x10 <sup>3</sup>		
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	140-450 x10 <sup>3</sup>		
Creatinina (mg/dL)		Homens: 0,7-1,3 Mulheres: 0,6-1,1	
Ureia (mg/dL)	10 - 40		
Desidrogenase Láctica (DHL) –U/L	125-243		
Velocidade de Hemossedimentação (VHS) - mm			Primeira hora: Homens: 0 a 15 Mulheres: 0 a 20
Cálcio sérico (mg/dL)	8,9-10		
Beta 2 microglobulinemia (ng/mL)			Até 59 anos: 2000 >60 anos: 2600
Eletroforese de proteínas séricas Frações expressas em g/dL	Proteína Total: 6-8 Albumina: 3,6-6,2 Alfa1: 0,06-0,27 Alfa2: 0,44-1,07 Beta1: 0,45-1,1 Beta2:0,2-0,54 Gama:0,48-1,34		
IgG (mg/dL)		Homens >30 anos: 660-1690 Mulheres >30 anos: 650-1640	
IgM (mg/dL)			>12 anos: 50-300
IgA (mg/dL)		Homens 11-60 anos: 57-543 Homens ≥ 60 anos: 103-591 Mulheres 11-60 anos: 52-468 Mulheres ≥ 60 anos: 90-532	

Fonte: <http://laboratoriociac.com.br/resultados-online/>

**Anexo 4 - Parecer consubstanciado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco**

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC**

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS COESTIMULADORAS OX40, 4-1BB E CD40 NO MIELOMA MÚLTIPLO

**Pesquisador:** Reijâne Alves de Assis

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 51156615.0.0000.5205

**Instituição Proponente:** SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.412.599

**Apresentação do Projeto:**

O completo entendimento do sistema imune, as interações entre as células efectoras e moléculas de coestimulação e os mecanismos pelos quais os tumores escapam a imunovigilância ainda são fontes de muitas pesquisas e várias lacunas precisam ser preenchidas antes de chegarmos à terapias capazes de corrigir já no primeiro momento o erro que leva ao surgimento das neoplasias. Recentemente, um foco importante de pesquisas tem sido as moléculas coestimuladoras membros da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral, em particular o OX40 e o 4-1 BB e seus ligantes solúveis, além do CD40 que está expresso nas células apresentadoras de antígenos. O entendimento de como estas moléculas estão expressas nas diversas células do sistema imune, em particular nos linfócitos T efetores, tem propiciado o desenvolvimento de anticorpos agonistas, com a possibilidade de otimizar a resposta imune contra células tumorais.

O mieloma múltiplo é a segunda neoplasia oncohematológica e caracteriza-se pela proliferação anômala de plasmócitos, levando a produção clonal de determinada subclasse de imunoglobulina e lesões de órgãos alvos. É uma neoplasia de pacientes idosos, muitas vezes com performance status e condição clínica bastante depauperada

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597

**Bairro:** Santo Amaro

**CEP:** 50.040-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3217-8005

**Fax:** (81)3217-8005

**E-mail:** [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br)

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC**

Continuação do Parecer: 1.412.599

dificultando as opções de tratamento.

Conhecer novas moléculas e como as mesmas poderão ser utilizadas na prática clínica de forma a otimizar e melhorar a resposta ao tratamento é bastante desafiador, e se torna fundamental a avaliação em diferentes populações e etnias, para aplicações futuras destas novas drogas em desenvolvimento.

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a expressão de OX40, 4-1 BB e CD40 em pacientes com mieloma múltiplo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

O estudo não oferece riscos aos pacientes pois todas as amostras do estudo já fazem parte do que rotineiramente é realizado nos pacientes em início de tratamento de mieloma múltiplo.

No caso dos controles o risco é apenas inerente a coleta de amostras através de punção venosa periférica, ou seja, dor no momento da punção e

possível sangramento no momento da coleta e formação de pequeno hematoma local, que se resolverá sem maiores complicações.

Benefícios:

Não haverá benefícios diretos ou indiretos aos pacientes e controles, pois nenhuma intervenção será realizada nos mesmos

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de relevância para a população sobre os estudos moleculares do câncer.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos obrigatórios em conformidade

**Recomendações:**

NENHUMA

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

NENHUMA

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597

**Bairro:** Santo Amaro

**CEP:** 50.040-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3217-8005

**Fax:** (81)3217-8005

**E-mail:** [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br)

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC**

Continuação do Parecer: 1.412.599

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_627313.pdf	24/01/2016 12:46:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetomielomamultiploemoleculascoestimuladorascorrigidospospendencia.pdf	24/01/2016 12:46:17	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Orçamento	cartaanuenciaiorcamentofontepagadora.pdf	24/01/2016 12:42:32	Reijâne Alves de Assis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLÉpacienteseconrolesversaocorrigidapendencias.pdf	24/01/2016 12:42:00	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoplataformabrasil.pdf	18/11/2015 18:48:10	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuenciaihematologia.pdf	15/11/2015 22:01:13	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuencialMIP.JPG	15/11/2015 22:00:19	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartanuenciaorientadorHugo.pdf	15/11/2015 22:00:05	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuenciacoorientadorrmoacyrrego.JPG	15/11/2015 21:59:45	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuenciaHCP.JPG	15/11/2015 21:59:10	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	cartaanuenciaACCamargo.JPG	15/11/2015 21:58:53	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Outros	ANEXOSprojetomielomamultiploemoleculascoestimuladoras.pdf	15/11/2015 21:50:38	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Outros	FICHACLINICAPROJETOMIELOMAMULTIPLOEMOLECULASCOESTIMULADORAS.pdf	15/11/2015 21:50:19	Reijâne Alves de Assis	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMAPROJETOMIELOMAMULTIPLOEMOLECULASCOESTIMULADORAS.pdf	15/11/2015 21:49:37	Reijâne Alves de Assis	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597**Bairro:** Santo Amaro**CEP:** 50.040-000**UF:** PE**Município:** RECIFE**Telefone:** (81)3217-8005**Fax:** (81)3217-8005**E-mail:** cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA  
DE COMBATE AO CÂNCER-  
SPCC

Continuação do Parecer: 1.412.599

RECIFE, 17 de Fevereiro de 2016

---

**Assinado por:**  
**ISABEL CRISTINA LEAL**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Cruz Cabugá, 1597

**Bairro:** Santo Amaro

**CEP:** 50.040-000

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)3217-8005

**Fax:** (81)3217-8005

**E-mail:** [cep@hcp.org.br](mailto:cep@hcp.org.br)