



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

**Caracterização fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue de pacientes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas**

**Gabriel Alves Costa Veranio Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfológicas

**Orientador: Radovan Borojevic**

**Co-Orientador: Hélio dos Santos Dutra**

**Rio de Janeiro  
Agosto 2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Caracterização fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue de pacientes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas**

**Gabriel Alves Costa Veranio Silva**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências Morfológicas

**Banca Examinadora:**

**Titulares**

Prof. Dr. Maria Isabel Doria Rossi

Prof. Dr. Claudia Farias Benjamim

Prof. Dr. Maria Ignês Capella Gaspar Elzas

**Suplentes:**

Prof. Dr. Márcia Cury El-Cheikh (Revisora)

Prof. Dr. Angelo Maiolino

**Orientador:**

**Prof. Radovan Borojevic**

Veranio-Silva, Gabriel Alves Costa

Caracterização fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue de pacientes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas /Rio de Janeiro: UFRJ / Instituto de Ciências Biomédicas  
xiii, 85 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Radovam Borojevic e Hélio dos Santos Dutra

Dissertação (Mestrado) – UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2010.

Referências Bibliográficas: f. 66-74

1. Mieloma Múltiplo. 2. Células Dendríticas. 3. Linfócitos. 4. Monócitos. 5. Talidomida. 6. Transplante autólogo de células tronco hematopoéticas. 7. Hematologia, 8. Imunoterapia – Tese. I. Borojevic, Radovam II. Dutra, Hélio dos Santos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

Ao meu pai e mãe, por todo apoio e dedicação em me manter focado e não me deixar desistir dos meus objetivos...

A minha noiva com amor.

Construímos muitos muros  
e poucas pontes.

*Sir.* Isaac Newton

---

## Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Radovan Borojevic e Prof. Hélio dos Santos Dutra, por terem me aceito como aluno e guiado meus caminhos nos últimos anos;

ao Dr. Roberto Magalhães e ao Dr. Ângelo Maiolino, por sua colaboração na avaliação dos critérios clínicos dos pacientes envolvidos neste estudo, e ao Dr. Wolmar Pucheri, chefe da Hematologia, por permitir a realização deste estudo com os pacientes do HUCFF;

aos pacientes e doadores saudáveis por darem seu sangue para a ciência, vocês foram indispensáveis;

à Dra. Maria de Fátima Melo e a Dra Ilana Dines, por cederem anticorpos essenciais ao estudo;

à Dra. Carmem Nogueira por ceder os *buffy coats* para a produção de linfócitos alogênicos purificados;

à Profa. Vivian Rumjanek por ceder a timidina tritiada usada para quantificar a proliferação de linfócitos;

e a todos os técnicos do LCCMO que sempre me ajudaram, especialmente Elizabeth Araão, pois sem ela eu não teria estrutura para trabalhar.

Agradeço muito ao meu pai, Moacelio, pela grande ajuda nesta etapa final de desenvolvimento da dissertação, e a sua companheira, Fafá, por não deixar nosso lado e impedir uma guerra de acontecer.

Agradeço muito à minha mãe, Mary, pelas palavras de incentivo nos momentos mais difíceis, e por todo o amor e carinho que ela e seu companheiro, Domic, me deram, mesmo tão longe.

Agradeço à minha família e amigos, por toda a ajuda, carinho e compreensão durante esta etapa árdua.

Agradeço especialmente à minha noiva, por sempre acreditar em mim, por todo amor desprendido, e por aceitar a minha distância e impaciência nesta etapa final.

## Resumo

VERANIO-SILVA, Gabriel Alves Costa. Caracterização fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue de pacientes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. Orientador: Radovan Borojevic. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB/PCM, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas).

Hoje, cerca de 10% dos novos diagnósticos de neoplasias hematológicas são de pacientes com mieloma múltiplo (MM), uma doença que ainda não tem cura. A imunoterapia com células dendríticas (DC) vem sendo usada com sucesso no tratamento desta neoplasia. Entretanto, a literatura apresenta divergências quanto ao rendimento e a qualidade de DC autólogas derivadas *ex vivo* a partir de monócitos do sangue dos pacientes acometidos por esta doença. Este estudo comparou a produção de DC a partir de monócitos de pacientes com MM, após TACTH e em terapia de manutenção, com a produção destas células a partir de monócitos de doadores saudáveis. Os resultados dos hemogramas mostraram que os pacientes com MM apresentaram menos leucócitos e mais monócitos no sangue que os doadores saudáveis. Porém, esta diferença na quantidade de monócitos não foi confirmada pela citometria de fluxo usando como marcadores CD14 e HLA-DR. O rendimento de produção destas células por gradiente de densidade e a sua adesão ao plástico também não apresentaram diferenças significativas entre estes dois grupos. As DC maduras, produzidas a partir de monócitos do sangue de pacientes com MM e doadores saudáveis, apresentaram morfologia e fenótipo equivalentes ao descrito na literatura, com redução na expressão de CD14 e aumento na expressão de HLA-DR durante a diferenciação e com a expressão de CD1a e CD86 na DC madura. As DC dos pacientes e dos controles foram obtidas com rendimento e fenótipo equivalentes, e o ensaio funcional de estimulação de proliferação linfocitária também não apresentou resultados com diferenças significativas. Os pacientes e os controles apresentaram mesma quantidade de linfócitos B, de células NK ativadas e precursores NK. Foi observada uma inversão na relação CD4/CD8 dos linfócitos T nos pacientes pós-TACTH, com menores níveis de linfócitos T CD4+ e maiores níveis de linfócitos T CD8+, totais e ativados (HLA-DR+). Apesar da diferença nos níveis de linfócitos T CD4+ totais, a subpopulação de linfócitos ativados não variou. A talidomida, droga usada em oito dos 17 pacientes em terapia de manutenção, apresentou influência somente na intensidade de expressão de HLA-DR de superfície em linfócitos B CD20+ e linfócitos T CD3+ CD8+ ativados. Por tanto, é possível concluir que as DC produzidas a partir de monócitos de pacientes com MM, após TACTH e em uso ou não de talidomida, são equivalentes às de indivíduos saudáveis, e que esta fase de tratamento de manutenção é uma janela terapêutica propícia para a imunoterapia com DC.

---

## Abstract

VERANIO-SILVA, Gabriel Alves Costa. Caracterização fenotípica de células dendríticas derivadas de monócitos do sangue de pacientes com mieloma múltiplo após transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas. Orientador: Radovan Borojevic. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB/PCM, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfológicas).

Currently, there about 10% of new hematological neoplasia diagnosis came from multiple myeloma (MM) patients, a disease without cure until now. Immunotherapy with dendritic cells (DC) has being used for treating myeloma with good results. Nevertheless, the yield and quality of autologous DC *ex vivo* induced from MM patients' blood monocytes are very divergent. This project pretended to compare DC production from monocytes of MM patients, who were submitted to hematopoietic progenitor cells autologous transplantation (HPCAT) and are undergoing maintenance therapy, with DC production from monocytes of health donors. Hemogram results showed that MM patients had fewer leukocytes but more monocyte cells into blood than health donors. However, this difference between monocyte numbers was not confirmed by flow cytometry analysis using CD14 and HLA-DR as cell markers. Yield from density gradient and adhesion to plastic also were not significantly different comparing these two groups. Mature DC, produced from blood monocytes of MM patients and health donors, showed morphology and phenotypes consistent with literature, presenting reduction of CD14 expression and increase of HLA-DR expression over the differentiation and normal expression of CD1a and CD86 in mature DC. DC were obtained from MM patients and health donors with equivalents cell yield and phenotypes, and the stimulation of lymphocyte proliferation functional assay were not significantly different between these two DC. Patients and health donors showed the same cell number of lymphocyte B, activated natural killer cells (NK) and NK precursors. An inversion of T lymphocyte CD4/CD8 ratio was observed in post-HPCAT MM patients, with lower levels of CD4+ T lymphocytes and higher levels of global and activated (HLA-DR+) CD8+ cells. Despite the lower levels of total CD4+ T lymphocytes, the activated lymphocyte subpopulation didn't change. Thalidomide, drug used in 8 of the 17 patients undergoing maintenance therapy, altered only the intensity of surface HLA-DR expression on CD20+ B lymphocytes and activated CD3+ CD8+ T lymphocytes. These results allow concluding that DC produced from monocytes of MM patients after HPCAT, undergoing or not thalidomide treatment, is equivalent to DC produced from monocytes of health donors, and that this step of maintenance treatment is an opportune therapeutic window for DC immunotherapy.

## Abreviaturas<sup>1</sup>

APC	<i>antigen preenting cell</i> (célula apresentadora de antígeno)
BSS-CMF	<i>buffered saline solution - calcium magnesium free</i> (solução salina tamponada livre de cálcio e magnésio)
CCL	<i>CC chemokine ligant</i> (ligante de quimiocinas CC)
CCR	<i>CC chemokine receptor</i> (receptor quimiocinas CC)
CD	cluster de diferenciação
cDC	célula dendrítica convencional
CLP	<i>common lymphocyte progenitor</i> (progenitor comum linfóide)
CMP	<i>common myeloid progenitor</i> (progenitor comum mielóide)
COM	cintilações por minuto
CT	com talidomida
CXCR	<i>CX chemokine receptor</i> (receptor quimiocinas CX)
Cy	<i>Cy-Chrome</i>
DC	<i>dendritic cell</i> (célula dendrítica)
DMSO	dimetilsulfóxido
FasL	Ligante de Fas
Fc	fração constante de imunoglobulina
FcR	receptor de fração constante de imunoglobulina
FISH	<i>fluorescent in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i> (isotiocianato de fluoresceína)
FLT3	<i>FMS related tyrosin kinase type 3 receptor</i> (receptor de tirosina cinase do tipo 3 relacionado com FMS)
FMS	<i>receptor for macrophage colony-stimulating factor</i> (receptor de fator de estimulação de colônias de macrófagos)
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stymulating factor</i> (fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos)
HES	hidroxi-etil-amido
HLA	<i>human leucocyte antigen</i> (antígeno leucocitário humano)
ICAM	<i>Inter-cellular adhesion molecule</i> (molécula de adesão intercelular)
iDC	célula dendrítica inflamatória

<sup>1</sup> Sempre que possível, para facilitar a compreensão, as siglas e abreviações seguiram a língua inglesa.

IF	índice de fluorescência
Ig	imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	óxido-nítrico-sintase induzida
IP	índice de proliferação
ISS	<i>International Scoring System</i> (Sistema de estadiamento internacional)
LC	<i>Langerhans cell</i> (célula de Langerhans)
LINneg	Linhagem negativa
LPS	lipopolissacarídeo
LTreg	linfócito T regulador
MGG	<i>May-Grünwald-Giemsa</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (complexo de histocompatibilidade maior)
MIP	<i>Macrophage inflammatory protein</i> (proteína inflamatória de macrófagos)
MM	mieloma múltiplo
NK	<i>natural killer</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (solução tamponada de fosfato)
pDC	célula dendrítica plasmocitóide
PE	<i>phycoerythrin</i> (ficoeritrina)
PEG	polietilenoglicol
PerCP	<i>peridinin chlorophyll protein complex</i>
pré-DC	célula precursora de célula dendrítica
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SDF	<i>Stem cell derived factor</i> (fator derivado de células tronco)
SFB	soro fetal bovino
ST	sem talidomida
TACTH	transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i> (transportador associado com processamento de antígenos)
TGF	<i>tumor growth factor</i> (fator de crescimento tumoral)
TL	<i>T lymphocyte</i> (linfócito T)
TNF	<i>tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
VEGF	<i>Vascular endothelium growth factor</i> (fator de crescimento de endotélio vascular)

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Modelo teórico da origem e diferenciação de células dendríticas.....	3
<b>Figura 2</b> - Opções de diferenciação <i>in vitro</i> de células dendríticas .....	4
<b>Figura 3</b> – Ciclo de vida de células dendríticas. ....	6
<b>Figura 4</b> - Diferenças morfológicas na maturação de células dendríticas .....	8
<b>Figura 5</b> - Captação de antígenos e apresentação por MHC I e MHC II.....	9
<b>Figura 6</b> - Expressão de CCR7 e migração de células dendríticas para o linfonodo ....	11
<b>Figura 7</b> - Ativação de linfócitos T por células dendríticas .....	12
<b>Figura 8</b> – Representação gráfica da leucometria e linfometria dos integrantes do estudo – Dados da Tabela 4 .....	35
<b>Figura 9</b> – Análise de linfócitos T por citometria de fluxo .....	36
<b>Figura 10</b> – Representação gráfica de linfócitos T totais e da relação CD4/CD8 – Dados da Tabela 7 .....	37
<b>Figura 11</b> – Análise de linfócitos T ativados por citometria de fluxo.....	38
<b>Figura 12</b> – Representação gráfica do total das subpopulações de linfócitos T ativados e IF do HLA-DR em linfócitos T CD8 – Dados das Tabela 7 e Tabela 8 .....	39
<b>Figura 13</b> – Análise de células NK e linfócitos B por citometria de fluxo .....	40
<b>Figura 14</b> – Análise de monócitos CD14+ por citometria de fluxo .....	41
<b>Figura 15</b> – Representação gráfica da quantidade de monócitos no hemograma e de monócitos CD14+ por citometria de fluxo – Dados da Tabela 5 .....	42
<b>Figura 16</b> – Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos .....	43
<b>Figura 17</b> - Citocentrifugado de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos .....	44
<b>Figura 18</b> – Análise de células dendríticas por citometria de fluxo.....	45
<b>Figura 19</b> – Análise da modulação de CD14 e HLA-DR durante a diferenciação de monócitos em células dendríticas.....	46
<b>Figura 20</b> – Fotografia de cultura de linfócitos.....	47
<b>Figura 21</b> – Fotografias de co-cultura de linfócitos com células dendríticas .....	48
<b>Figura 22</b> - Ensaio funcional das células dendríticas derivadas a partir de monócitos do sangue periférico. ....	49

---

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Resumo de estudos realizados analisando a talidomida como terapia de manutenção após TACTH .....	17
<b>Tabela 2</b> – Resumo de estudos com vacinação idiotípica com DC em pacientes com MM.....	19
<b>Tabela 3</b> - Anticorpos monoclonais usados para caracterização das células .....	25
<b>Tabela 4</b> – Caracterização dos sujeitos do trabalho e avaliação de seus hemogramas. ....	51
<b>Tabela 5</b> – Avaliação de rendimento e caracterização fenotípica de células dendríticas diferenciadas <i>ex-vivo</i> a partir de monócitos do sangue periférico. ....	52
<b>Tabela 6</b> – Influência da Talidomida no rendimento e fenótipo de células dendríticas diferenciadas <i>ex-vivo</i> a partir de monócitos do sangue periférico. ....	53
<b>Tabela 7</b> – Avaliação de rendimento e caracterização fenotípica de populações linfóides do sangue periférico.....	54
<b>Tabela 8</b> - Influência da talidomida no rendimento e fenótipo de populações linfóides do sangue periférico.....	55
<b>Tabela 9</b> - Influência da idade nos marcadores analisados no grupo de controle saudáveis.....	56

## Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Células dendríticas.....</i>	1
1.1.1	Origem e diferenciação .....	1
1.1.2	Função e fenótipo .....	5
1.2	<i>Mieloma Múltiplo.....</i>	13
1.2.1	Patologia.....	13
1.2.2	Imunologia.....	14
1.2.3	Terapias.....	15
1.3	<i>Objetivos.....</i>	22
1.3.1	Objetivo geral .....	22
1.3.2	Objetivos específicos .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1	<i>Material.....</i>	23
2.1.1	Amostras.....	23
2.1.2	Reagentes .....	24
2.1.3	Equipamentos.....	26
2.2	<i>Método.....</i>	26
2.2.1	Coleta de amostras de sangue periférico.....	26
2.2.2	Obtenção de células mononucleares.....	27
2.2.3	Obtenção de células dendríticas .....	27
2.2.4	Obtenção de suspensão celular enriquecida em linfócitos T autólogos.....	29
2.2.5	Obtenção de suspensão celular enriquecida em linfócitos T alogênicos .....	29
2.2.6	Fenotipagem por citometria de fluxo .....	30
2.2.7	Ensaio de proliferação de linfócitos .....	32
2.3	<i>Análises estatísticas.....</i>	34
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
4.1	<i>Conclusões.....</i>	65
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>75</b>
6.1	<i>Termo de consentimento livre e esclarecido .....</i>	76
6.2	<i>Definições internacionais para estadiamento do MM .....</i>	78
6.2.1	Estágio Durie Salmon.....	78
6.2.2	Sistema prognóstico internacional (ISS).....	78
6.2.3	Sistema de prognóstico do Intergrupo Francês de Mieloma (IFM) .....	79
6.2.4	Critérios de resposta do Registro Internacional de Transplante de Medula óssea ...	79
6.3	<i>Formulação de soluções preparadas no LABCAM.....</i>	82
6.3.1	PBS 0,15M NaCl .....	82
6.3.2	BSS-FACS .....	82
6.3.3	Paraformaldeído 1% .....	82
6.4	<i>Mapa da placa de proliferação linfocitária.....</i>	83
6.5	<i>Resumo do artigo submetido à revista Haematologica.....</i>	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Células dendríticas

Evidências experimentais obtidas no passar das últimas duas décadas mostram que as células dendríticas (DC) são as mais potentes células apresentadoras de antígeno (APC) do sistema imune. Elas estão envolvidas na iniciação da resposta imune primária, em doenças auto-imunes, rejeição de enxerto, infecção e na geração de anticorpos dependente de linfócitos T (TL) (Steinman, 1991). As DC são células de forma irregular, com projeções semelhantes a dendritos, apresentam altos níveis de expressão de Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) de Classe II em sua superfície e são capazes de estimular linfócitos T a produzir resposta antígeno-específica.

As células dendríticas apresentadoras de antígeno, assim como os macrófagos, apresentam grande heterogeneidade. Em tecido não linfóide encontramos células dendríticas intersticiais e células de Langerhans (LC) na epiderme, na circulação sanguínea encontramos DC do sangue e *veiled cells*, ou DC imaturas, da linfa aferente. Já em órgãos linfóides encontramos DC linfóides do baço e do timo e células interdigitantes em linfonodos (Steinman, 1991; Shortman & Liu, 2002).

Admite-se que elas formam um grande sistema composto por uma ampla variedade de subpopulações, diferenciadas por sua origem, localização e estágio de maturação, e são caracterizadas por diferentes marcadores de superfície e seus níveis de expressão (Cella e cols., 1997)

### 1.1.1 Origem e diferenciação

Em 1868, Paul Langerhans descreveu pela primeira vez células dendríticas localizadas na epiderme, que foram chamadas células de Langerhans (LC). Estas células tinham forma estrelada e apresentavam uma inclusão citoplasmática, na forma de raquete de tênis, chamada Grânulo de Birbeck. Até hoje este grânulo é usado para identificar as LC e diferenciá-las das células dendríticas. Um século depois, em 1973, Steinman e Cohn identificaram a presença de células dendríticas em outros tecidos (Steinman & Cohn, 1973).

Com exceção do cérebro e da córnea central, as DC podem ser encontradas no interstício de praticamente todos os órgãos humanos. A grande dificuldade de

---

identificar DC nos tecidos é separá-las de macrófagos, pois ambas marcam positivamente para moléculas apresentadoras de antígeno, como o MHC de Classe II, e para o antígeno *pan*-leucócito CD45. Para diferenciá-las é preciso considerar a densidade celular, a falta de receptores de fragmento cristalizável (FcR) de imunoglobulinas (Ig) e sua incapacidade de aderir ao plástico (Steinman, 1991).

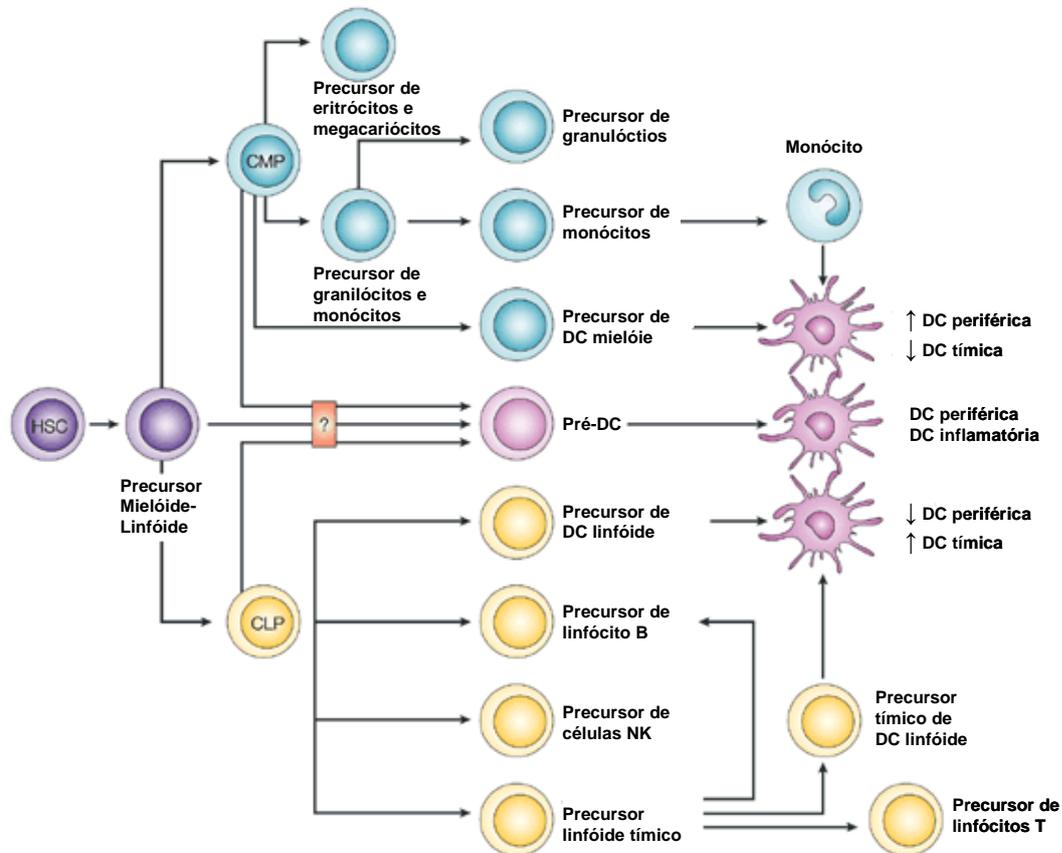
As DC foram inicialmente consideradas de origem mielóide, partindo de progenitores CD34+. Isto foi influenciado pela sua proximidade morfológica e funcional a monócitos e macrófagos. Alguns estudos mais recentes sugeriram que DC podem se desenvolver a partir de linhagens distintas, originando de diferentes precursores hematopoiéticos. Pelo menos duas vias de diferenciação já foram identificadas: a via convencional relacionada ao progenitor comum mielóide (CMP), e uma via relacionada ao progenitor comum linfóide (CLP). Alguns estudos sugerem que exista um precursor de DC diferenciado diretamente a partir de precursores mais imaturos que os CMP e CLP (Ardavín, 2003; Manz e cols., 2001). Monócitos também são capazes de se diferenciar em DC como descrito por Sallusto e Lanzavecchia (1994). Estas vias de diferenciação estão representadas na Figura 1.

Em 1991 o receptor FLT3 (*FMS related tyrosine kinase 3*) foi clonado por dois grupos independentemente (Mathews e cols., 1991; Rosnet e cols., 1991). Este receptor faz parte da mesma família de receptores tirosina cinase de classe III, e vem sendo relacionado com hematopoiese, leucemias (Rosnet e cols., 1996) e no desenvolvimento de DC (Maraskovsky e cols., 1996). Dentro de cada linhagem diferenciada a partir tanto de CMP como de CLP existe uma população positiva para FLT3, e estas populações tem uma capacidade aumentada de formar DC. As populações FLT3 positivas de ambos os precursores citados são capazes de produzir diferentes tipos de DC, como DC convencionais e plasmocitóides, que antes eram associados a somente um deles (D'Amico & Wu, 2003).

Este complexo sistema de DC, de origem diversa, pode ser dividido em algumas categorias, como descrito por Shortman e Naik (2007): células precursoras (pré-DC), DC convencionais (cDC) e DC inflamatórias (iDC). Segundo estes autores, as pré-DC são células que não apresentam a morfologia e funções de DC, mas retém a capacidade de diferenciar em DC com pouca ou nenhuma divisão celular, podendo ser necessário estímulo inflamatório ou microbiológico. Diferentes pré-DC dão origem a diferentes subtipos de DC,

---

exemplo: células dendríticas plasmocitóides produtoras de interferon (pDC) e monócitos.



**Figura 1** - Modelo teórico da origem e diferenciação de células dendríticas.

A diferenciação de DC foi proposta a proceder diretamente a partir de precursores de origem mielóide e linfóide, e a partir de precursores circulantes comuns de DC (pré-DC). Basicamente, em relação ao potencial de diferenciação em DC e a contagem absoluta de CLP e CMP, ficou estabelecido que a diferenciação tímica de DC tem contribuição equivalente de ambos os progenitores, enquanto que DC periféricas são derivadas principalmente a partir de CMP. Pré-DC e monócitos foram propostos a se envolver na geração de DC após o recrutamento para sítios reativos. (fonte: Ardavín, 2003)

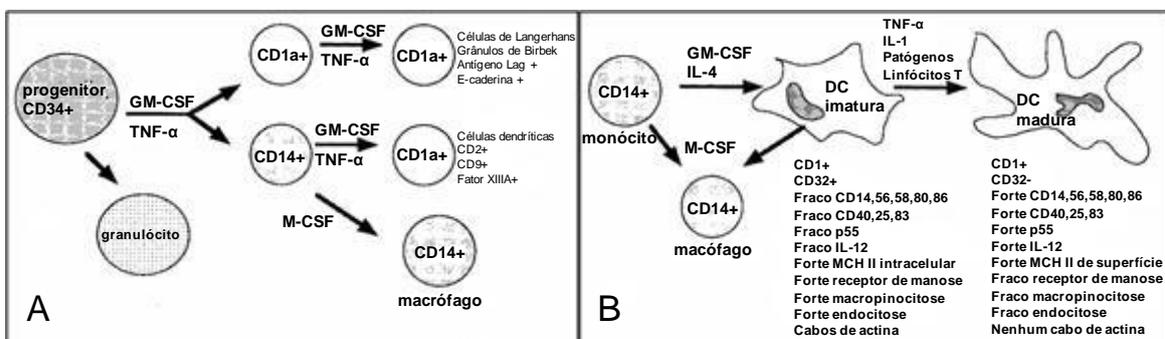
As células dendríticas convencionais já apresentam forma e função de DC, e podem ser subdivididas em algumas categorias. As células dendríticas migratórias são as DC clássicas, que agem como sentinelas nos tecidos periféricos, migram para os linfonodos pelos vasos linfáticos carregando os antígenos da periferia e apresentam esses antígenos a linfócitos T nos linfonodos. Neste grupo se encontram as LC e DC da derme.

Ainda como cDC, encontramos as DC residentes dos tecidos linfóides, que não são capazes de migrar pela linfa, se restringem a somente um órgão linfóide, onde coletam e apresentam antígenos próprios e estranhos. Elas podem se

subdividir pelo padrão de expressão de moléculas de superfície, dentre elas estão as DC do timo e do baço.

Existe também um tipo de DC que não está presente em condições fisiológicas, aparecendo somente sob estímulo microbiológico ou inflamatório: são as DC inflamatórias. Estas células podem se diferenciar a partir de monócitos inflamatórios e são produtoras de fator de necrose tumoral (TNF) e de óxido-nítrico-sintase induzida (iNOS).

Encontramos na circulação sanguínea do homem alguns precursores que são capazes de se diferenciar *in vitro* em DC. Monócitos CD14+ CD11c+ e precursores LINneg (Linhagem negativos) CD11c+ dão origem a DC imaturas na presença de GM-CSF e IL-4. Estas células por sua vez são capazes de originar LC quando expostas a TGF-β (*Tumor growth factor beta* – fator de necrose tumoral beta). Existem também precursores de DC CD11c- que foram inicialmente identificados como DC plasmocitóides, e que teriam primariamente origem linfóide (Banchereau e cols., 2000). Estas células, quando localizadas no timo, têm a função de regular o desenvolvimento de células T regulatórias (LTreg) (Martin-Gayo e cols., 2010).



**Figura 2** - Opções de diferenciação *in vitro* de células dendríticas

Em A está demonstrada a diferenciação de DC a partir de progenitores CD34+ isolados de medula óssea ou sangue periférico mobilizado com fator de crescimento G-CSF. As DC serão originadas no 12º dia, a partir de uma linhagem celular CD14+ formada no primeiro dia após o início do estímulo com GM-CSF e TNF-α. Em B temos a formação de DC imatura a partir de monócitos CD14+ isolados do sangue periférico e incubados com GM-CSF e IL-4 por cinco dias. A maturação final pode ser estimulada por diversos agentes, e o tempo para formação de DC madura variar de dois a sete dias de estímulo. (fonte: Pandha e cols., 1999)

Cella e colaboradores (1997) citam pelo menos três vias de diferenciação *in vitro* para as células dendríticas (Figura 2). A partir de progenitores mielóides

CD34+ na presença de GM-CSF e TNF- $\alpha$ , gerando células CD1a+. A partir de monócitos CD14+ circulantes no sangue, recrutados para sítios de inflamação, e diferenciados para DC imaturas na presença de GM-CSF e IL-4. A partir de precursor linfóide de DC que, mesmo na ausência de GM-CSF, dão origem a DC CD8 $\alpha$ + e FasL+.

A via mais importante para este trabalho é a diferenciação *in vitro* de células dendríticas a partir de monócitos do sangue, selecionados positivamente por adesão a plástico e cultivadas em meio contendo GM-CSF e IL-4 por cinco dias. Este protocolo é hoje o mais usado para produção de células para imunoterapia contra o câncer (Dubsky e cols., 2005).

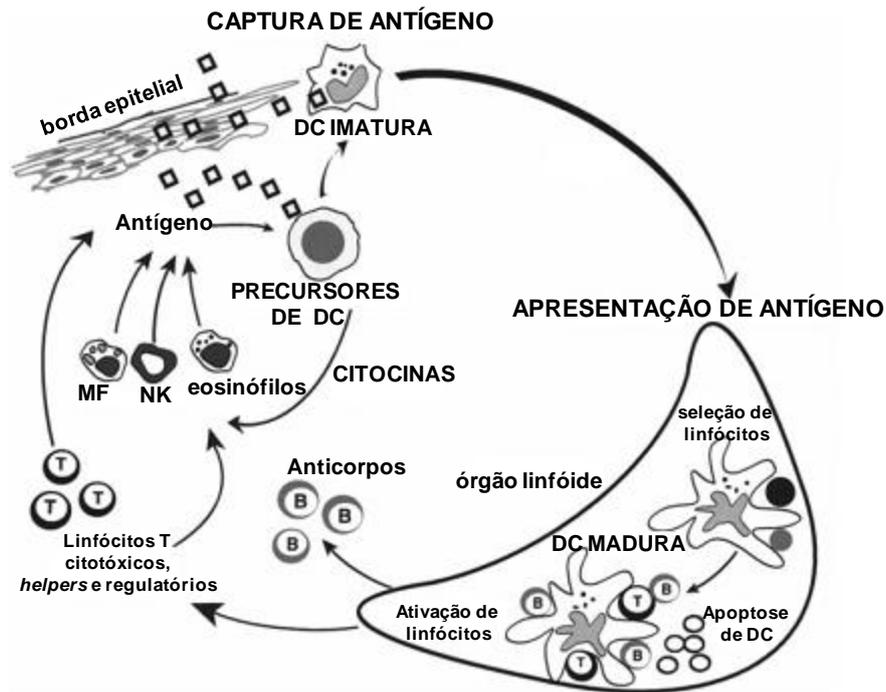
### **1.1.2 Função e fenótipo**

As DC são as mais potentes células apresentadoras de antígeno presente no sistema imune do ser humano. Na sua forma imatura são capazes de captar diversos tipos de antígenos, processá-los e carregá-los em moléculas de MHC de Classe II. Após serem ativadas elas diminuem sua capacidade de processar antígenos, aumentam a expressão de moléculas apresentadoras e migram para órgãos linfóides secundários para apresentar estes antígenos e otimizar a seleção clonal de linfócitos T imaturos, como representado na Figura 3 (Banchereau e cols., 2000).

#### **1.1.2.1 Captação de antígenos**

Quando imaturas, as DC usam vários mecanismos para captação de antígenos: macropinocitose, endocitose mediada por receptores e fagocitose. Para mediar a endocitose, as DC possuem receptores de lectina tipo C (receptores de manose) ou receptores Fc-gama dos tipos I (CD64) e II (CD32). Elas são capazes de fagocitar partículas como esferas de látex, fragmentos de células necróticas e apoptóticas, vírus, bactérias e parasitas. Já nesse estágio as DC já apresentam alta expressão de moléculas de MHC de Classe II localizadas em vesículas citoplasmáticas, representando o potencial de resposta rápida quando da captação de antígenos (Winzler e cols., 1997).

---



**Figura 3** – Ciclo de vida de células dendríticas.

Precursores circulantes de DC entram no tecido como DC imatura. Eles podem, também, encontrar patógenos diretamente (ex. vírus), o que dispara a secreção de citocinas (ex.  $\text{INF-}\alpha$ ), que por sua vez podem ativar eosinófilos, macrófagos (MF) e células *natural killer* (NK). Após a captura de antígenos, as DC imaturas migram para os órgãos linfóides onde, após maturação, elas expõem o complexo peptídico-MHC, que permitem a seleção de raros linfócitos antígeno-específicos circulantes. Estes linfócitos T ativados ajudam as DC com a sua maturação final, o que permite a expansão e diferenciação de linfócitos. Linfócitos T ativados migram e podem alcançar o tecido lesionado, pois eles podem atravessar o epitélio inflamado. Linfócitos T *helper* secretam citocinas que permitem a ativação de macrófagos, células NK e eosinófilos. Linfócitos T citotóxicos eventualmente lisam a célula infectada. Linfócitos B são ativados após o contato com células T e DC, e então migram para várias áreas onde eles amadurecem em plasmócitos secretores de anticorpos que neutralizam o patógeno inicial. Acredita-se que após a interação com linfócitos, a DC morra por apoptose. (fonte: Banchereau e cols., 2000)

### 1.1.2.2 Maturação

Diversas moléculas têm sido mostradas como ativadoras de DC, disparando a sua transição de célula imatura captadora de antígeno para APC madura, como CD40, TNF-R e IL-1R. Os estímulos necessários para regular a maturação podem ser de origem patogênica, como lipopolissacarídeo (LPS), DNA bacteriano e RNA de dupla fita, ou estar relacionado com o balanço entre sinais pró e anti-inflamatórios como TNF, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  e prostaglandinas, no microambiente local, ou ter origem em sinais derivados de Linfócitos T, como CD40L (Banchereau e cols., 2000). Administração sistêmica de TNF- $\alpha$ , IL-1 ou

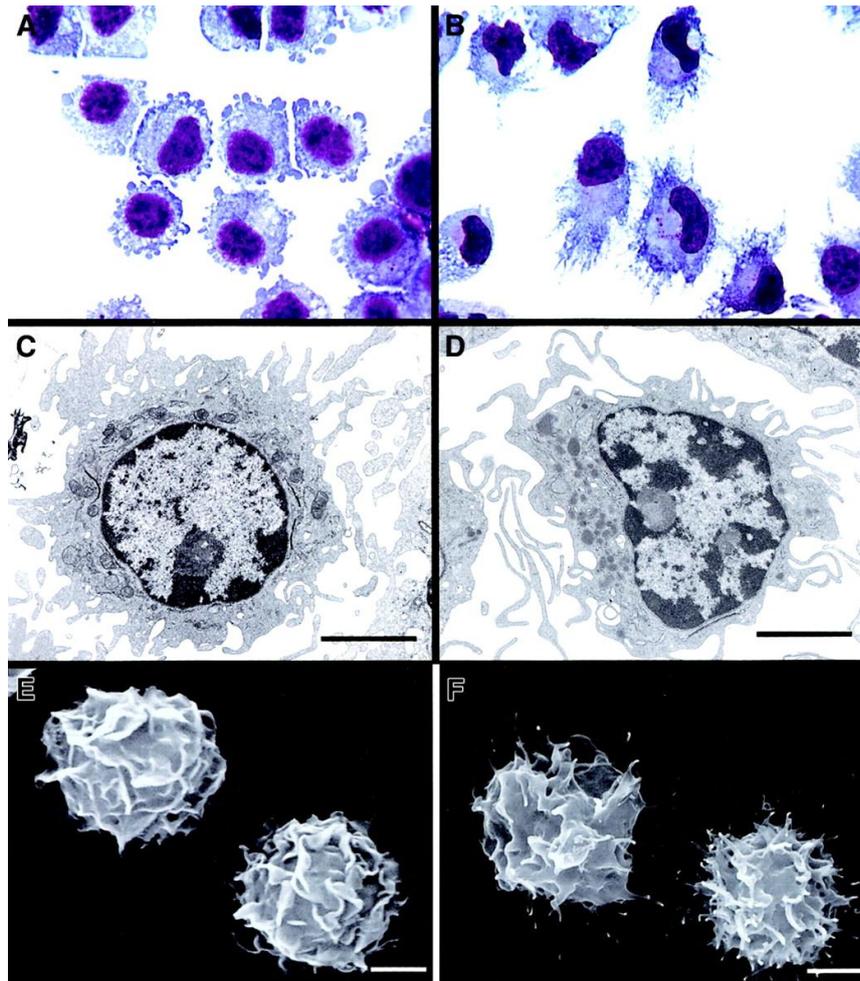
LPS induz a depleção de DC em tecidos não linfóides e sua migração para linfonodos (Cella e cols., 1997).

Durante o processo de maturação, as DC sofrem mudanças morfológicas e modulam as suas moléculas de superfície, diminuindo a expressão de receptores para endocitose, aumentando a expressão de moléculas de apresentação de antígenos como HLA-DR (MHC de Classe II) e CD1a (apresentação de lipídeos e glicolipídeos) e moléculas coestimulatórias, como CD58, CD80 e CD86 (Morelli e cols., 2001), aumentando a expressão de moléculas que regulam a sua ativação como CD40 e aumentam a produção de citocinas que melhoram a resposta de Linfócitos T como IL-12 (Banchereau e cols., 2000). As mudanças morfológicas que acompanham a maturação de DC incluem a formação de projeções, perda de estruturas adesivas, reorganização do citoesqueleto e aquisição de alta motilidade celular (Winzler e cols., 1997). A Figura 4 demonstra as alterações morfológicas entre as DC imaturas (A, C e E) e maduras (B, D e F), coradas com May-Grünwald-Giemsa (A e B), por microscopia eletrônica de transmissão (C e D) e por microscopia eletrônica de varredura (E e F).

Após a maturação as DC aumentam a sua capacidade de ativar linfócitos T e polarizar a resposta imune para TH1 ou TH2. Para reconhecer os antígenos apresentados por DC, os Linfócitos T precisam estabelecer contato, formando sinapses imunológicas, onde os receptores de linfócitos T (TCRs) e moléculas coestimulatórias estão congregadas em uma área central, cercadas por um anel de moléculas de adesão (Dustin & Cooper, 2000).

Células dendríticas obtidas *in vitro*, diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico, quando carregadas com antígenos, são mais capazes de apresentar antígenos, como o toxóide tetânico, que linfócitos B (Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Em um estudo recente, DC autólogas produzidas *in vivo* e estimuladas com antígenos de células tumorais apoptóticas purificadas de pacientes com MM foram capazes de manter clones de linfócitos T específicos contra os tumores por mais de um ano. A resposta foi melhor em pacientes com doença estável do que pacientes com doença em progressão (Michalek e cols., 2010).

---



**Figura 4** - Diferenças morfológicas na maturação de células dendríticas

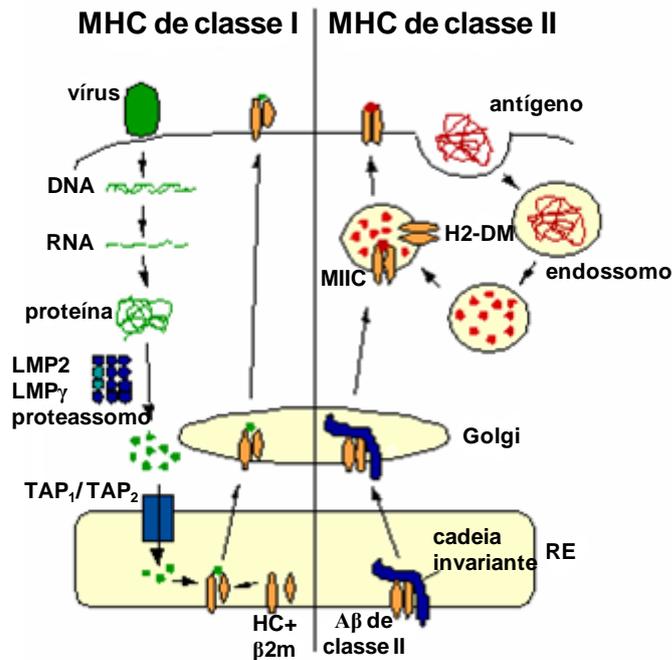
DC imaturas (A, C e E) e maduras (B, D e F), por coloração de May-Grünwald-Giemsa (A e B), por microscopia eletrônica de transmissão (C e D) e por microscopia eletrônica de varredura (E e F). (Fonte: Morelli e cols., 2001)

### 1.1.2.3 Apresentação de antígenos

A apresentação de antígenos pelas células dendríticas ocorre prioritariamente pelos complexos de histocompatibilidade maior, ou MHC. Existem três formas de esta apresentação ocorrer: por MHC de classe I, que envolve a apresentação de peptídeos intracitoplasmáticos, por MHC de classe II, que envolve a apresentação de antígenos exógenos internalizados ativamente, e por apresentação cruzada, onde antígenos exógenos são apresentados por MHC de classe I (Dubsky e cols., 2005).

Na via clássica de apresentação de antígenos por MHC I, as proteínas derivadas do citosol sofrem ubiquitinação e são clivadas no proteassomo

(Raghavan e cols., 2008). Os peptídeos gerados são transportados do citoplasma para o retículo endoplasmático através de transportadores associados com processamento de antígenos 1 e 2 (TAP 1 e 2). No retículo forma-se um complexo entre a cadeia I $\alpha$  do MHC e a  $\beta$ -2 microglobulina recém-sintetizadas, que se ligam os antígenos peptídicos. Este complexo é então rapidamente transportado por vesículas até a membrana plasmática das DCs (VYAS e cols., 2008).



**Figura 5** - Captação de antígenos e apresentação por MHC I e MHC II

Antígenos intracelulares são degradados pelo complexo do proteassomo, e depois são transportados pela TAP1/TAP2 para dentro do retículo endoplasmático (RE). Lá eles são associados ao MHC-I e depois transportados para membrana plasmática por vesículas do complexo de Golgi. Os antígenos internalizados por fagocitose e afins vão ser digeridos pela fusão da vesícula fagocítica com lisossomos, formando endossomos. Este endossomo irá se fundir com vesículas do Golgi contendo MHC-II. O antígeno é então carregado ao MHC-II e a fusão do MIIC com a membrana plasmática externaliza o complexo peptídeo-MHC-II.

(fonte: <http://www.mc.vanderbilt.edu/microbio/vankaer/research.html> ; acessado em 13 de agosto de 2010)

Já os antígenos exógenos são internalizados e é formada uma vesícula endocítica, que se funde ao lisossomo. O pH acidifica e as proteínas são degradadas. A molécula de MHC II, formada no retículo endoplasmático, ainda com a sua cadeia invariante acoplada a fenda, é transportada para as vesículas, gerando compartimento endossomal chamados MIIC. Neste compartimento a região invariável do MHC-II é então degradada até que reste somente um pequeno peptídeo, chamado peptídeo da cadeia invariante associado à molécula de classe II, ou CLIP. Para que o peptídeo

antigênico possa se ligar a fenda da molécula de MHC-II é necessário que o fragmento CLIP seja removido, pela ação do fator de troca de peptídeo H2-DM. A fusão do compartimento MIIC à membrana insere a molécula de MHC II na superfície da APC, e o antígeno é então apresentado (Dubsky e cols., 2005). Estas duas vias estão representadas graficamente na Figura 5.

Existem duas vias propostas para a apresentação cruzada de antígenos pelas células dendríticas, uma que depende e outra que não depende de TAP. Na via independente de TAP, o carregamento do MHC I ocorre diretamente nos compartimentos endossomais. Já na via dependente, as proteínas são transportadas do endossomo para o citosol. Uma vez processadas, os peptídeos são transportados por TAP1/2 para o retículo, onde ocorre o carregamento de moléculas de MHC I (Raghavan e cols., 2008; Basha e cols., 2008). A apresentação cruzada é importante para as estratégias de vacinação que visam induzir respostas de CTLs, pois a especificidade da resposta citotóxica resultará da apresentação cruzada dos fragmentos peptídicos (Groothuis & Neefjes, 2005).

As células dendríticas podem apresentar antígenos lipídicos via moléculas de superfície da família CD1 (Dubsky e cols., 2005). A molécula CD1a está presente nas células dendríticas maduras e células de Langerhans (Cella e cols., 1997).

#### *1.1.2.4 Migração*

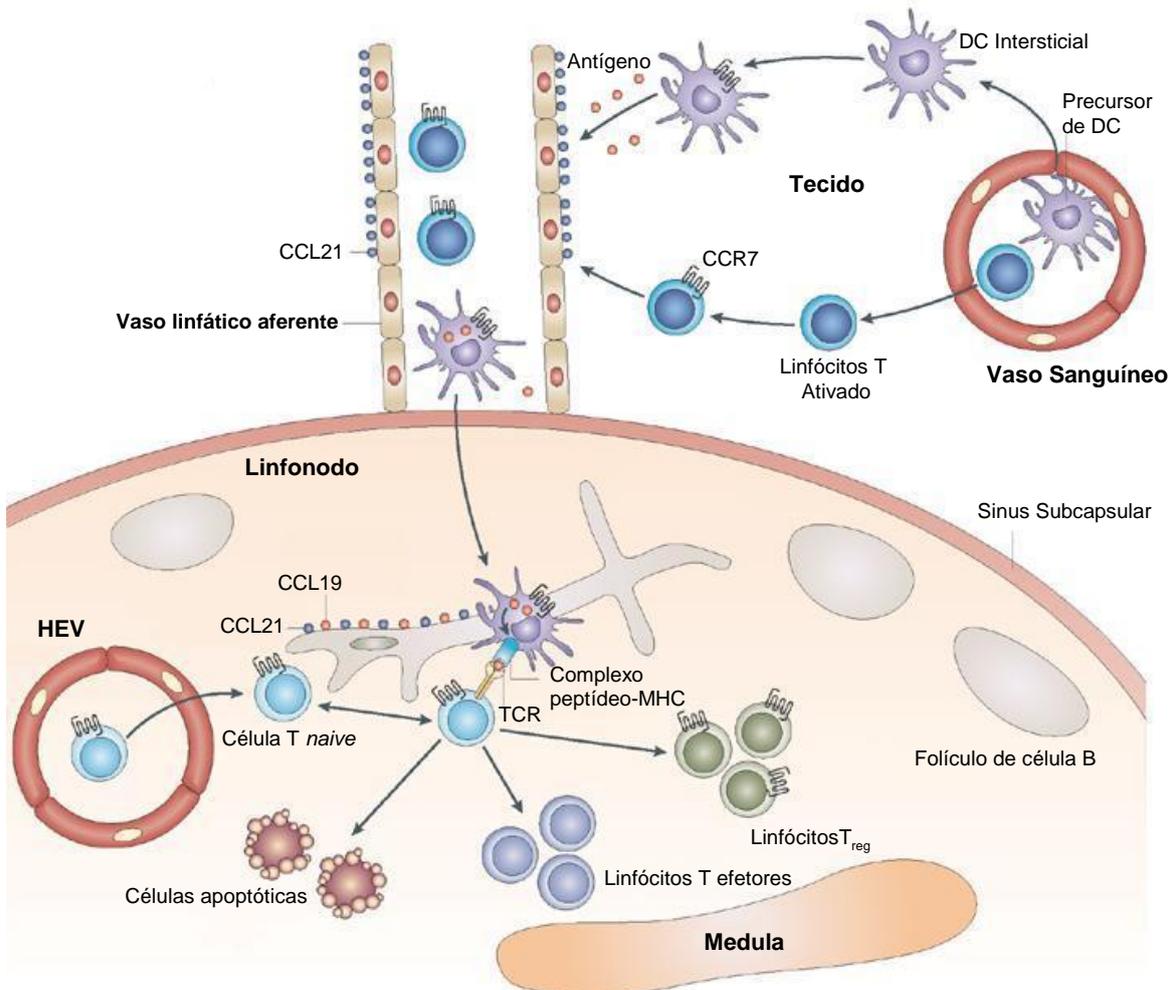
Após a maturação, as células dendríticas convencionais dos tecidos modulam a expressão de receptores de quimiocinas. Entre os receptores que estas células maduras passam a expressar estão o CXCR4 e o CCR7, o que permitem a resposta a CCL-19, CCL-21, SDF-1, MIP-3 $\beta$ , como representado na Figura 6 (Sozzani e cols., 2000). Este novo fenótipo induz a migração destas células pelos vasos linfáticos aferentes até os órgãos linfóides secundários, onde irão apresentar aos linfócitos T os antígenos captados antes da maturação (Jenaway e cols., 2007).

#### *1.1.2.5 Estimulação linfocitária*

Para iniciar a ativação linfocitária são necessários pelo menos dois sinais. O primeiro sinal acontece pela interação do complexo de MCH com o receptor de células T (TCR). O segundo sinal é referente à interação de moléculas coestimulatórias da família B7 (CD86 e CD86) com o ligante de B7, CD28,

---

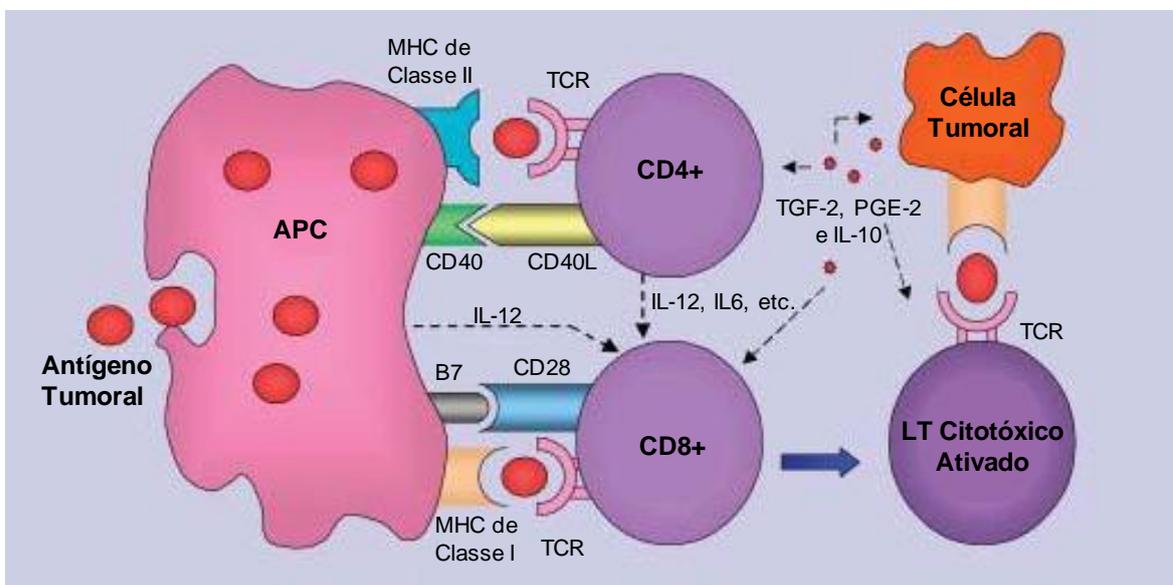
presente nos linfócitos T. Esta ligação é extremamente importante, pois ela regula a sobrevivência dos linfócitos por indução de proteínas antiapoptóticas, e sem ela, os linfócitos podem entrar em anergia (Sanchez e cols., 2005). A expressão do ligante de CD40 (CD40L) nos linfócitos ativados produz uma sinalização bidirecional. As DCs expressam o CD40 em sua membrana e a ligação CD40-CD40L promove a maior ativação das DC, que, por sua vez, transmite sinais de ativação e proliferação dos LT (Song e cols., 2008).



**Figura 6** - Expressão de CCR7 e migração de células dendríticas para o linfonodo

Algumas DC regulam espontaneamente a expressão do receptor de quimiocina CC 7 (*CC-chemokine receptor 7* – CCR7) e migram na direção do segmento inicial de vasos linfáticos que expressam o ligante de quimiocina CC 21 (*CC-chemokine ligand 21* – CCL21). Seguindo o gradiente de CCR7 para entrada nos vasos, as DC são passivamente carregadas com a linfa aferente para dentro do linfonodo drenante. Dentro do paracortex do linfonodo as DC apresentam antígenos para Linfócitos T *naive*, que entram no linfonodo via vênula do endotélio alto (HEV – *high endothelial venules*). Linfócitos T migram randomicamente nas células reticulares, que expressam CCL19 e CCL21. Estas quimiocinas aumentam a velocidade da locomoção do Linfócito T dentro do linfonodo e, portanto, aumentam a possibilidade de seu encontro com DC apresentadoras de antígeno. (Fonte: Förster e cols., 2008)

A secreção de citocinas, principalmente a IL-12, é considerada como terceiro sinal da estimulação linfocitária. A IL-12 direciona os LT ao fenótipo TH1, caracterizado pela imunidade celular e secreção de IFN- $\gamma$  (Figura 7). A ausência de IL-12 polariza os LT CD4+ a um perfil TH2, com secreção de IL-4, IL-5 e respostas humorais (Kadowaki, 2007). Em contrapartida, citocinas como IL-10 inibem a apresentação de antígenos através da regulação negativa da expressão de moléculas coestimulatórias. A IL-10 inibe a diferenciação dos monócitos a DC e a secreção de IL-12 pelas células T ativadas. LT produtores desta citocina possuem propriedades supressoras (Avigan, 1999).



**Figura 7** - Ativação de linfócitos T por células dendríticas

As células apresentadoras de antígeno (APC) capturam, processam e apresentam antígenos por meio de moléculas de MHC de classes I e II. Os linfócitos T, com receptores de células T (TCR – *T cell receptor*) rearranjados de forma a reconhecer o antígeno apresentado, recebem estímulo ativatório quando o sinal é confirmado pelas moléculas coestimulatórias. Estas moléculas coestimulatórias das APC podem ser da família B7, que é reconhecida pelo CD28 nos linfócitos T, e CD40, que é reconhecida pelo ligante de CD40 (CD40L) nos linfócitos T. Mediante o estímulo de citocinas produzidas pelas APC, pelos linfócitos T *helper* e pela própria célula tumoral alvo, os linfócitos T CD8+ ganham atividade citotóxica específica. (fonte: Liu e cols., 2003)

## 1.2 Mieloma Múltiplo

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença na qual plasmócitos malignos, de um único clone, acumulam na medula óssea. As células do MM são secretoras de imunoglobulina idiotípica, e o acúmulo destas leva à maioria dos sintomas e disfunções dos órgãos (Sirohi & Powles, 2004).

Esta doença representa a segunda neoplasia hematológica mais freqüente, diagnosticada em um de cada 10 pacientes. A incidência desta doença no Brasil não foi profundamente estudada. Nos Estados Unidos a incidência é de quatro para cada 100.000 habitantes por ano. Um estudo brasileiro realizado entre 1998 e 2004 definiu como 60,5 anos a idade mediana dos pacientes no diagnóstico, e que a doença incide equilibradamente em homens e mulheres (Hungria & Angelo 2007).

### 1.2.1 Patologia

No microambiente medular, onde o plasmócito do MM reside, acontecem intrincadas interações que freqüentemente causam a destruição do osso, o que por sua vez estimula o crescimento tumoral. A lista de sintomas e disfunções do MM abrange: dor óssea causada pela reabsorção ao redor do infiltrado, falência renal causada pelo acúmulo de imunoglobulina, susceptibilidade a infecções, anemia e hipercalcemia causadas pela lesão ao ambiente medular. Apenas 1% dos paciente não secreta imunoglobulina idiotípica. A maioria dos MM são secretores, sendo que 53% dos casos secretam IgGs, 25% IgA, 1% IgD e 20% secretam cadeia leve de Ig (Bataille e cols., 1995).

Em 1975, quando ainda não havia muitas opções de tratamento, Durie e Salmon desenvolveram um sistema de estadiamento para prever o prognóstico dos pacientes através da medida de hemoglobina, concentração de paraproteína e doença renal e óssea. Já em 2005 foi definido um segundo sistema de estadiamento, baseado na concentração sérica de albumina e beta2-microglobulina, conhecido como *International Staging System (ISS) for Multiple Myeloma* (Greipp e cols., 2005).

Outro fator de prognóstico muito estudado na última década é a presença de deleções no cromossoma 13, definida pelo método de hibridização *in situ*, ou FISH (Shaughnessy e cols., 2000; Jagannath e cols., 2007). Usando este parâmetro o Intergrupo Francês de Mieloma (IFM - *Intergroup Francophone Du Myélome*)

---

desenvolveu um sistema de prognóstico que divide os pacientes com mieloma múltiplo em alto e baixo risco (Facon e cols., 2001). Os sistemas de estadiamento, prognóstico e resposta a tratamento estão descritos no anexo 6.2.

### **1.2.2 Imunologia**

Uma das características mais singulares do MM é a sua capacidade de produzir e secretar uma proteína idiotípica, na forma de imunoglobulina. Esta proteína é alvo para captação de antígenos, e há evidências da detecção de anticorpos anti-idiotipo circulantes em pacientes com MM. Apesar disso, estes pacientes não são capazes de montar uma resposta antitumoral *in vivo* eficiente e em intensidade suficiente para eliminar o tumor.

Para escapar do sistema imune, o plasmócito do MM usa diversos mecanismos moleculares. A sua interação com o estroma da medula se dá via interleucinas, como IL-6, VEGF e TNF- $\alpha$ , e moléculas de adesão, como  $\beta$ 1 e 2 integrinas e ICAM-I. Isto induz, na célula tumoral, a proliferação, sobrevivência e resistência as drogas, assim como a proliferação de vasos sanguíneos. A presença de IL-6 também bloqueia a conversão de monócitos em células dendríticas (DC) imaturas. VEGF, IL-10 e TGF- $\beta$  interferem com a maturação das DC, e este último induz anergia em linfócitos T (Harrison & Cook, 2005).

Raitakari, em 2003, detectou uma diminuição de linfócitos T CD4+ e inversão da relação entre linfócitos CD4+/CD8+ em pacientes com MM, e pesquisadores da Universidade de Salamanca apontaram uma infiltração de linfócitos T citotóxicos e TH1 na medula óssea (Perez-Andres e cols., 2006).

Disfunções no sistema de DC foram descritas por vários grupos. Em 2002, Ratta e cols. mostraram redução no número de precursores circulantes de DC mielóide e plasmocitóide, menor expressão dos antígenos HLA-DR, CD40 e CD80 e fraca indução da proliferação de linfócitos alogeneicos. Estas células também não foram capazes de apresentar o antígeno idiotípico específico de cada paciente para linfócitos T autólogos. Eles definiram também que IL-6 era capaz de inibir o crescimento de colônias de progenitores de DC CD4+, e que este efeito era revertido com o uso de anticorpos anti-IL-6. Brown e cols., em 2001, mostraram que TGF- $\beta$  e IL-10 são capazes, reversivelmente, de intervir com a ativação de DC. O mesmo grupo em 2004 verificou que a administração tanto de IL-12 quanto

---

de INF- $\gamma$  consegue restaurar a regulação positiva de CD80 em dendríticas (Brown e cols., 2004).

A concentração de linfócitos B em pacientes com MM permanece assunto controverso, e parece ser relacionada com mal prognóstico da doença (Reiman e cols., 2001). Moléculas de superfície relacionadas a células NK, como CD16, CD57, CD56 se mostraram aumentados em pacientes com MM comparando com doadores saudáveis, e o número de linfócitos CD3-CD56+ está aumentado em pacientes de alto risco, comparando com pacientes de risco intermediário e baixo (GarciaSanz e cols., 1996).

### ***1.2.3 Terapias***

O tratamento do MM avançou muito nos últimos seis a oito anos, e com este progresso uma incerteza surgiu sobre qual a melhor abordagem, particularmente nos casos de pacientes recém diagnosticados. A possibilidade de viver com MM por mais de 10 anos é uma realidade hoje para a maioria dos pacientes depois das estratégias terapêuticas modernas.

Apesar dos avanços conseguidos na última década, o mieloma múltiplo continua uma doença sem cura, o que impulsiona ainda mais a pesquisa de novas terapias. Os pacientes mais jovens e/ou saudáveis no quadro geral se beneficiam da quimioterapia em altas doses seguida de transplante. Esta técnica é responsável por uma intensa e duradoura queda na massa tumoral, o que permite novas abordagens terapêuticas, como imunoterapias (Stewart e cols, 2009).

#### ***1.2.3.1 Convencionais***

A terapia convencional para o MM inclui 3 fases distintas: indução, intensificação e manutenção (Barlogie, 1997).

Indução é a fase inicial em que se tenta induzir o máximo de remissão da doença, com a intenção de diminuir a carga tumoral. Geralmente esta fase segue o curso de quatro a seis ciclos de quimioterapia convencional, ou enquanto o paciente responder e tolerar a terapia. Em 1984, Barlogie e colaboradores propuseram a associação de vincristina, doxorrubicina e dexametasona (protocolo VAD) como substituta do melfalano e prednisona, até então a principal associação

---

usada (Alexania e cols., 1969) As drogas mais usadas nesta fase são a dexametasona, a talidomida, a lenalidomida e o bortezomibe. Estudos randomizados estão sendo realizados para checar a combinação de duas, três ou até mesmo das quatro drogas (Stewart e cols, 2009).

A intensificação é uma tentativa de alcançar o máximo de células do MM possível nos pacientes já com algum tipo de resposta. Para os pacientes que se enquadram nos critérios necessários, esta fase é composta de uma quimioterapia com altas doses de melfalano seguida de recuperação da hematopoiese do paciente usando transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (TACTH). Estudos randomizados mostraram que o TACTH ajuda a alcançar ou consolidar um quadro de remissão completa nos pacientes com MM (Attal e cols., 2003; Child e cols., 2003). O transplante alogênico, mesmo o não mieloablativo, não é muito comum em pacientes com MM, se restringindo somente à pacientes jovens com recaída precoce ou que apresentem características de muito alto risco no diagnóstico (Stewart e cols, 2009).

A fase de Manutenção, ou consolidação, consiste de qualquer tratamento usado para manter o quadro de remissão completa nos pacientes pós-transplante ou induzir uma melhor resposta da doença aos tratamentos. O tratamento de manutenção inicial usado na clínica foi o interferon- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ) (Ludwig e cols., 1995), mas com o passar dos anos esta terapia não mostrou benefícios (Drayson e cols., 1998). Os glicocorticóides também são usados na terapia de manutenção, aumentando a duração da resposta, porém, quando usados isoladamente, apresentam resultados controversos quanto a sobrevida global (Berenson e cols., 2002).

A droga recomendada para a fase de manutenção na atualidade é a talidomida, um imunomodulador que inovou o tratamento do MM por apresentar diversas vantagens, como a apresentação oral e a atividade sinérgica com outros fármacos (Palumbo e cols., 2008). Pelo menos três estudos recentes de grupos diferentes demonstraram vantagem no grupo tratado com talidomida na sobrevida livre de progressão e na sobrevida global. Um estudo brasileiro, que incluiu o Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) também apresentou resultados semelhantes (Tabela 1). No Brasil, a associação de talidomida e dexametasona é a associação mais usada para o resgate de pacientes com MM pós TACTH (Maiolino e cols., 2009).

---

**Tabela 1** – Resumo de estudos realizados analisando a talidomida como terapia de manutenção após TACTH

Estudo	Grupos	Sobrevida livre de progressão %	Sobrevida global %	Observações
Spencer e cols., 2009	Controle	23	75	3 anos
	Talidomida/Prednisona	<b>42</b>	<b>86</b>	
Barlogie e cols., 2008	Controle	20	44	8 anos
	Talidomida	<b>45</b>	<b>57</b>	
Attal e cols., 2006	Controle	36	77	3 anos para SLP; 4 anos para SG
	Talidomida	<b>52</b>	<b>87</b>	
Maiolino e cols., 2009	Controle	24	74	15 meses
	Talidomida	<b>42</b>	<b>65</b>	

Os efeitos imunomoduladores da talidomida incluem: estímulo na ativação e expansão de células T CD8+ (Haslett e cols., 2003), aumento da produção de IL-2 por células mononucleares (Shannon e cols., 1995), indução de produção de citocinas por linfócitos T helper tipo-2 (McHugh e cols., 1995), aumento da atividade NK *in vitro* (Davies e cols., 2001) e, por fim, estímulo de mecanismos efetores celulares e humorais em camundongos. (Dredge , e cols., 2002; Karrow e cols., 2000).

Com medo da toxicidade provocada pelo acúmulo de talidomida em pacientes em tratamento por longo período, alguns centros estão testando o uso de análogos, como a lenalidomida, que apresentem mesma vantagem com menor toxicidade (Stewart e cols, 2009).

### 1.2.3.2 Imunoterapias

Desde a década de 50 surgiram as primeiras evidências de que o sistema imune atua no combate das neoplasias. Observou-se que após a tentativa de transplante de tumores no modelo murino, ocorria repetidamente rejeição. Esses achados sugeriram a participação do sistema imune no reconhecimento e destruição de tumores. Tais conceitos, mais tarde, ficaram conhecidos como teoria da vigilância imunológica (Kim e cols., 2007). Décadas após, outros indícios como: a detecção de infiltrados de linfócitos em tumores sólidos (Sato e cols., 2005) e o conhecimento da existência de maior risco de câncer em pacientes com imunodeficiências, deram suporte a esta hipótese (Kinlen, 2004; Grulich e cols., 2007). Atualmente, o papel dos linfócitos B, T e NK, como células efetoras, assim

como o dos seus produtos, a perforina e os interferons do tipo I e II, já estão mais definidos (LeBlanc e cols., 2004).

Um exemplo prático de imunoterapia está no sucesso alcançado com a aplicação do transplante alogênico no tratamento das neoplasias hematológicas (Appelbaum, 2001). Neste procedimento os linfócitos T têm um papel essencial na produção da resposta imune necessária para a eliminação de células tumorais e este fenômeno é conhecido como efeito do enxerto contra o tumor (Appelbaum, 2007). Kolb e Cols., em 1995, comprovaram o impacto deste efeito ao transferirem linfócitos de um doador alogênico e curarem pacientes em recaída de leucemia mielóide crônica após o transplante de medula óssea. No entanto, seria desejável alcançar uma maior eficiência desta terapia através da promoção de uma resposta imune específica, sem os riscos da doença enxerto contra hospedeiro.

As primeiras tentativas de imunoterapias para o MM usaram o antígeno idiotípico purificado de cada paciente conjugado a um carreador imunogênico chamado KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanine*), e utilizavam o fator de crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) ou IL-2 como adjuvantes para estimular o sistema imune (Massaia e cols., 1999). Os resultados desta imunização foram pouco expressivos, o que sugeriu uma abordagem celular com maior capacidade imunogênica.

O uso de células dendríticas para a apresentação de antígenos específicos das células tumorais, tem se revelado como o método mais adequado para a indução de uma resposta imune específica antitumoral. A transfusão de células dendríticas autólogas, previamente tratadas com antígenos encontrados nas células tumorais, promove uma resposta específica dependente de linfócitos T. Estudos em modelos animais revelaram a potencial eficácia deste tratamento (Knight e cols., 1985; Celluzzi e cols., 1996; Zitvogel e cols., 1996). Esta modalidade terapêutica já foi aplicada em pacientes com melanoma (Nestle e cols., 1997), linfoma (Hsu e cols., 1996), câncer de próstata (Murphy e cols., 1996), mieloma múltiplo (Wen e cols., 1998) entre outros. Diversos estudos já foram realizados para avaliar o efeito antitumoral das DC, mas eles divergem em diversos aspectos como: carga tumoral no momento da vacinação, tratamentos prévios, composição das vacinas e no protocolo de aplicação (Tabela 2).

---

**Tabela 2** – Resumo de estudos com vacinação idiotípica com DC em pacientes com MM.

Tipo de vacina	Status da doença	Resposta imune * **	Efeito anti-tumoral	Referências
DC-pulsadas com Id seguido de KLH + GM-CSF	1ª remissão TACH	2/12 nd	2/12 redução ptn M	Reichardt e cols., 1999
DC-pulsadas com Id seguido de KLH + GM-CSF	1ª remissão TACH	2/10 1/10	3/10 redução ptn M	Reichardt e cols., 2002
DC-pulsadas com Id	1ª remissão TACH	Presente nos respondedores	3/17 RC e 2/17 RP	Lacy e cols., 2000
DC-pulsadas com Id	1ª remissão TACH	4/5 2/5	1/5 redução ptn M	Yi e cols., 2002
DC-pulsadas com Id + KLH ou Id seguido de KLH	1ª remissão TACH	4/26 nd	2/21 RC 8/21 redução ptn M	Liso e cols., 2000
DC-pulsadas com Id + KLH	MM-IgG	5/6 2/6	1/6 redução ptn M	Lim & Bailey-Wood, 1999
DC-pulsadas com Id seguido de KLH + GM-CSF	Doença avançada	nd 4/10	1/10 redução da infiltração plasmocitária na MO	Titizer e cols., 2000
DC-pulsadas com Id	Doença avançada	nd	6/42 redução ptn M	Mackensie e cols., 2000
DC-pulsadas com Id + KLH	Doença avançada	Resposta +	Redução ptn M	Massaia e cols., 1999
DC-pulsadas com Id seguido de KLH + GM-CSF	Doença avançada	2/2 2/2	0/2	Cull e cols., 1999

DC- células dendríticas; Id - Idiotipos, KLH- *Keyhole Limpet Hemocyanin*; GM-CSF - Fator de crescimento de granulócitos e macrófagos; RC- resposta completa; ptn M - proteína monoclonal; MO- medula óssea.

\* Proliferação de linfócitos T idiotipo específica \*\* Liberação de citocinas de células T idiotipo específicas.

Dados adaptados de Ruffini e cols., 2002.

Como já foi apontado anteriormente, os pacientes com MM apresentam sistema imune deficitário, tanto pela interação da doença com o nicho medular, quanto pelos medicamentos usados durante o curso do tratamento. Isto estimulou pesquisadores a avaliar a capacidade de produzir células dendríticas para imunoterapia nestes pacientes.

Alguns estudos demonstram que pacientes com MM têm número reduzido de células dendríticas quando comparados com indivíduos normais, enquanto outros não mostram essas diferenças. Da mesma forma, resultados divergentes são encontrados com relação à expressão dos marcadores de maturação de células dendríticas e a capacidade de estimulação de linfócitos alogênicos quando os mesmos grupos são comparados (Pfeiffer e cols., 1997; Raje e cols., 1999).

Em um estudo testando *in vitro* a adição de dexametasona na cultura de monócitos com GM-CSF + IL-4, foram obtidas células dendríticas imaturas com baixa expressão de CD1a, CD40, CD86 e alta expressão de CD14. E não obstante, quando adicionado TNF- $\alpha$  ao sistema, a maturação terminal não ocorreu, sendo comprovado pela persistência de baixa modulação das moléculas coestimulatórias CD83 e CD86 (Piemonti e cols., 1999).

Em outro que testou o efeito da talidomida *in vitro*, ficou estabelecido que a adição desta droga em um meio de cultura de monócitos com GM-CSF e IL-4, não inibe a diferenciação destas em células dendríticas. E ademais, a talidomida foi capaz de modular a capacidade aloestimulatória com aumento da secreção de IL-12 e aumento da resposta de linfócitos TH1 de maneira dose dependente (Mohty e cols., 2002).

Recentemente, foram publicados resultados de um estudo conduzido na Dinamarca que arrolou 19 pacientes com MM no diagnóstico e oito pacientes após o TACH (Brimnes e cols., 2006). O objetivo do estudo foi analisar os seguintes parâmetros das células dendríticas: número, marcadores de superfície e capacidade de estimulação de linfócitos T sendo que, as células dendríticas foram extraídas diretamente do sangue por um método de purificação, não sendo expostas a citocinas. O estudo demonstrou redução do número de células dendríticas e dos marcadores de maturação assim como, uma baixa estimulação linfocitária e de produção de citocinas (interferon- $\gamma$ ) nos pacientes com MM quando comparados com indivíduos normais.

---

Em 2005, Schütt e cols. estudaram a expansão de células dendríticas *in vitro* em 25 pacientes com MM submetidos a tratamento com quimioterapia convencional, TACTH e talidomida. Utilizando um protocolo de obtenção com GM-CSF e IL-4 por sete dias, seguido por TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GM-CSF e IL-4 por mais sete dias para maturação terminal, obtiveram um rendimento de células dendríticas satisfatório (92%) com fenótipo típico. Entretanto, quando foram analisadas as células geradas em cultura de pacientes haviam recebido talidomida, observou-se significativa redução na expressão de HLA-DR, CD40, CD83 e CD1a.

Diante da perspectiva de um projeto que visa testar a aplicação de uma vacina de células dendríticas para o controle do mieloma múltiplo nos pacientes do Hospital Universitário da UFRJ e frente a uma literatura conflitante quanto à qualidade e quanto ao rendimento na produção destas células em pacientes com esta doença, é necessário um estudo dos parâmetros quantitativos, fenotípicos e funcionais das células dendríticas derivadas de monócitos dos pacientes em questão e compará-las com doadores saudáveis e então definir qual a melhor fonte de células para a vacina, autólogas ou alogênicas.

---

### **1.3 Objetivos**

#### ***1.3.1 Objetivo geral***

Comparar o perfil fenotípico e funcional de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de pacientes portadores de Mieloma Múltiplo (MM), em tratamento de manutenção pós TACTH, e do sangue periférico de doadores saudáveis.

#### ***1.3.2 Objetivos específicos***

Quantificar e caracterizar fenotipicamente células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis e de pacientes portadores de Mieloma Múltiplo;

Avaliar funcionalmente as células dendríticas produzidas através da reação com linfócitos alogênicos;

Quantificar e caracterizar fenotipicamente populações linfóides do sangue periférico de doadores saudáveis e de pacientes portadores de Mieloma Múltiplo, antes e depois do tratamento com drogas imunomoduladoras.

---

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Amostras

Este trabalho faz parte do projeto "Caracterização de Células Dendríticas (DC) em pacientes portadores de Mieloma Múltiplo (MM) submetidos a estratégias terapêuticas baseadas no risco", aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEP-HUCFF) sob o número 215/04-CEP. Todos os doadores, tanto os pacientes do projeto como as pessoas saudáveis usadas como controle, foram voluntários e leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ver em Anexos).

##### 2.1.1.1 Seleção de pacientes

Foram selecionados 17 pacientes portadores de MM em tratamento e que faziam parte de um estudo multicêntrico denominado "Mieloma Múltiplo - Estratégia baseada no risco" (Maiolino e cols., 2009). Este estudo randomizado ocorreu entre setembro de 2004 e outubro de 2008 no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), com um total de 78 pacientes no Rio de Janeiro. O estudo tinha como objetivo validar estratégias terapêuticas distintas em intensidade de acordo com o risco dos pacientes. Dois grupos de risco foram designados, de acordo com a presença de marcadores prognósticos:  $\beta$ 2-microglobulina com ponto de corte em 2,5mg/dL e deleção do cromossoma 13 definido por hibridização *in situ* (FISH). O grupo de alto risco foi definido pela presença destes dois marcadores prognósticos e o grupo de baixo risco foi definido pela presença de no máximo um destes marcadores.

Todos os 17 pacientes selecionados para o trabalho com células dendríticas fizeram parte do grupo de baixo risco descrito acima e tiveram o Mieloma Múltiplo tratado da mesma forma conforme descrito a seguir:

Terapia de indução com três ciclos do protocolo VAD ambulatorial que incluiu: ciclos de Vincristina 0,4mg do D1 ao D4, Andriamicina 9mg/m<sup>2</sup> do D1 ao D4 e Dexametasona 40mg do D1 ao D4 a cada 21 dias. Em seguida foi feita a mobilização de progenitores hematopoiéticos com ciclofosfamida 4g/m<sup>2</sup> associada à G-CSF 10mg/kg/dia para transplante autólogo (TACTH), realizado após regime

---

de condicionamento com protocolo melfalano 200mg/m<sup>2</sup>. Pelo menos 100 dias após o transplante, os pacientes foram randomizados para dois regimes de manutenção distintos por um período de um ano: pulso terapia mensal com 40mg de dexametasona por quatro dias, acompanhada ou não de administração diária de 200mg de talidomida via oral.

Os 17 pacientes deste estudo passaram por pelo menos 100 dias de tratamento de manutenção (mediana de 312 dias), e formaram dois grupos: o primeiro composto por oito pacientes tratados com talidomida (CT) e nove sem talidomida (ST). Alguns pacientes, 11 deste grupo e mais dois que não continuaram o tratamento, foram selecionados para colher amostra antes de iniciar a terapia de manutenção, como controle dos efeitos basais da terapia.

#### *2.1.1.2 Seleção de doadores saudáveis*

Foram selecionados 14 doadores saudáveis que foram entrevistados pelo clínico responsável pelo projeto e cumpriram os requisitos necessários para serem doadores de produtos hematológicos para bancos de sangue (RDC 153 - ANVISA).

### **2.1.2 Reagentes**

#### *2.1.2.1 Anticorpos monoclonais*

Na Tabela 3 estão descritos os anticorpos monoclonais usados para caracterização de linfócitos T e B, células NK (*Natural Killer*), monócitos e células dendríticas, incluindo o clone, o isotipo e o fabricante.

---

**Tabela 3** - Anticorpos monoclonais usados para caracterização das células

<b>Anticorpo anti-</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotipo</b>	<b>Fabricante</b>
CD14	FITC	M5E2	IgG2a	BD - Pharmingen
CD14	PE	TÜK4	IgG2a	Caltag
CD16	PE	3G8	IgG1	BD - Pharmingen
CD1a	PE	HI-149	IgG1	Caltag
CD20	PE	L27	IgG1	BD Biosciences
CD3	PE	SK7	IgG1	BD Biosciences
CD3	FITC	HIT3a	IgG2a	BD - Pharmingen
CD3/CD19/CD45	FITC/PE/PerCP	SK7/SJ25C1/SD1	IgG1/IgG1/IgG1	BD Biosciences
CD4	PerCP	SK3	IgG1	BD Biosciences
CD4/CD8/CD3	FITC/PE/PerCP	SK3/SK1/SK7	IgG1/IgG1/IgG1	BD Biosciences
CD45	FITC	2D1	IgG1	BD Biosciences
CD56	Cy	B159	IgG1	BD - Pharmingen
CD8	PerCP	SK1	IgG1	BD Biosciences
CD80	FITC	MEM-233	IgG1	Caltag
CD86	FITC	BU63	IgG1	Caltag
HLA-DR	PE	L243 (G46-6)	IgG2a	BD Biosciences
HLA-DR	FITC	L243 (G46-6)	IgG2a	BD - Pharmingen
mouse IgG1	PE	X40	IgG1	BD Biosciences
mouse IgG2a/IgG1	FITC/R-PE	X39/2D1	IgG2a/IgG1	Caltag

BD Biociences; Franklin Lakes, NJ, USA

BD Pharmingen; Franklin Lakes, NJ USA

Caltag; Carlsbad, CA, USA.

#### 2.1.2.2 Meios, Proteínas recombinantes e outros reagentes

As soluções abaixo foram preparadas conforme instrução técnica dos seus respectivos fabricantes. Outras soluções citadas no texto, que não estão aqui relacionadas, estão descritas no anexo 6.3.

- GM-CSF – Fator de estimulação de colônias de Granulócitos e Macrófagos (R&D Systems; Mineapolis, MN, USA)

- IL-4 – Interleucina 4 (R&D Systems)

- TNF- $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa (R&D Systems)

- Heparina sódica (Roche; Rio de Janeiro, RJ, Brasil)

- Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB; Uppsala, Sweden)

- Soro fetal bovino (Cultilab; Campinas, SP, Brasil)

- L-Glutamina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA)

- Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich)
- DMSO – Dimetilsulfóxido (Baxter International Inc.; Deerfield, Illinois)
- Fitohemaglutinina (Cultilab)
- Timidina tritiada (##)
- meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)
- Salina tamponada livre de cálcio e magnésio de HANK (Sigma-Aldrich)
- Amido hidroxietílico (HES – B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany)

### **2.1.3 Equipamentos**

- Analisador Hematológico (Horiba-ABX; Montpellier, França)
- Hemocítômetro (Câmara de Neubauer; Optik Labor)
- Microscópio ótico (Askania; Alemanha)
- Microscópio ótico invertido (Nikon; Tokio, Japão)
- FACScalibur (BD Biociences)
- PHD Cell Harvester (Cambridge Technology; Watertown, MA, USA)
- Liquid Scintillation Counter LS 6500 (Beckman Coulter; Fullerton, CA, USA)
- Estufa de Cultura (Sheldon Manufacturing Inc.; Oregon, USA)
- Cabine de Fluxo Laminar (Trox do Brasil LTDA; São Paulo, Brasil)

## **2.2 Método**

### **2.2.1 Coleta de amostras de sangue periférico**

As amostras de sangue foram colhidas no Serviço de Hematologia do HUCFF, em seringas descartáveis de 20mL contendo heparina sódica suficiente para 10 e 20U/mL de sangue, sendo 40mL de sangue periférico dos pacientes portadores de MM e 20mL de sangue periférico dos doadores saudáveis. As amostras foram transportadas em frascadeiras com gelo reciclável (temperatura não controlada) até o laboratório onde foram manipuladas e armazenadas em refrigerador ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) por no máximo 2 horas até o momento da manipulação.

---

### **2.2.2 Obtenção de células mononucleares**

A metodologia para obtenção de células mononucleares usada seguiu as orientações do fabricante do Ficoll usado, com as modificações abaixo.

O conteúdo da(s) seringa(s) foi transferido para tubo Falcon de 50mL e homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur. Foram reservados 4mL de sangue total em tubo Falcon de 5mL para citometria de fluxo e hemograma. Cada 20 mL de sangue foi adicionado a um tubo Falcon de 50mL diferente e centrifugado (2500rpm/10min). O plasma total (sobrenadante) foi retirado e congelado em tubo Falcon de 15mL. As células do sedimento foram ressuspensas em volume de solução salina de Hank livre de cálcio e magnésio (BSS-CMF) equivalente a duas vezes o volume de sangue centrifugado. Nesta suspensão foram adicionadas 20U/mL de heparina sódica. Após homogeneização, cada 40mL desta suspensão foram adicionados lentamente sobre 10mL de Ficoll em tubo Falcon de 50mL e então centrifugados (2000rpm/15min). O anel de células mononucleares formado sobre o Ficoll foi retirado com o auxílio de pipeta Pasteur, transferido para um tubo Falcon de 50mL e lavado três vezes com BSS-CMF gelada (1500rpm/10min). Após a última lavagem, as células do sedimento foram ressuspensas em 1mL de meio RPMI suplementado (meio para cultura de células RPMI 1640 com 10% soro fetal bovino – SFB, Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL e L-Glutamina 2mM) e contadas em hemocítmetro por microscopia ótica. Uma amostra de  $1 \times 10^5$  células foi retirada para avaliação por citometria de fluxo (fração pré-adesão).

### **2.2.3 Obtenção de células dendríticas**

As células dendríticas foram diferenciadas seguindo o protocolo de Barbuto e colaboradores (2004). Para tanto, uma suspensão celular contendo entre  $5$  e  $7 \times 10^6$  células mononucleares em cada 1mL de RPMI suplementado foi colocada em placas de Petri de 35mm de polipropileno tratadas para adesão celular. Estas placas foram incubadas por duas horas em estufa à 37°C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e câmara úmida (formada por placas de Petri de vidro de 90mm contendo um recipiente com 4mL de água tridestilada estéril). Terminado o período de incubação, as placas foram levemente agitadas para ressuspender as células não-aderentes e os sobrenadantes de cada uma foram reservados individualmente. Em

---

seguida, as placas foram cuidadosamente lavadas três vezes com BSS-CMF a 37°C para remover as células não-aderentes restantes.

Em cada placa foi adicionado 1mL de meio para diferenciação de DC (meio para cultura de células RPMI 1640, 10% SFB, Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL, L-Glutamina 2mM, 50ng/mL de GM-CSF e 50ng/mL de IL-4) seguido de uma incubação por 5 dias em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em câmara úmida. No terceiro dia de incubação, metade do meio de cultura de cada placa foi trocada por 0,5mL de meio para diferenciação de DC contendo o dobro da concentração de citocinas (100ng/mL de GM-CSF e IL-4). No quinto dia, metade do meio de cultura de cada placa foi trocada por 0,5mL de meio de maturação de DC (meio para cultura de células RPMI 1640, 10% SFB, Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL, L-Glutamina 2mM, 100ng de GM-CSF/mL, 100ng de IL-4/mL e 100ng de TNF-α/mL). Em seguida as células foram incubadas por dois dias em estufa à 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em câmara úmida. Após o término desta incubação, as placas foram vigorosamente agitadas com o auxílio de pipetas Pasteur para soltar as células fracamente aderidas e homogeneizar as células não-aderidas. Os sobrenadantes foram reservados e as placas foram lavadas duas vezes com BSS-CMF gelada.

Foram definidas individualmente as concentrações celulares dos sobrenadantes de cada placa em hemocitômetro por microscopia ótica. As suspensões celulares foram centrifugadas (1500rpm/10min) e os sobrenadantes de cada placa foram retirados e congelados a -80°C em tubos para criogenia. As células do sedimento de cada tubo foram ressuspensas com a BSS-CMF usada para lavar as placas e centrifugadas (1500rpm/10min). As células foram ressuspensas com 1mL de RPMI suplementado e a concentração celular foi determinada em hemocitômetro por microscopia ótica. Uma amostra de até 5x10<sup>5</sup> células (dependendo da disponibilidade) foi reservada para ser avaliada por citometria de fluxo e 4x10<sup>5</sup> células foram reservadas para ensaio de proliferação de linfócitos. As células que não foram usadas no mesmo dia foram centrifugadas (1500rpm/10min) e ressuspensas em 1 mL de SFB, acrescido de 1mL de solução crioprotetora (meio para cultura de células RPMI 1640, Penicilina 100U/mL, Estreptomicina 100µg/mL, L-Glutamina 2mM e 20% DMSO), divididas em dois tubos para criogenia e congeladas à -80°C. Depois de 24 horas foram armazenados em nitrogênio líquido.

---

#### **2.2.4 Obtenção de suspensão celular enriquecida em linfócitos T autólogos**

O conteúdo da primeira lavagem de cada placa, após a incubação para adesão de monócitos, foi adicionado ao primeiro sobrenadante reservado e o total de células não aderentes retiradas de até quatro placas foi individualmente definida em hemocítômetro por microscopia ótica. As células não-aderentes foram colocadas em um único tubo e centrifugadas (1500rpm/10min). As células do sedimento foram ressuspensas em 1mL de SFB e a concentração foi definida em hemocítômetro por microscopia ótica. Uma amostra de  $1 \times 10^5$  células foi retirada para avaliação por citometria de fluxo (fração pós-adesão) e ao restante da suspensão celular foi adicionado 1mL de solução crioprotetora. A suspensão celular foi dividida em dois tubos para criogenia que foram congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  e depois de 24 horas foram armazenados em nitrogênio líquido.

#### **2.2.5 Obtenção de suspensão celular enriquecida em linfócitos T alogênicos**

Foi utilizada uma técnica de separação de linfócitos T com lã-de-nylon, usada rotineiramente no LABCAM, para obter uma fração enriquecida em linfócitos T a partir de células mononucleares obtidas (segundo 2.2.2) de *buffy-coat* de doadores voluntários de sangue do Serviço de Hemoterapia do HUCFF.

A lã de nylon foi previamente preparada, fazendo digestão de proteínas com HCL 0,1N e seis subseqüentes fervuras por 15 minutos com água destilada. Após secar em estufa embrulhada em papel alumínio, 1,8g da lã de nylon foi desfiada e empacotada dentro de seringas de 20mL sem o êmbolo. As colunas de separação (seringas contendo lã de nylon) foram embrulhadas com papel alumínio e esterilizadas individualmente em autoclave. Esta coluna foi usada dentro de uma cabine de fluxo laminar, na vertical com a ponta para baixo, onde foi acoplado um distribuidor de três vias. Com o distribuidor na posição fechada, foi adicionado RPMI suplementado com somente 5% de SFB (RPMI 5% SFB) suficiente para encher a seringa até 2mL acima do nível da lã. Foi usada uma agulha estéril para retirar as bolhas de ar e auxiliar a compactação da lã. A coluna foi então lavada com 50mL de RPMI 5% SFB, retirada do suporte, embrulhada com papel alumínio estéril e guardada em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 45 minutos.

---

Após esta incubação, a coluna foi recolocada no suporte e novamente lavada com 20mL de RPMI 5% SFB.

Na coluna já estabilizada, foram adicionadas até  $3 \times 10^8$  células mononucleares, isoladas previamente por centrifugação com Ficoll de 20mL de *buffy-coat*, e ressuspensas em 2mL de RPMI 5% SFB. Abrimos levemente a coluna, repondo o meio no mesmo ritmo em que a coluna esvaziava, até o meio começar a sair turvo. Neste momento a coluna foi fechada, o volume foi ajustado para ter aproximadamente 2mL de meio acima da Lã. Depois a coluna foi removida cuidadosamente do suporte, re-embalada com papel alumínio estéril e colocada na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 45 minutos. Após o tempo de incubação, a coluna foi remontada no suporte e lavada com 40mL de RPMI 5% SFB. No caso de entupimento da coluna, uma seringa de 5mL descartável foi acoplada no distribuidor de 3 vias para realizar pressão negativa na coluna e reativar o fluxo de escoamento.

As células que passaram pela coluna foram centrifugadas (1500rpm/10min) e depois lavadas duas vezes com BSS-CMF. Por último, as células foram ressuspensas em 2mL de SFB e contadas usando hemocítômetro. O volume foi reajustado de forma a ter até 20 criotubos com de  $1-2 \times 10^7$  células em 0,5mL de SFB. Um volume igual de solução crioprotetora foi distribuído nos tubos para criogenia, já rotulados, que foram congelados -80°C. Após 24 horas, os criotubos foram transferidos para container de nitrogênio líquido para armazenamento.

### **2.2.6 Fenotipagem por citometria de fluxo**

Para a fenotipagem de células por citometria de fluxo foram usadas metodologias estabelecidas no LABCAM.

#### **2.2.6.1 Células do sangue periférico**

Após a leitura do hemograma no Analisador Hematológico, no mesmo tubo foi adicionado uma parte de amido hidroxietílico (solução a 6% de amido hidroxietílico em solução salina contendo 0,1% de azida sódica) para cada cinco partes de sangue periférico. Depois de 30 minutos de sedimentação natural, a fração de plasma rica em leucócitos foi retirada com pipeta e transferida para um tubo Falcon de 15mL seguindo-se duas lavagens (2500rpm/5min) com PBS 0,15M

---

NaCl (solução isotônica de cloreto de sódio tamponada com fosfato, contendo 0,1% de azida sódica) pH=7,4. Após a última lavagem, o sedimento foi ressuspenso com 1mL de BSS-FACS (solução salina tamponada para citometria de fluxo contendo 0,2% de albumina bovina e 0,1% de azida sódica) e 50µL desta suspensão celular foram transferidos para 13 tubos Falcon para citometria. As frações pré e pós-adesão, reservadas durante os procedimentos descritos nos itens 2.2.2 e 2.2.4, foram lavadas uma vez com 3mL de PBS (2500rpm/5min) e uma vez com 1mL de BSS-FACS (1500rpm/5min) em tubo Falcon para citometria. Após desprezar o sobrenadante da última lavagem, o sedimento continha aproximadamente 50µL de BSS-FACS.

Depois da adição de 10µL de soro de camundongo (soro de camundongo diluído 1/5 com PBS) aos tubos destinados à marcação de monócitos (identificados com \* na tabela abaixo), os tubos foram incubados por 10 minutos no gelo para saturar os receptores inespecíficos. Em seguida foram adicionamos os anticorpos monoclonais, previamente titulados, marcados com os fluorocromos FITC, PE, Cy e PercP, seguindo-se uma incubação por 30 minutos no gelo, de acordo com a identificação descrita na tabela a seguir:

<b>Tubo</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>
1	-	-
2	Mouse IgG1	PE
3	CD45	FITC
4	CD4/CD8/CD3	FITC/PE/PercP
5	CD3/CD19/CD45	FITC/PE/PercP
6	CD3/CD16/CD56	FITC/PE/Cy
7	HLA-DR/CD3/CD4	FITC/PE/PercP
8	HLA-DR/CD3/CD8	FITC/PE/PercP
9	HLA-DR/CD20	FITC/PE
10	-	-
11*	Mouse IgG1	PE
12*	CD14	PE
13*	CD14/HLA-DR	FITC/PE
Pré*	CD45/CD14	FITC/PE
Pós*	CD45/CD14	FITC/PE

Após o período de incubação com os anticorpos, 0,5mL de solução hemolítica (suplementada com 5% de soro fetal bovino e 0,1% de azida sódica) foram adicionamos aos tubos de citometria, seguindo-se uma incubação por 6 minutos na temperatura ambiente, protegidos da luz. As células foram centrifugadas

(1500rpm/5min), lavadas uma vez com PBS (1500rpm/5min) e ressuspensas com 400µL de paraformaldeído (paraformaldeído 1% em PBS 0,15M NaCl, contendo 0,1% de azida sódica). Os tubos foram guardados na geladeira envoltos em papel alumínio para serem lidos no citômetro de fluxo no dia seguinte.

#### 2.2.6.2 Células dendríticas

A amostra separada no item 2.2.3 acima foi lavada com 5mL de PBS (1500rpm/5min) e em seguida com 1mL de BSS-FACS (1500rpm/5min). O sedimento foi ressuspensado em 350µL de BSS-FACS e 70µL de soro de camundongo seguindo-se uma incubação por 10 minutos no gelo. Após esta incubação, o volume homogeneizado foi distribuído em sete tubos Falcon de citometria (60µL por tubo) e os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos FITC e PE foram adicionados, seguindo-se uma incubação por 30 minutos no gelo, de acordo com a tabela a seguir:

<b>Tubo</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fluorocromo</b>
1	-	-
2	Mouse IgG2a/Mouse IgG1	FITC/PE
3	CD45	FITC
4	HLA-DR	PE
5	CD86/CD1a	FITC/PE
6	CD80	FITC
7	CD14	PE

Após o período de incubação dos anticorpos, as células foram lavadas com 3mL de PBS (1500rpm/5min) e ressuspensas com 0,4mL de paraformaldeído. Os tubos foram guardados na geladeira envoltos em papel alumínio para serem lidos no citômetro de fluxo no dia seguinte.

#### 2.2.7 Ensaio de proliferação de linfócitos

A amostra de células dendríticas separada no item 2.2.3 foi diluída com RPMI suplementado em três diferentes concentrações: A)  $4 \times 10^5$  células em 4mL; B) 1,5mL da suspensão A adicionados a 1,5mL de meio; C) 240µL da suspensão B adicionados a 960µL de meio. Em uma placa de 96 poços de fundo reto, 100µL das suspensões A e C foram adicionados em nove poços diferentes e da B em 12

poços diferentes. Aos outros 18 poços que seriam posteriormente usados e a três poços contendo a suspensão B de células dendríticas (para controle de ausência de proliferação da amostra), foram adicionamos 100µL de RPMI suplementado. A placa foi irradiada (3000rads) no Serviço de Radioterapia do HUCFF para garantir que não haveria proliferação desta fração celular.

Três amostras de linfócitos foram descongeladas para cada experimento: uma autóloga e duas alogênicas. As células foram lavadas uma vez com 5mL de RPMI puro e uma vez com RPMI suplementado (1500rpm/5mim), ressuspensas com 1mL deste meio e contadas em hemocitômetro por microscopia ótica. Uma alíquota de  $3 \times 10^6$  células foi retirada de cada suspensão de linfócitos T (TL) e adicionada a três tubos Falcon de 15mL diferentes e o volume de cada uma foi completado para 3mL. Em seguida, 100µL de cada uma das suspensões de linfócitos T foram adicionados a três poços de cada suspensão de células dendríticas e a 6 poços contendo somente RPMI suplementado. Em três dos seis poços que receberam somente linfócitos T (três de cada tipo de linfócito T) e meio para cultura celular, 10µL de uma suspensão contendo 6,25µg de fitohemaglutinina (previamente titulada) foram adicionados como controle positivo de proliferação. Os outros três poços foram considerados controle negativo de proliferação. Em seguida está descrito o mapa da placa no anexo 6.4.

As células foram incubadas por 96 horas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Nas últimas 18 horas de incubação, foi adicionado 1µCi de timidina marcada com trítio (timidina [3H]) em 10µL de RPMI suplementado por poço e a placa foi recolocada na estufa. No final de 96 horas, a placa foi congelada em freezer a -20°C para posterior quantificação da timidina incorporada pelos linfócitos em proliferação.

No dia da análise da incorporação de timidina tritiada, a placa de 96 poços foi descongelada e o conteúdo de cada poço foi coletado (PHD Cell Harvester) e adicionado sobre um disco circular de papel de filtro. Estes discos foram lavados três vezes com água destilada para remover o excesso de timidina radioativa não incorporada e secados com álcool 70°GL. Cada disco foi colocado em um frasco de vidro contendo 5mL de líquido de cintilação (PPO 6g + POPOP 0,12g + tolueno q.s.p. 1L) e os frascos tiveram a cintilação quantificada em contador de cintilação de líquidos (LS 6500). Cada frasco de vidro foi previamente avaliado

---

para excluir os que apresentavam cintilação positiva antes da adição do conteúdo celular.

Os valores de cintilações por minuto (CPM) das amostras de linfócitos T que proliferaram estimulados por células dendríticas foram normalizados para gerar o Índice de Proliferação (IP), usando o seguinte cálculo:

$$\text{IP TL} = (\text{CPM de TL estimulado}) / (\text{CPM de TL sem estímulo})$$

Os resíduos gerados por este ensaio foram recolhidos em garrafas de vidro e levados para o Serviço de Radioterapia do HUCFF para serem descartados conforme as normas definidas pelo Comitê de Descarte de Resíduos da instituição.

### **2.3 Análises estatísticas**

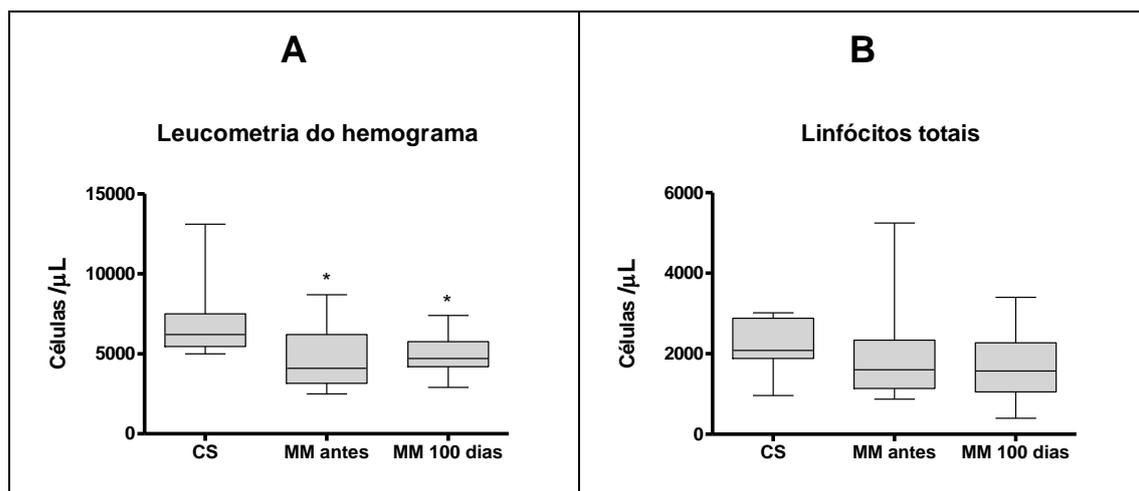
Neste trabalho foram avaliadas somente variáveis contínuas e estas foram representadas pela mediana com limites mínimo e máximo. Para comparação entre as medianas foi aplicado o teste *t* não pareado e não paramétrico (Mann-Whitney). Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Para os cálculos das análises estatísticas foi usado o programa GraphPad Prism versão 4.0 para Windows (GraphPad Soft., San Diego CA).

---

### 3 RESULTADOS

Os pacientes selecionados apresentaram mediana de idade de 59 anos (37-65) sendo 64,7% do gênero masculino e 35,3% do gênero feminino. A distribuição dos pacientes quanto à classe de imunoglobulina secretada foi: IgG em 11 pacientes, IgA em cinco pacientes e cadeia leve em três. Quanto ao estadiamento da doença no diagnóstico, segundo os critérios de estadiamento Durie, nove pacientes tinham evoluído até o estágio II e 10 pacientes até o estágio III. Segundo o estadiamento do ISS (*International Score System*), sete pacientes apresentavam estágio I, nove pacientes o estágio II e três pacientes o estágio III. Estas proporções foram equivalentes nos subgrupos estudados. Os doadores saudáveis apresentaram mediana de idade de 31 anos (20-57), sendo 35,8% do gênero masculino e 64,2 do gênero feminino (Tabela 4).

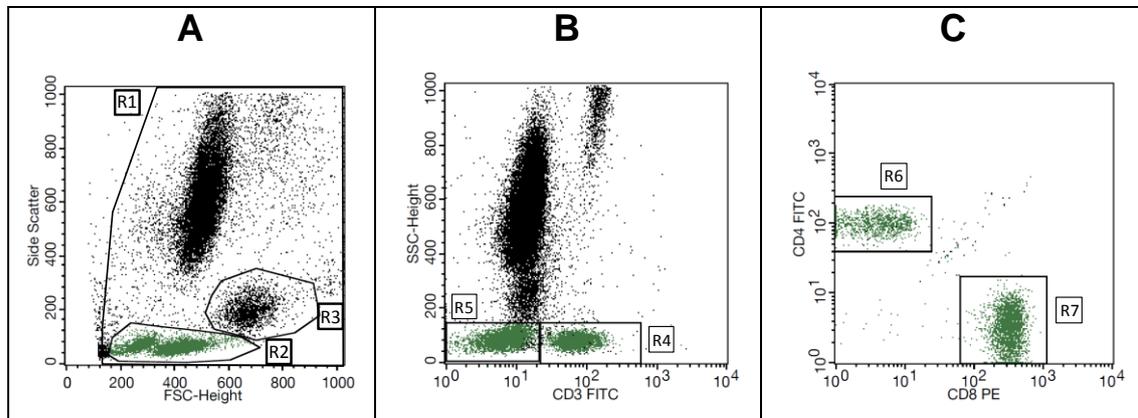
Os pacientes portadores de MM, antes e após terapia de manutenção, apresentaram significativamente menos leucócitos totais no sangue periférico do que os controles saudáveis. Notamos também uma discreta diminuição na população global de linfócitos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 8). Não foram detectadas diferenças significativas entre os dois estágios de tratamento, antes e após terapia de manutenção, e entre as duas terapias de manutenção, com ou sem talidomida (Tabela 4).



**Figura 8** – Representação gráfica da leucometria e linfometria dos integrantes do estudo – Dados da Tabela 4

**CS**, Controles Saudáveis; **MM antes**, Pacientes com MM antes do tratamento de manutenção; **MM 100 dias**, Pacientes com MM com pelo menos 100 dias de tratamento de manutenção. \* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando com controles saudáveis.

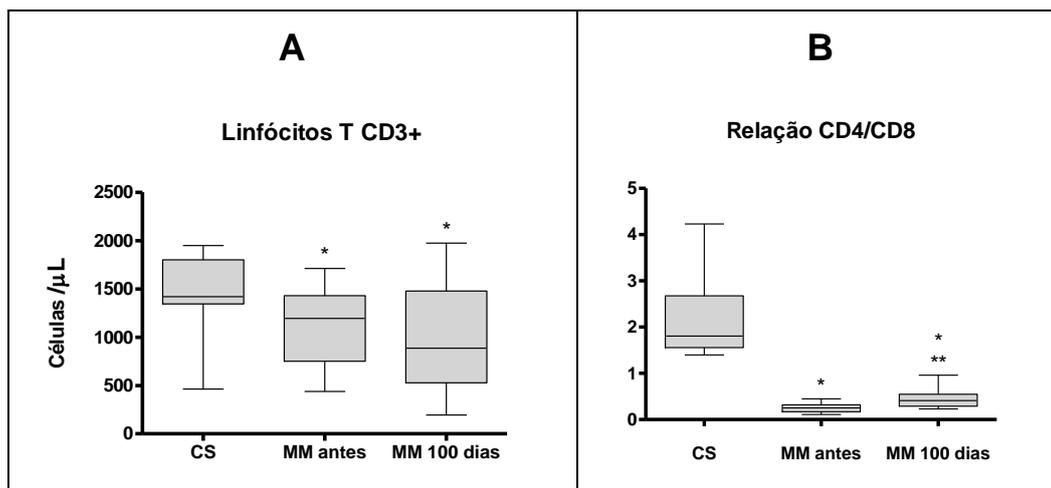
Para a caracterização fenotípica dos linfócitos T do sangue periférico foram usados os seguintes marcadores: CD3, CD4 e CD8 (Figura 9).



**Figura 9** – Análise de linfócitos T por citometria de fluxo

Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x FSC, y SSC) está representado *dot plot* de leucócitos totais; **R1** = leucócitos totais; **R2** = células linfocitóides; **R3** = células monocitóides. Em **B** (x CD3FITC, y SSC) está representado *dot plot* de R1; **R4** = Linfócitos T CD3+; **R5** = células CD3- com complexidade equivalente a células linfocitóides. Em **C** (x CD8PE, y CD4FITC) está representado *dot plot* de R4; **R6** = linfócitos T CD4+CD8-; **R7** = linfócitos T CD4-CD8+.

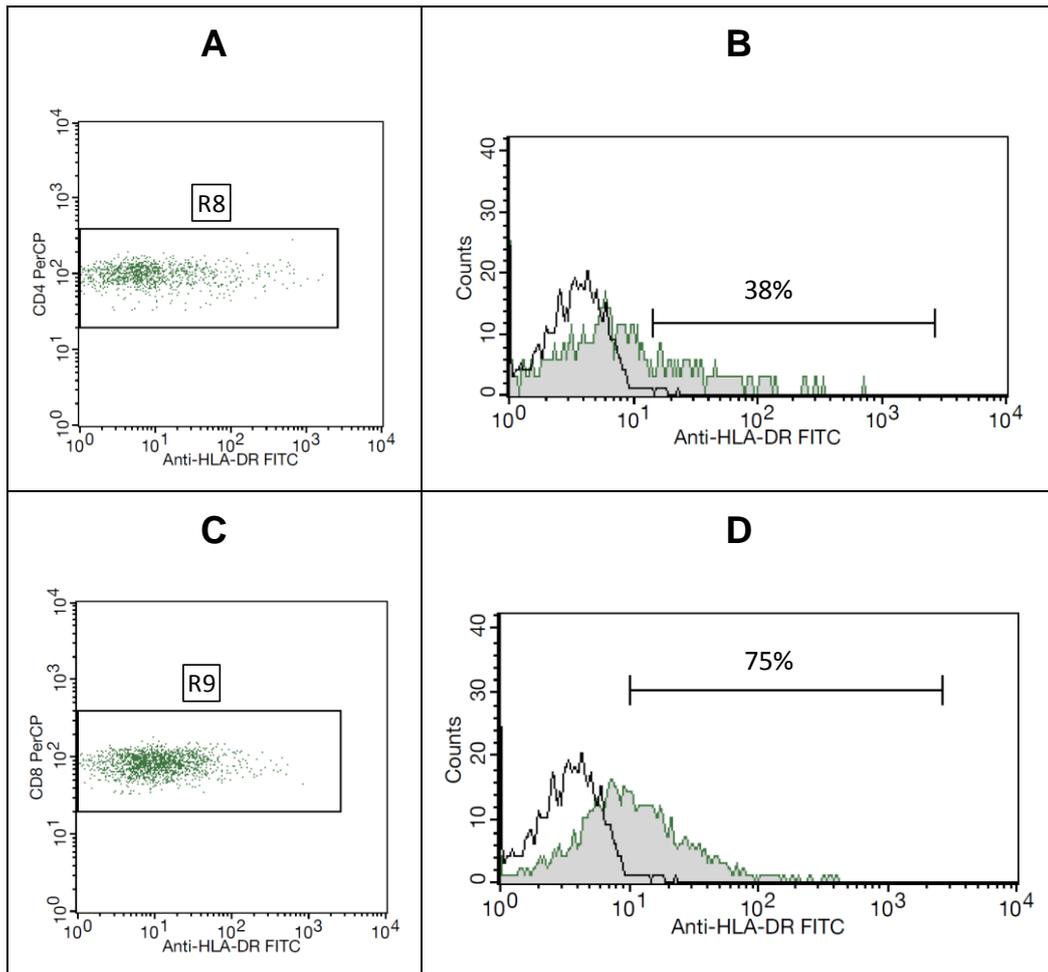
Como representado na Figura 10A, o número de linfócitos T CD3+ foi significativamente menor nos pacientes portadores de MM, antes ou depois do tratamento de manutenção, em relação aos controles saudáveis (Tabela 7). O transplante autólogo de células tronco hematopoiéticas (TACTH), usado como terapia de intensificação nos pacientes com MM, gerou uma inversão na relação entre as subpopulações de linfócitos T CD4+ e CD8+ (Figura 10B). Foi observada uma tendência de recuperação destas subpopulações entre os grupos de pacientes nos dois diferentes momentos: antes de começar o tratamento de manutenção e após 100 dias de tratamento, revelada pela alteração significativa da relação CD4+/CD8+ (Tabela 7, de 0,25 para 0,41).



**Figura 10** – Representação gráfica de linfócitos T totais e da relação CD4/CD8 – Dados da Tabela 7

**CS**, Controles Saudáveis; **MM antes**, Pacientes com MM antes do tratamento de manutenção; **MM 100 dias**, Pacientes com MM com pelo menos 100 dias de tratamento de manutenção. \* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando com controles saudáveis; \*\* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando com pacientes portadores de MM antes da terapia de manutenção.

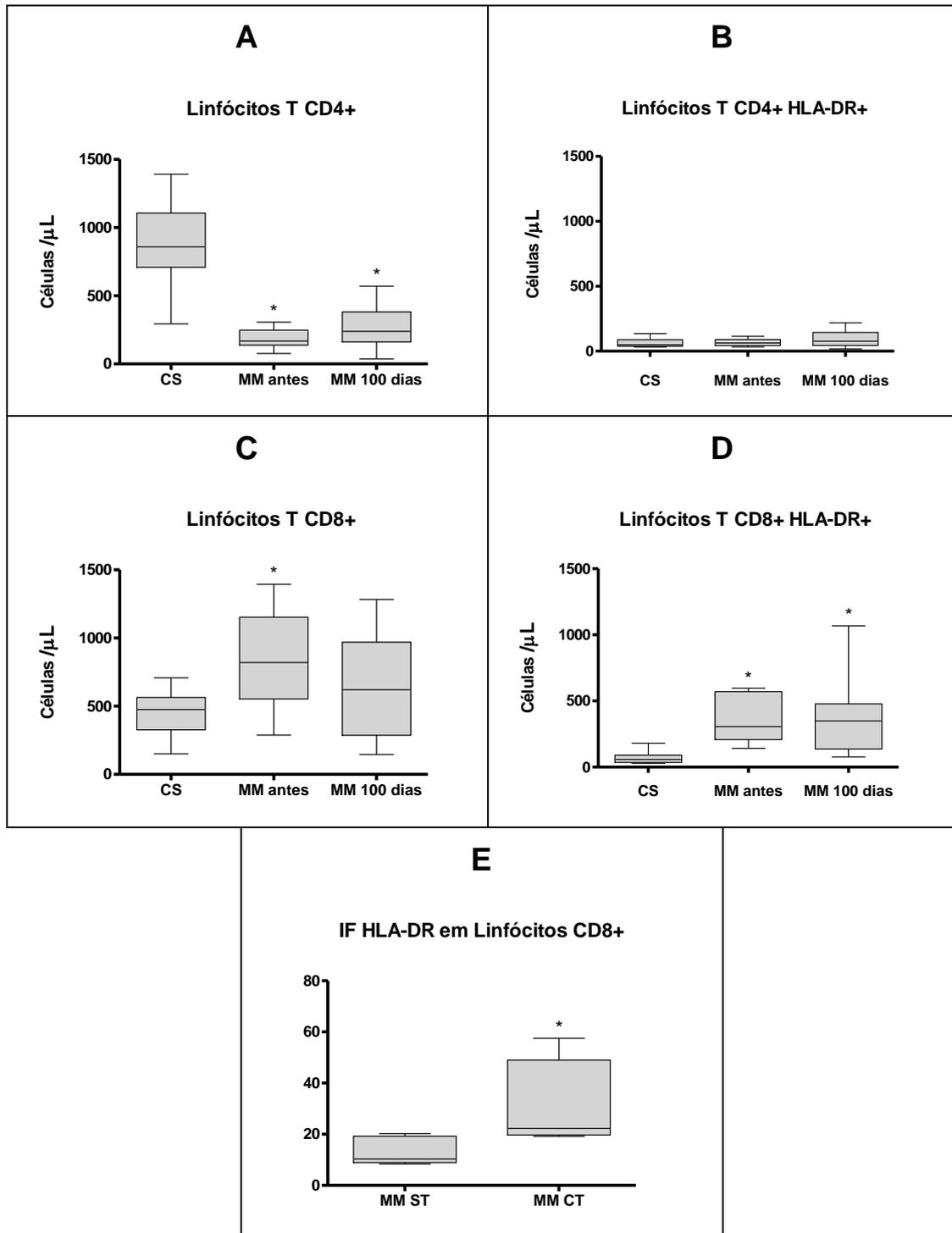
Foi demonstrada a presença de subpopulações de linfócitos T CD3+ e CD4+ ou CD3+ e CD8+ ativados, caracterizados pela marcação positiva para HLA-DR nestas células (Figura 11). Apesar dos pacientes pós TACTH apresentarem níveis significativamente menores de linfócitos T CD3+ e CD4+, não foram encontradas diferenças nos valores totais de linfócitos T CD3+ e CD4+ ativados (Figura 12A e Figura 12B; Tabela 7 e Tabela 8). No entanto, a subpopulação de linfócitos T CD3+ e CD8+ ativados teve o mesmo padrão de aumento da população global, obtendo diferenças significativas nos valores globais em pacientes antes e depois do tratamento de manutenção quando comparados aos controles saudáveis (Figura 12C e Figura 12D; Tabela 7 e Tabela 8).



**Figura 11** – Análise de linfócitos T ativados por citometria de fluxo

Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x HLA-DRFITC, y CD4PerCP) está representado *dot plot* de linfócitos CD3+CD4+. Em **B** histograma de HLA-DRFITC em linfócitos CD3+CD4+ em R8. Em **C** (x HLA-DRFITC, y CD8PerCP) está representado *dot plot* de linfócitos CD3+CD8+. Em **D** histograma de HLA-DRFITC em linfócitos CD3+CD8+ em R9.

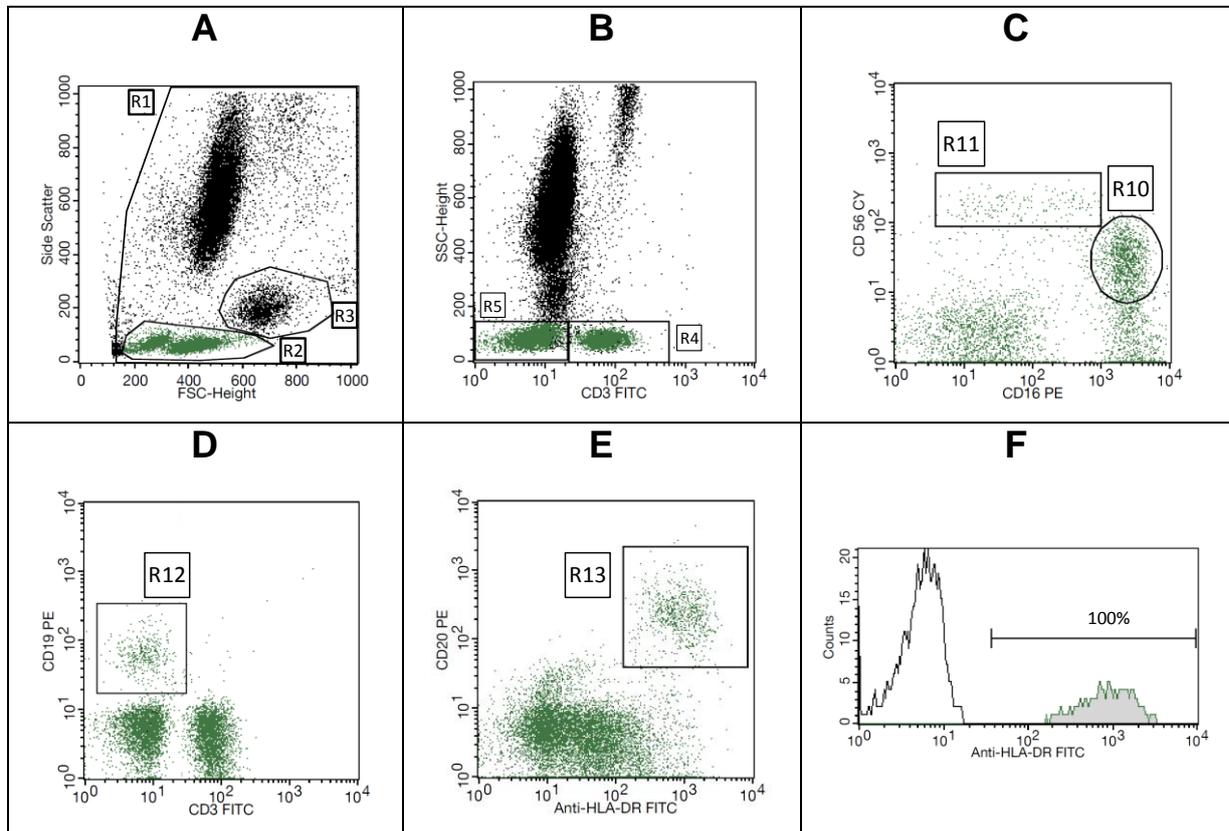
A intensidade de fluorescência do HLA-DR (IF HLA-DR) das duas subpopulações de linfócitos T CD3+ não apresentou diferenças significativas nos pacientes, antes e depois do tratamento de manutenção, quando comparadas com os valores dos controles saudáveis (Tabela 7). No entanto, quando os pacientes tratados são separados pela administração de talidomida, aqueles que fizeram uso deste medicamento apresentaram maiores intensidades de fluorescência para este marcador nas células CD3+CD8+ mas não nas células CD3+CD4+ (Figura 12E).



**Figura 12** – Representação gráfica do total das subpopulações de linfócitos T ativados e IF do HLA-DR em linfócitos T CD8 – Dados das Tabela 7 e Tabela 8

**CS**, Controles Saudáveis; **MM antes**, Pacientes com MM antes do tratamento de manutenção; **MM 100 dias**, Pacientes com MM com pelo menos 100 dias de tratamento de manutenção; **MM ST**, Pacientes em tratamento de manutenção sem talidomida; **MM CT**, Pacientes em tratamento de manutenção com talidomida. \* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando com controles saudáveis.

Para a caracterização fenotípica das células NK do sangue periférico foram usados os seguintes marcadores: CD3, CD16 e CD56. Para a caracterização fenotípica dos linfócitos B do sangue periférico foram usados os seguintes marcadores: CD19 e CD20 (Figura 13).



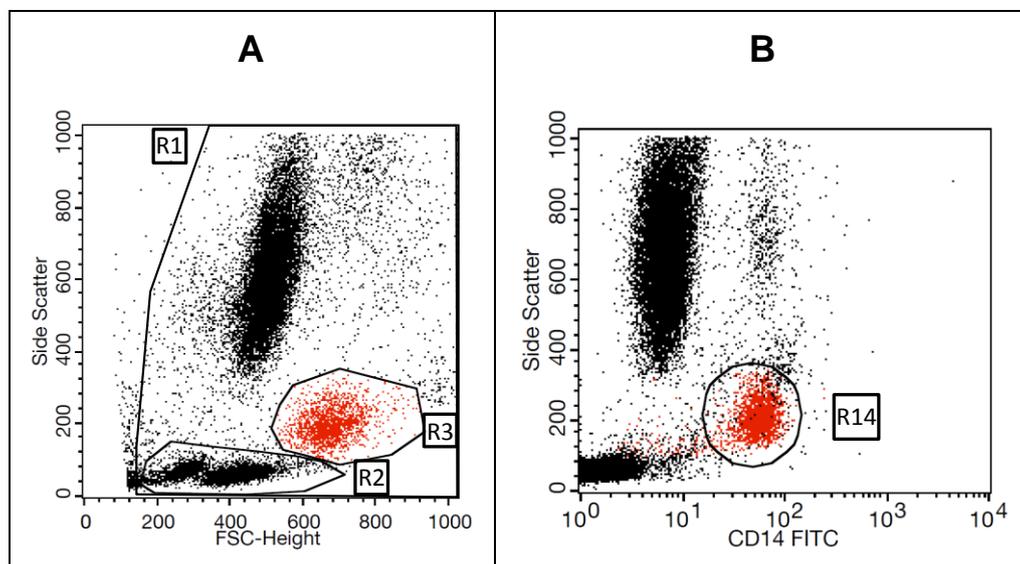
**Figura 13** – Análise de células NK e linfócitos B por citometria de fluxo

Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x FSC, y SSC) está representado *dot plot* de leucócitos totais; **R1** = leucócitos totais; **R2** = células linfocitóides; **R3** = células monocitóides. Em **B** (x CD3FITC, y SSC) está representado *dot plot* de R1; **R4** = Linfócitos T CD3+; **R5** = células CD3- com complexidade equivalente a células linfocitóides. Em **C** (x CD16PE, y CD56Cy) está representado *dot plot* de R5; **R10** = células NK CD56+CD16bright; **R11** = células NK CD56brightCD16low-. Em **D** (x CD3 FITC, y CD19PE) está representado *dot plot* de R2; **R12** = linfócitos B CD19+CD3-. Em **E** (x CD20PE, y HLA-DRFITC) está representado *dot plot* de R3; **R13** = linfócitos B CD20+HLA-DR+. Em **F** histograma de HLA-DRFITC em linfócitos B CD20+ de R13.

Não foram observadas diferenças significativas, entre nenhum dos grupos estudados, na subpopulação de células NK CD3-CD56+CD16bright. Apesar de um discreto aumento influenciado pela administração de talidomida, a subpopulação de células NK CD3-CD56brightCD16low- também não apresentou diferenças significativas (Tabela 7 e Tabela 8).

Não foram observadas diferenças significativas entre controles saudáveis e pacientes antes e depois do tratamento, nem entre os pacientes tratados com ou sem talidomida, para a população de linfócitos B CD19+ (Tabela 7 e Tabela 8). Todos os linfócitos B caracterizados pelo marcador CD20 se mostraram positivos para e com alta expressão de HLA-DR, como demonstrado nas Figura 13B e Figura 13F. Entretanto, o índice de fluorescência deste marcador nos linfócitos B CD20+ foi maior nos pacientes após o tratamento de manutenção, em relação aos controles saudáveis (Tabela 7). Da mesma forma que na subpopulação de linfócitos T CD3+ e CD8+ ativados, a talidomida, aparentemente, pode também gerar aumento na intensidade de fluorescência do HLA-DR nos linfócitos B CD20+ (Tabela 8).

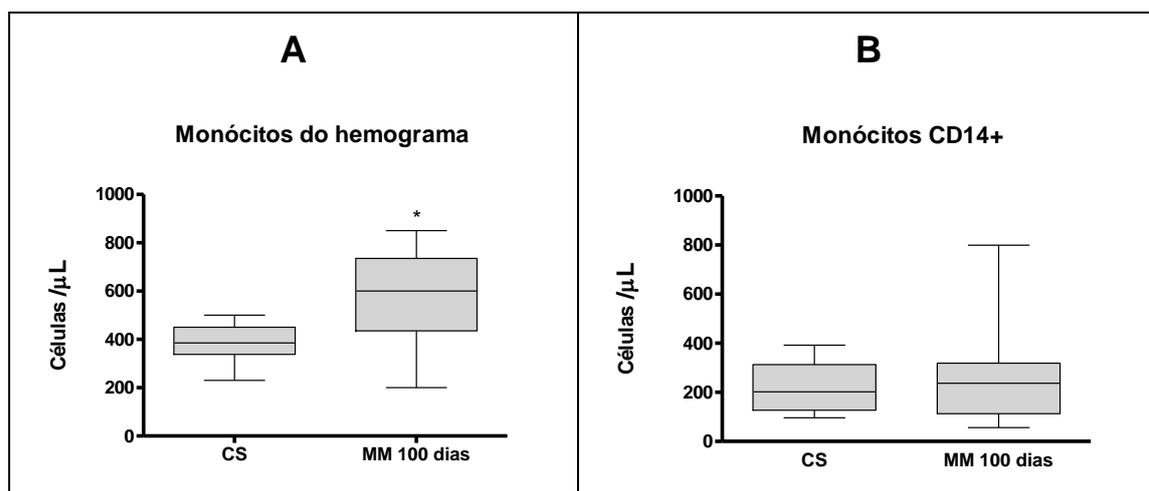
Na Tabela 4 também é possível observar que a quantidade de monócitos no hemograma dos pacientes após a terapia de manutenção foi maior, tanto em relação aos controles saudáveis quanto em relação aos pacientes antes do tratamento. Estes monócitos também foram caracterizados por citometria de fluxo, usando o marcador CD14 (Figura 14).



**Figura 14** – Análise de monócitos CD14+ por citometria de fluxo

Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x FSC, y SSC) está representado *dot plot* de leucócitos totais; **R1** = leucócitos totais; **R2** = células monocitóides; **R3** = células linfocitóides. Em **B** (x CD14FITC, y SSC) está representado *dot plot* de R1; **R4** = células CD14+ com complexidade equivalente a células monocitóides.

Os resultados descritos na Tabela 5 mostram que depois desta marcação não foi possível encontrar diferenças significativas entre a quantidade de monócitos CD14+ de controles saudáveis e de pacientes tratados, ao contrário do que foi demonstrado pelo hemograma (Figura 15). Não foram encontradas diferenças entre pacientes tratados que fizeram ou não fizeram uso da talidomida (Tabela 6).

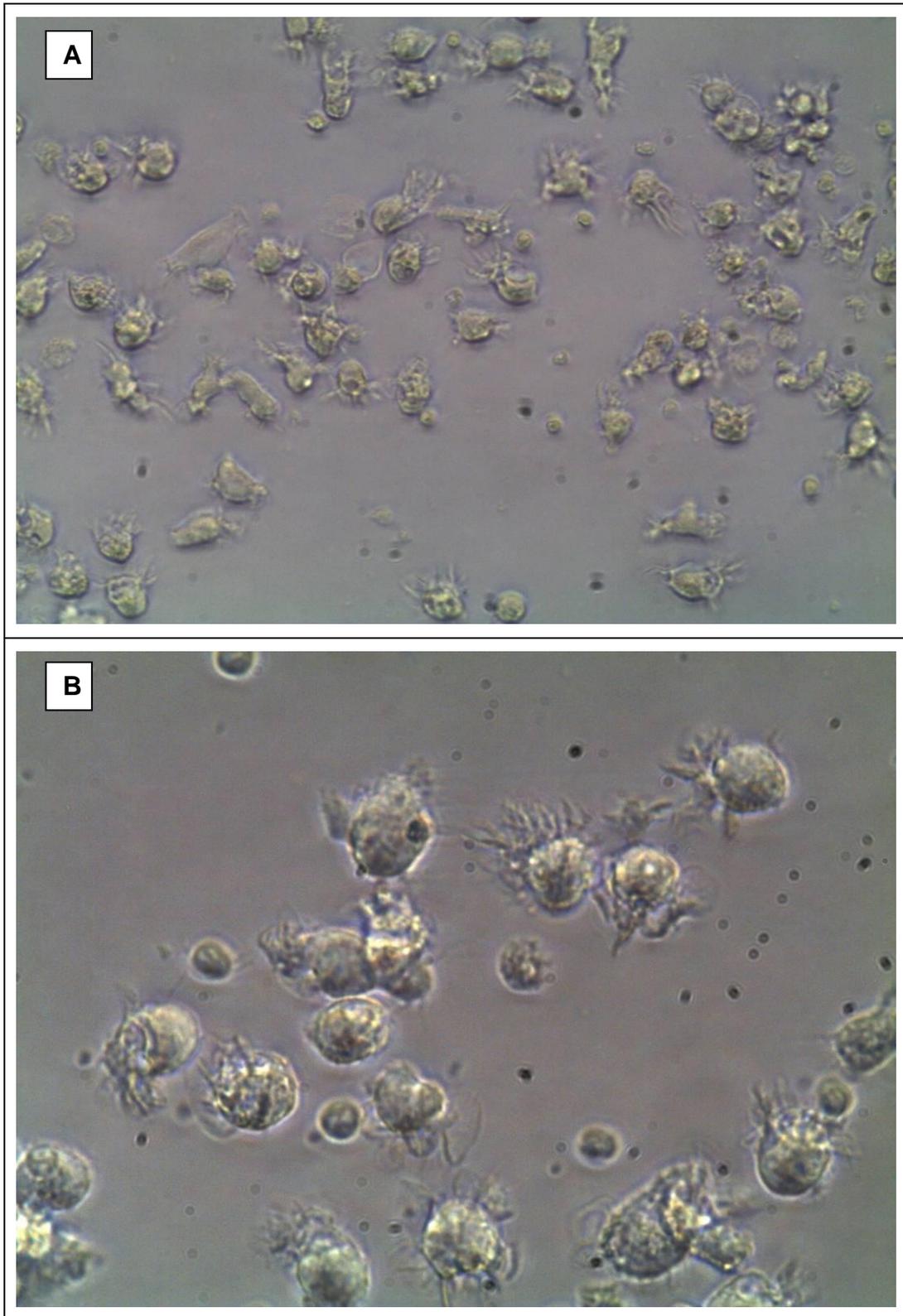


**Figura 15** – Representação gráfica da quantidade de monócitos no hemograma e de monócitos CD14+ por citometria de fluxo – Dados da Tabela 5

**CS**, Controles Saudáveis; **MM 100 dias**, Pacientes com MM com pelo menos 100 dias de tratamento de manutenção. \* representa diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) comparando com controles saudáveis.

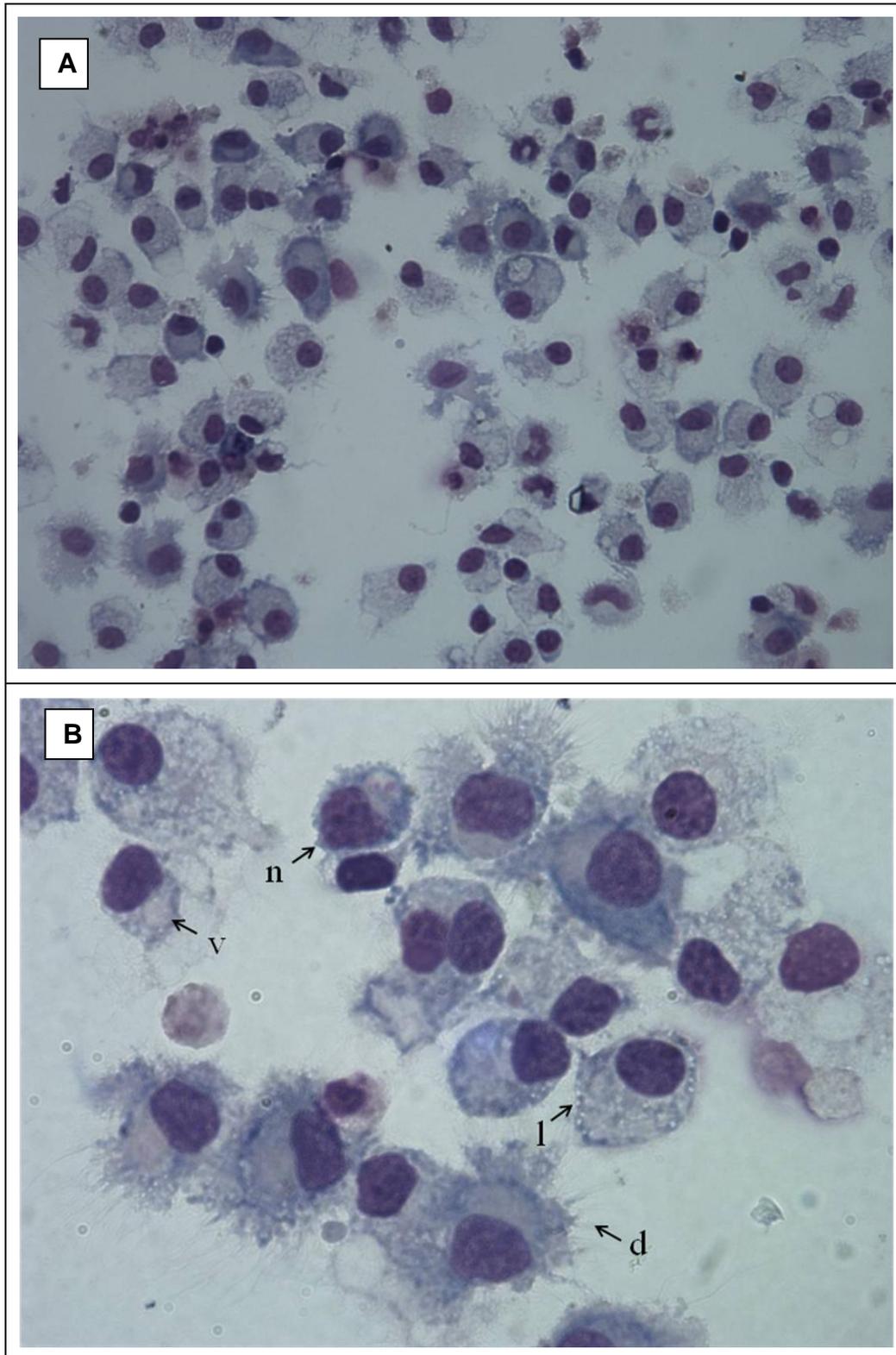
Também não foram encontradas diferenças significativas no rendimento de produção de células dendríticas entre estes dois grupos, conforme indicam os resultados de recuperação de monócitos após Ficoll, de aderência de monócitos CD14+ ao plástico, tanto percentual como global, e da quantidade total de células dendríticas (Tabela 5). O mesmo resultado foi obtido na comparação entre os dois grupos de pacientes tratados, conforme descrito na Tabela 6.

As células dendríticas, derivadas a partir dos monócitos, tanto de pacientes portadores de MM quanto dos controles saudáveis, apresentaram perfil comum ao descrito na literatura: células com forma irregular, exibindo numerosos prolongamentos citoplasmáticos longos e delgados que partem do corpo celular seguindo direções variadas, um núcleo ovóide ou denteado, freqüentemente excêntrico, com cromatina frouxa e um citoplasma abundante apresentando inclusões características de vacúolos e vesículas lipídicas (Figura 16 e Figura 17).



**Figura 16** – Diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos

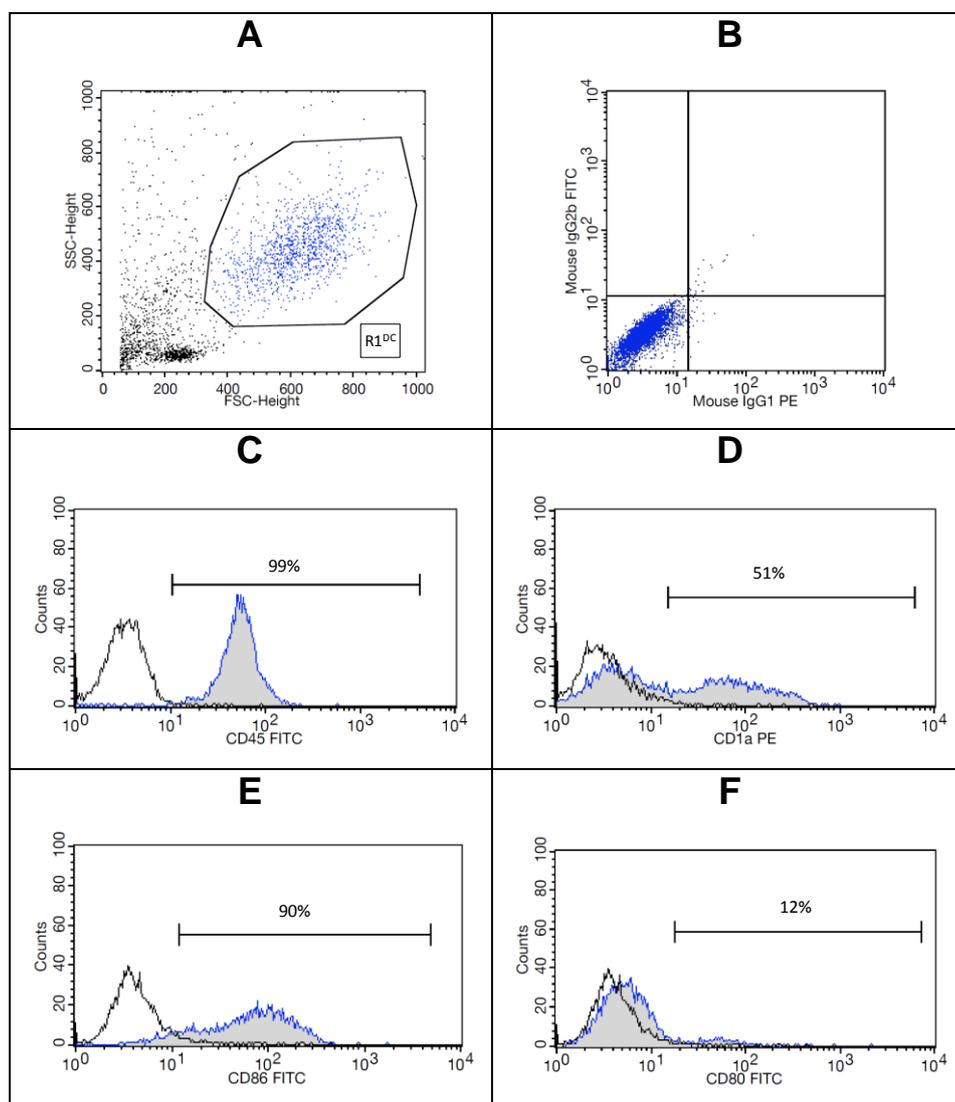
Fotografias de cultura tiradas com máquina fotográfica digital acoplada a microscópio invertido (Leica). Cultura de Monócitos do sangue periférico induzidos com GM-CSF e IL-4 por sete dias, ativados com TNF- $\alpha$  nas últimas 48 horas. Aumento de 200x em **A** e de 400x em **B**.



**Figura 17** - Citocentrifugado de células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos

Fotografias de cultura tiradas com máquina fotográfica digital acoplada a microscópio ótico (Nikon). Cultura de Monócitos do sangue periférico induzidos com GM-CSF e IL-4 por 7 dias, ativados com TNF- $\alpha$  nas últimas 48 horas. Aumento de 400x em **A** e 1000x em **B** (**d** prolongamentos semelhantes a dendritos; **l** vesículas lipídicas; **n** núcleo excêntrico; **v** inclusão semelhante a vacúolos).

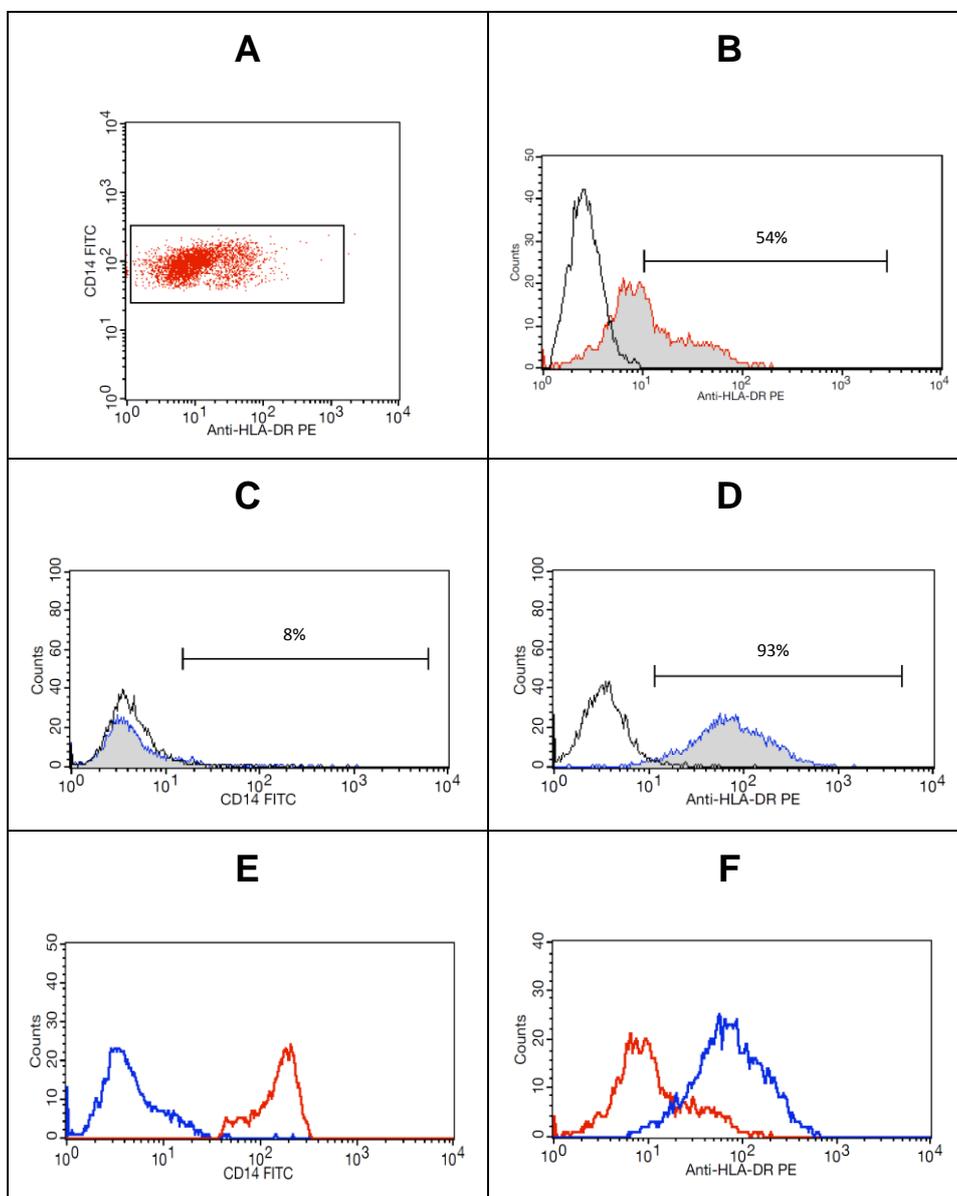
Para a caracterização fenotípica das células dendríticas foram usados os seguintes marcadores: CD45, CD14, HLA-DR, CD1a, CD80 e CD86 (Figura 18 e Figura 19). Na Figura 19 está demonstrada a modulação dos marcadores CD14 e HLA-DR durante a diferenciação de monócitos para células dendríticas maduras, caracterizada pela diminuição na expressão de CD14 e pelo aumento na expressão de HLA-DR. Embora a mediana do IF HLA-DR seja menor no grupo de pacientes, não foi possível demonstrar diferença significativa entre controles saudáveis e pacientes tratados (Tabela 5) e nem entre os dois tipos de tratamento (Tabela 6).



**Figura 18** – Análise de células dendríticas por citometria de fluxo

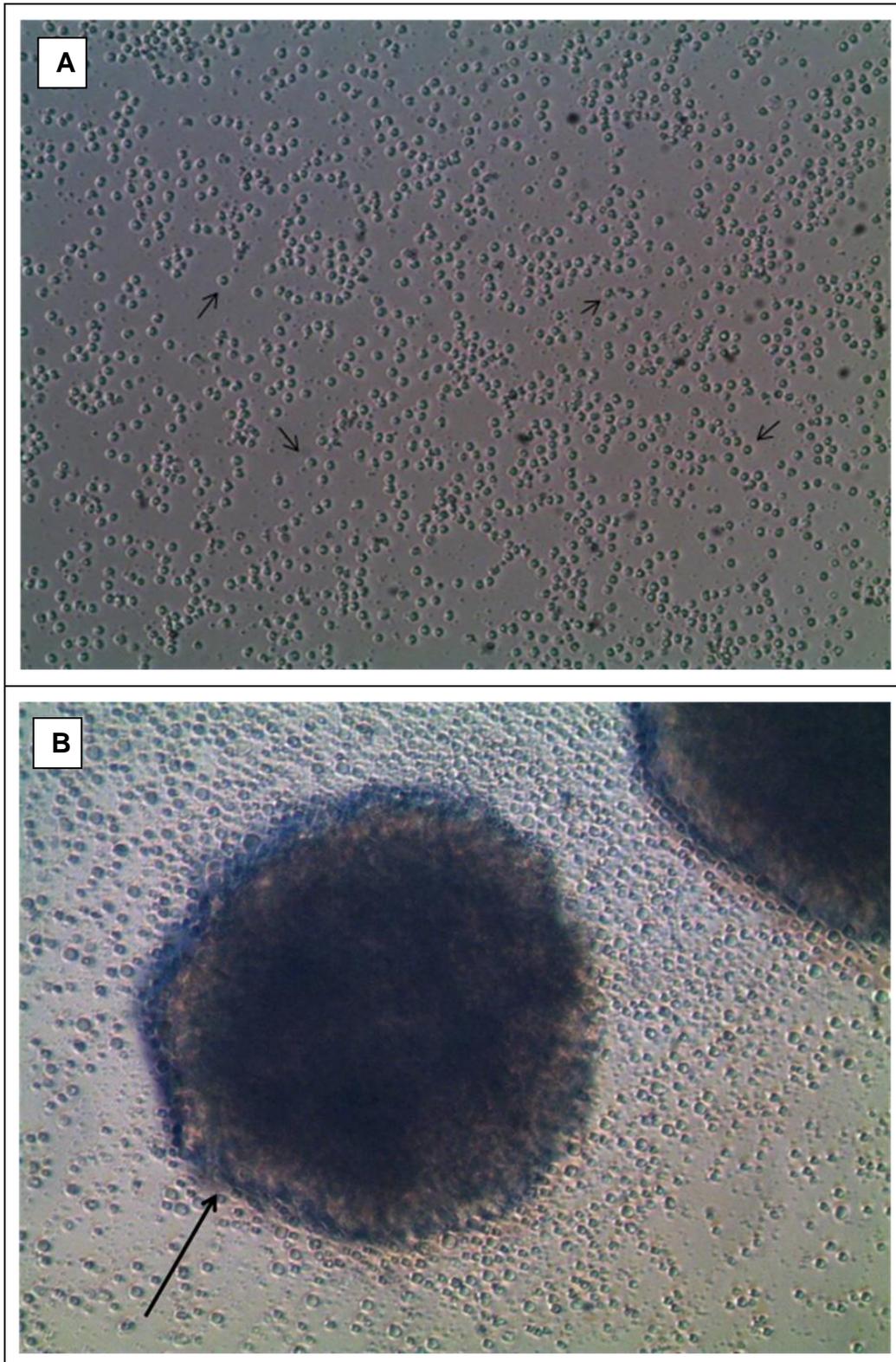
Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x FSC, y SSC) está representado *dot plot* de células dendríticas; R1<sup>DC</sup> = células dendríticas. Em **B** (x IgG1PE, y IgG2bFITC) está representado *dot plot* de R1<sup>DC</sup>. Em **C** histograma de CD45FITC em R1<sup>DC</sup>. Em **D** histograma de CD1aPE em R1<sup>DC</sup>. Em **E** histograma de CD86FITC em R1<sup>DC</sup>. Em **F** histograma de CD80FITC em R1<sup>DC</sup>.

As células dendríticas apresentaram os marcadores CD1a, CD80 e CD86 em quantidades equivalentes em todos os grupos, como representado na Figura 18, sem diferenças significativas entre eles (Tabela 5 e Tabela 6).



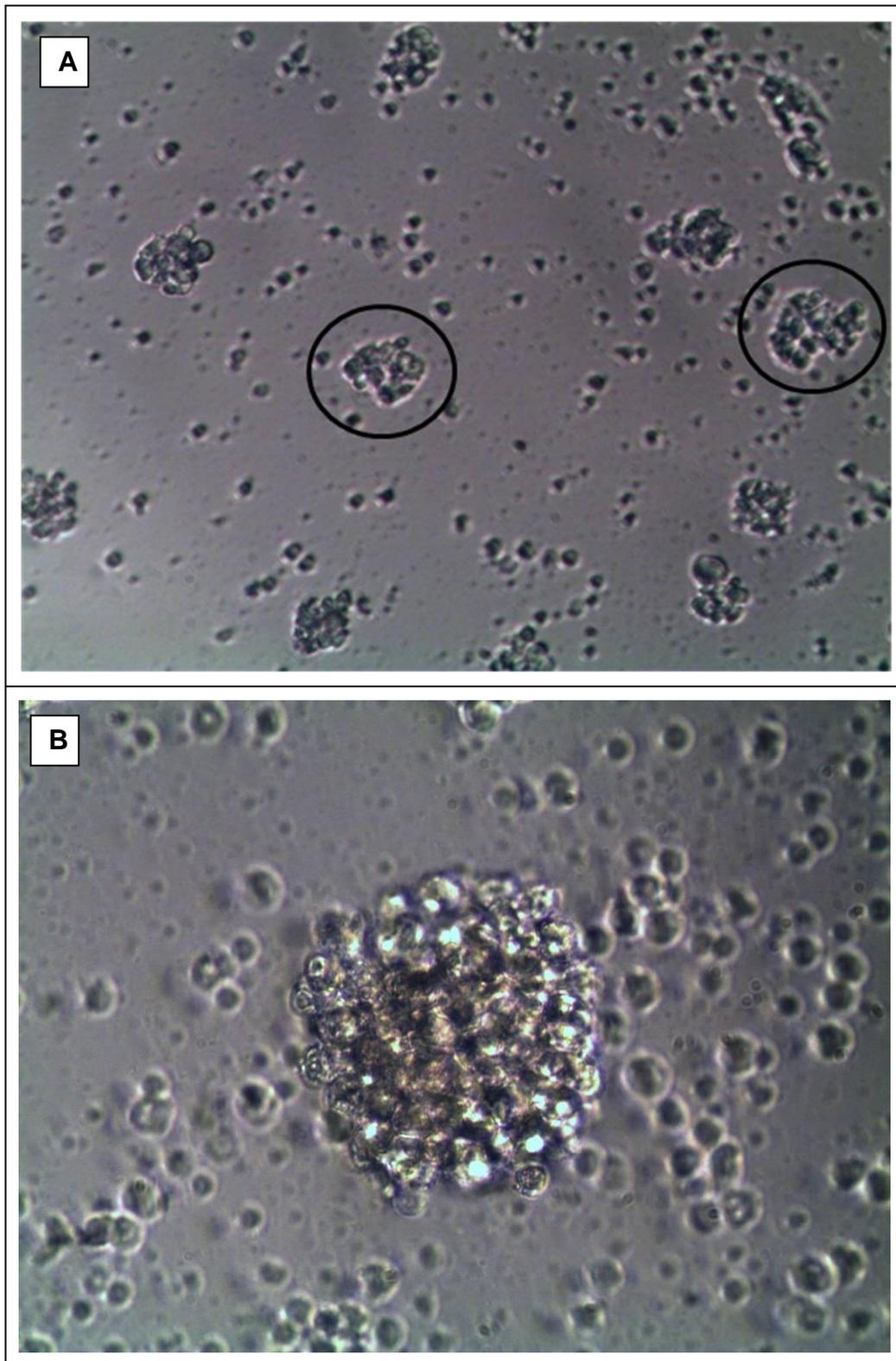
**Figura 19** – Análise da modulação de CD14 e HLA-DR durante a diferenciação de monócitos em células dendríticas

Dados representativos para todas as amostras analisadas, obtidos de amostra de controle saudável. Em **A** (x HLA-DRPE, y CD14FITC) células CD14<sup>+</sup> em monócitos de R14 (Figura 14B). Em **B** histograma de HLA-DRPE em monócitos CD14<sup>+</sup> de R14 (Figura 14B). Em **C** histograma de CD14FITC em células dendríticas de R1<sup>DC</sup> (Figura 18A) Em **D** histograma de HLA-DRPE em células dendríticas de R1<sup>DC</sup> (Figura 18A). Em **E** histograma de CD14FITC de monócitos de R14 (Figura 14B) em vermelho e células dendríticas de R1<sup>DC</sup> (Figura 18A) em azul. Em **F** histograma de HLA-DRPE de monócitos de R14 (Figura 14B) em vermelho e células dendríticas de R1<sup>DC</sup> (Figura 18A) em azul.



**Figura 20** – Fotografia de cultura de linfócitos

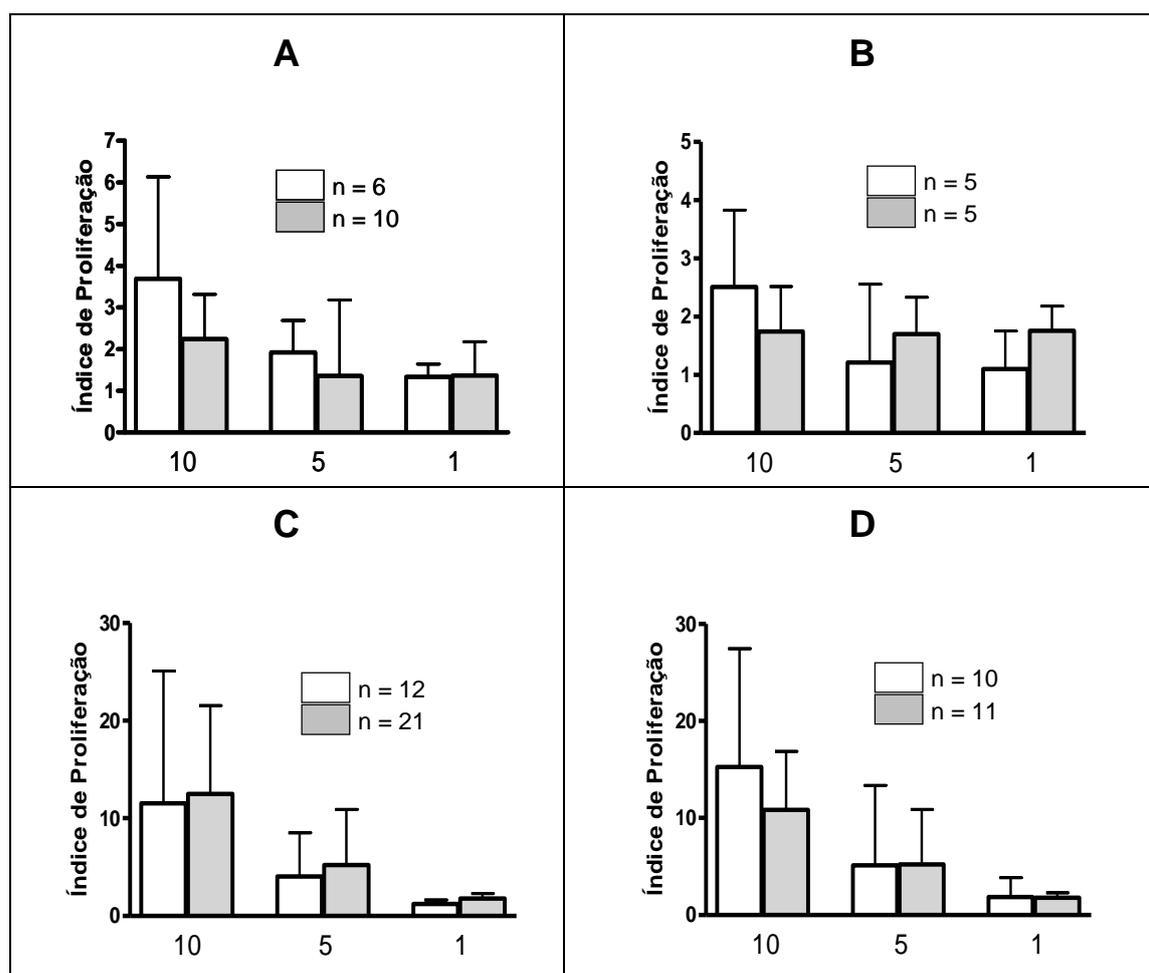
Fotografias representativas para todas as amostras analisadas, obtidas de linfócitos autólogos de controle saudável tiradas com máquina fotográfica digital acoplada a microscópio invertido (Leica). Cultura de linfócito autólogo após 96 horas de cultura. Em **A** linfócitos sem adição de estímulo; em destaque linfócitos (aumento de 100x). Em **B** com adição de fitohemaglutinina; em destaque grupamento de linfócitos (aumento de 100x).



**Figura 21** – Fotografias de co-cultura de linfócitos com células dendríticas

Fotografias representativas para todas as amostras analisadas, obtidas de linfócitos autólogos de controle saudável tiradas com máquina fotográfica digital acoplada a microscópio invertido (Leica). Co-cultura de linfócitos alogênicos com células dendríticas na proporção 10:1 após 96 horas. Aumento de 100x em **A** (em destaque grupamentos de linfócitos) e de 200x em **B** (em destaque grupamento de linfócitos).

Para a caracterização funcional das células dendríticas, foram feitos ensaios de proliferação de linfócitos T autólogos e alogênicos. Na Figura 20A são mostrados linfócitos sem estímulo no final de uma cultura de 96 horas. Na Figura 20B é possível observar grupamentos de linfócitos com estímulo de fitohemaglutinina, utilizada como controle positivo de estímulo de proliferação. Nas Figura 21A e Figura 21B são mostrados linfócitos alogênicos sob estímulo de células dendríticas na proporção 1:10.



**Figura 22** - Ensaio funcional das células dendríticas derivadas a partir de monócitos do sangue periférico.

Diferentes quantidades de DC (10, 5 e  $1 \times 10^3$  células) foram incubadas por 96 horas com  $10^5$  linfócitos T autólogos (A e B) ou alogênicos (C e D) em placa de 96 poços. Foi medida a incorporação de timidina tritiada adicionada nas últimas 18 horas de incubação. Em A e C as colunas vazias representam doadores saudáveis e as colunas cheias representam pacientes portadores de MM tratados (pMMt). Em B e D as colunas vazias representam pMMt sem talidomida e as colunas cheias representam pMMt com talidomida. A coluna representa a mediana e a barra de erro 1 quartil do índice de proliferação (relação entre as CPM do linfócito T estimulados com DC e as CPM do linfócito T sem estímulo).

Não foram encontradas diferenças significativas no índice de proliferação de linfócitos T autólogos nem entre controles saudáveis e pacientes tratados (Figura 22A), e nem entre os pacientes tratados sem e com talidomida (Figura 22B). O mesmo resultado foi observado para linfócitos T alogênicos (Figura 22C e Figura 22D).

É preciso ressaltar que o índice de proliferação de linfócitos T autólogos foi muito menor (IP com mediana entre 2 e 3) do que a proliferação de linfócitos T alogênicos (IP com mediana entre 10 e 15) quando estimulados por células dendríticas na proporção de 10:1.

O grupo de controle saudável, tomado junto aos trabalhadores do laboratório e de outros serviços do hospital, apresentou uma mediana de idade (31 anos) bem inferior aos pacientes estudados (59 anos). Esta diferença motivou uma avaliação da influência da idade nos marcadores e populações celulares estudadas entre os doadores considerados controles saudáveis. Para tanto, este grupo foi dividido em indivíduos com menos e mais de 50 anos, gerando medianas de 25 e 54 anos, respectivamente. Não foram encontradas diferenças entre estes grupos nos parâmetros do hemograma (Tabela 9) e na maioria dos marcadores e populações celulares estudadas. A relação CD4/CD8 foi maior nos doadores saudáveis com mais de 50 anos. No entanto, este grupo apresentou um menor índice de fluorescência de HLA-DR nas células dendríticas diferenciadas *in vivo* (Tabela 9).

---

**Tabela 4** – Caracterização dos sujeitos do trabalho e avaliação de seus hemogramas.

	N	Idade			Gênero		Leucócitos (/μL)			Linfócitos (/μL)			Monócitos (/μL)		
		Mediana	Min	Max	M	F	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max	Mediana	Min	Max
<b>Controles Saudáveis</b>															
Todos	14	<b>31</b>	20	57	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>6200</b>	5000	13100	<b>2082</b>	963	3018	<b>390</b>	230	500
< 50 anos	9	<b>25</b>	20	32	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>6000</b>	5000	8100	<b>2108</b>	963	3018	<b>370</b>	290	450
> 50 anos	5	<b>54</b>	50	57	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>6700</b>	5300	13100	<b>2057</b>	1102	2945	<b>400</b>	230	500
<b>Portadores de MM</b>															
antes do tratamento	13	<b>59</b>	26	64	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>4100</b>	2500	8700 *	<b>1604</b>	871	5246	<b>380</b>	260	1170
100 dias de tratamento	17	<b>59</b>	37	65	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>4700</b>	2900	7400 *	<b>1574</b>	399	3402	<b>600</b>	200	850 * **
tratados sem talidomida	9	<b>58</b>	37	64	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>4300</b>	2900	7400 *	<b>1532</b>	399	3402	<b>500</b>	200	760 *
tratados com talidomida	8	<b>60</b>	44	65	<b>5</b>	<b>3</b>	<b>4800</b>	3300	6700 *	<b>1589</b>	670	3360	<b>610</b>	410	850 * **

\* Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos Controles Saudáveis

\*\* Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos portadores de MM antes do tratamento

Os valores globais (/μL) de Leucócitos e Monócitos do laudo do hemograma. Os valores globais (/μL) de Linfócitos representam a proporção (%) obtida por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/μL) de Leucócitos.

Gênero: M masculino e F feminino.

**Tabela 5** – Avaliação de rendimento e caracterização fenotípica de células dendríticas diferenciadas *ex-vivo* a partir de monócitos do sangue periférico.

Parâmetros celulares	Controles Saudáveis				Pacientes tratados				p
	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	
MN (/μL)	<b>390</b>	230	500	14	<b>600</b>	200	850	17	0,0210
MN CD14+ (/μL)	<b>200</b>	100	390	14	<b>240</b>	60	800	17	0,8272
% Recuperação após Ficoll	<b>21</b>	11	39	14	<b>20</b>	7	47	17	0,7658
% MN CD14+ aderidos	<b>76</b>	34	95	12	<b>74</b>	22	99	14	0,7773
MN CD14+ aderidos (/μL)	<b>87</b>	35	221	12	<b>94</b>	11	255	14	0,5203
DC total (/μL)	<b>43</b>	24	88	12	<b>43</b>	3	167	17	0,9823
MN CD14+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>170</b>	70	340	14	<b>240</b>	60	800	17	0,8516
DC HLA-DR+ (/μL)	<b>34</b>	11	86	11	<b>34</b>	2	146	17	0,8878
IF HLA-DR em CD14+	<b>9</b>	5	27	14	<b>9</b>	6	44	16	0,5467
IF HLA-DR em DC	<b>53</b>	6	126	11	<b>21</b>	6	47	16	0,0799
DC CD1a+ (/μL)	<b>23</b>	1	63	11	<b>16</b>	1	145	17	0,8878
IF CD1a em DC	<b>22</b>	9	52	11	<b>18</b>	4	187	17	0,7420
DC CD80+ (/μL)	<b>6</b>	1	20	11	<b>4</b>	1	34	17	0,4239
IF CD80 em DC	<b>7</b>	4	18	11	<b>8</b>	3	20	17	0,6720
DC CD86+ (/μL)	<b>34</b>	15	83	11	<b>38</b>	3	125	17	0,8508
IF CD86 em DC	<b>17</b>	6	46	11	<b>21</b>	5	32	17	0,5724

Em destaque, diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Valores globais (/μL) de MN do laudo do hemograma; Valores globais (/μL) de DC foram definidos por contagem em hemocítmetro usando microscópio ótico; Valores globais (/μL) das subpopulações de DC representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/μL) de DC.

IF – Índice de Fluorescência, calculado pela razão entre MFI do anticorpo em questão e MFI do anticorpo controle não relacionado.

**Tabela 6** – Influência da Talidomida no rendimento e fenótipo de células dendríticas diferenciadas *ex-vivo* a partir de monócitos do sangue periférico.

Parâmetros celulares	sem Talidomida				com Talidomida				p
	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	
MN (/μL)	<b>500</b>	200	760	9	<b>610</b>	410	850	8	0,2766
MN CD14+ (/μL)	<b>238</b>	76	321	9	<b>209</b>	56	799	8	0,8148
% Recuperação após Ficoll	<b>23</b>	7	47	9	<b>20</b>	13	28	8	0,6058
% MN CD14+ aderidos	<b>74</b>	22	96	8	<b>83</b>	52	99	6	0,4136
MN CD14+ aderidos (/μL)	<b>41</b>	11	255	8	<b>104</b>	37	226	6	0,1812
DC total (/μL)	<b>42</b>	3	120	9	<b>64</b>	12	167	8	0,3704
MN CD14+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>206</b>	72	304	8	<b>203</b>	56	668	8	0,7209
DC HLA-DR+ (/μL)	<b>23</b>	2	120	9	<b>46</b>	12	146	8	0,3213
IF HLA-DR em CD14+	<b>9</b>	7	44	9	<b>9</b>	6	12	7	0,7577
IF HLA-DR em DC	<b>19</b>	6	47	8	<b>23</b>	7	34	8	0,7984
DC CD1a+ (/μL)	<b>13</b>	1	110	9	<b>27</b>	3	145	8	0,3704
IF CD1a em DC	<b>18</b>	4	187	9	<b>19</b>	13	140	8	0,6730
DC CD80+ (/μL)	<b>5</b>	1	19	9	<b>3</b>	1	34	8	0,8884
IF CD80 em DC	<b>6</b>	4	12	9	<b>9</b>	3	12	8	0,4234
DC CD86+ (/μL)	<b>32</b>	3	113	9	<b>52</b>	11	125	8	0,1996
IF CD86 em DC	<b>18</b>	5	23	9	<b>24</b>	7	32	8	0,2359

Diferenças significativas consideradas quando  $p \leq 0,05$ .

Valores globais (/μL) de MN do laudo do hemograma; Valores globais (/μL) de DC foram definidos por contagem em hemocítmetro usando microscópio ótico; Valores globais (/μL) das subpopulações de DC representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/μL) de DC.

IF – Índice de Fluorescência, calculado pela razão entre MFI do anticorpo em questão e MFI do anticorpo controle não relacionado.

**Tabela 7** – Avaliação de rendimento e caracterização fenotípica de populações linfóides do sangue periférico.

Parâmetros celulares	Controles saudáveis				MM antes do tratamento				MM tratados			
	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N
CD3+ (/μL)	<b>1420</b>	460	1950	14	<b>1220</b>	440	1710	13 *	<b>890</b>	200	1970	17 *
CD3+ e CD4+ (/μL)	<b>860</b>	290	1390	14	<b>170</b>	80	310	13 *	<b>240</b>	40	570	17 *
CD3+ e CD8+ (/μL)	<b>480</b>	150	710	14	<b>820</b>	290	1390	13 *	<b>620</b>	150	1280	17
CD3+ e CD4+ (/μL) / CD3+ e CD8+ (/μL)	<b>1,81</b>	1,40	4,23	14	<b>0,25</b>	0,11	0,45	13 *	<b>0,41</b>	0,23	0,96	17 * **
CD3+ e CD4+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>50</b>	30	140	8	<b>60</b>	30	110	9	<b>80</b>	20	220	11
CD3+ e CD8+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>60</b>	30	180	8	<b>310</b>	140	600	9 *	<b>350</b>	80	1070	11 *
IF HLA-DR em CD3+ e CD4+	<b>26</b>	15	45	8	<b>21</b>	11	58	10	<b>25</b>	13	139	11
IF HLA-DR em CD3+ e CD8+	<b>21</b>	11	49	8	<b>15</b>	10	41	10	<b>19</b>	8	58	11
CD19+ (/μL)	<b>240</b>	40	730	14	<b>220</b>	10	850	13	<b>150</b>	5	480	17
CD20+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>200</b>	30	300	8	<b>150</b>	8	1030	9	<b>180</b>	6	520	7
IF HLA-DR em CD20+	<b>166</b>	71	200	8	<b>168</b>	94	372	10	<b>244</b>	122	540	10 *
CD3- e CD56+ e CD16 bright (/μL)	<b>220</b>	90	670	13	<b>110</b>	4	1200	11	<b>170</b>	40	670	16
CD3- e CD56 bright e CD16 low- (/μL)	<b>20</b>	6	80	13	<b>30</b>	10	110	11	<b>30</b>	10	180	16

\* Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos Controles Saudáveis; \*\* Diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) em relação aos portadores de MM antes do tratamento.

Valores globais (/μL) das subpopulações de linfócitos representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/μL) de linfócitos (Tabela 4); IF – Índice de Fluorescência, calculado pela razão entre MFI do anticorpo em questão e MFI do anticorpo controle não relacionado.

**Tabela 8** - Influência da talidomida no rendimento e fenótipo de populações linfóides do sangue periférico.

Parâmetros celulares	sem Talidomida				com Talidomida				<i>p</i>
	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	
CD3+ (/μL)	<b>887</b>	196	1974	9	<b>912</b>	288	1613	8	0,8884
CD3+ e CD4+ (/μL)	<b>253</b>	37	571	9	<b>209</b>	116	458	8	0,8148
CD3+ e CD8+ (/μL)	<b>584</b>	158	1283	9	<b>625</b>	146	1205	8	0,6058
CD3+ e CD4+ (/μL) / CD3+ e CD8+ (/μL)	<b>0,41</b>	0,23	0,96	9	<b>0,38</b>	0,27	0,79	8	0,5414
CD3+ e CD4+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>72</b>	17	156	7	<b>86</b>	76	218	4	0,3152
CD3+ e CD8+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>302</b>	77	1069	7	<b>420</b>	137	824	4	0,4121
IF HLA-DR em CD3+ e CD4+	<b>25</b>	16	42	7	<b>34</b>	13	130	4	0,7879
IF HLA-DR em CD3+ e CD8+	<b>10</b>	8	20	7	<b>22</b>	19	58	4	0,0242
CD19+ (/μL)	<b>224</b>	5	481	9	<b>110</b>	38	270	8	0,1672
CD20+ e HLA-DR+ (/μL)	<b>179</b>	6	524	7	<b>48</b>	47	237	3	0,3833
IF HLA-DR em CD20+	<b>229</b>	122	285	7	<b>346</b>	255	540	3	0,0667
CD3- e CD56+ e CD16 bright (/μL)	<b>120</b>	39	403	9	<b>202</b>	95	669	7	0,2105
CD3- e CD56 bright e CD16 low- (/μL)	<b>21</b>	10	69	9	<b>42</b>	21	179	7	0,0907

Em destaque, diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ).

Valores globais (/μL) das subpopulações de linfócitos representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/μL) de linfócitos (Tabela 4).

IF – Índice de Fluorescência, calculado pela razão entre MFI do anticorpo em questão e MFI do anticorpo controle não relacionado.

**Tabela 9** - Influência da idade nos marcadores analisados no grupo de controle saudáveis.

Parâmetros celulares	< 50 anos				> 50 anos				p
	Mediana	Min	Max	N	Mediana	Min	Max	N	
CD3+ (/µL)	<b>1411</b>	465	1946	9	<b>1428</b>	831	1950	5	1,0000
CD3+ e CD4+ (/µL)	<b>843</b>	294	1118	9	<b>988</b>	578	1392	5	0,4376
CD3+ e CD8+ (/µL)	<b>482</b>	151	708	9	<b>347</b>	219	500	5	0,2398
CD3+ e CD4+ (/µL) / CD3+ e CD8+ (/µL)	<b>1,58</b>	1,40	1,95	9	<b>2,79</b>	1,68	4,23	5	0,0120
CD3+ e CD4+ e HLA-DR+ (/µL)	<b>40</b>	31	56	4	<b>82</b>	41	136	4	0,1143
CD3+ e CD8+ e HLA-DR+ (/µL)	<b>59</b>	34	93	4	<b>61</b>	30	181	4	1,0000
IF HLA-DR em CD3+ e CD4+	<b>26</b>	24	33	4	<b>29</b>	15	45	4	1,0000
IF HLA-DR em CD3+ e CD8+	<b>26</b>	13	48	4	<b>18</b>	11	24	4	0,4857
CD19+ (/µL)	<b>239</b>	124	727	9	<b>237</b>	37	342	5	0,7972
CD20+ e HLA-DR+ (/µL)	<b>163</b>	138	256	4	<b>246</b>	30	300	4	0,4857
IF HLA-DR em CD20+	<b>125</b>	71	199	4	<b>182</b>	128	200	4	0,3429
CD3- e CD56+ e CD16 bright (/µL)	<b>248</b>	93	674	9	<b>170</b>	110	379	4	0,5035
CD3- e CD56 bright e CD16 low- (/µL)	<b>19</b>	6	83	9	<b>23</b>	16	71	4	0,6042
MN (/µL)	<b>370</b>	290	450	9	<b>400</b>	230	500	5	0,4376
MN CD14+ (/µL)	<b>186</b>	96	386	9	<b>218</b>	98	392	5	0,8981
% Recuperação após Ficoll	<b>24</b>	14	39	9	<b>16</b>	11	26	5	0,1898
% MN CD14+ aderidos	<b>54</b>	34	94	8	<b>83</b>	75	95	4	0,1535
MN CD14+ aderidos (/µL)	<b>103</b>	58	221	8	<b>57</b>	35	136	4	0,2141
DC total (/µL)	<b>37</b>	24	88	7	<b>45</b>	39	73	5	0,2020
MN CD14+ e HLA-DR+ (/µL)	<b>150</b>	71	341	9	<b>193</b>	85	327	5	0,8981
DC HLA-DR+ (/µL)	<b>33</b>	11	86	6	<b>37</b>	12	67	5	0,9307
IF HLA-DR em CD14+	<b>7</b>	5	22	9	<b>18</b>	8	27	5	0,0829
IF HLA-DR em DCs	<b>84</b>	14	126	6	<b>14</b>	6	61	5	0,0303
DC CD1a+ (/µL)	<b>17</b>	1	57	6	<b>30</b>	10	62	5	0,4286
IF CD1a em DCs	<b>27</b>	11	52	6	<b>15</b>	9	23	5	0,1255
DC CD80+ (/µL)	<b>7</b>	5	14	6	<b>5</b>	1	20	5	0,1775
IF CD80 em DCs	<b>8</b>	6	18	6	<b>6</b>	4	14	5	0,2468
DC CD86+ (/µL)	<b>25</b>	15	83	6	<b>35</b>	23	66	5	0,3290
IF CD86 em DCs	<b>15</b>	9	46	6	<b>17</b>	8	26	5	0,9307

Diferenças significativas consideradas quando  $p \leq 0,5$

Valores globais (/µL) das subpopulações de linfócitos representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/µL) de linfócitos (Tabela 4); Valores globais (/µL) de MNs do laudo do hemograma; Valores globais (/µL) de DC foram definidos por contagem em hemocitômetro usando microscópio óptico; Valores globais (/µL) das subpopulações de DC representam a proporção (%) encontrada por citometria de fluxo aplicada sobre o valor global (/µL) de DC.

IF – Índice de Fluorescência, calculado pela razão entre MFI do anticorpo em questão e MFI do anticorpo controle não relacionado.

## 4 DISCUSSÃO

O estudo das células envolvidas na resposta imune pode auxiliar na compreensão da patogênese das doenças infecciosas, auto-imunes e neoplásicas e promover, então, novas bases para intervenção terapêutica.

Os pacientes portadores de mieloma múltiplo podem apresentar diversas alterações no sistema imune. Os vários tipos de tratamento aplicados também impõem mudanças desta resposta. No presente trabalho foram estudadas células do sistema imune com ênfase nas células dendríticas de pacientes portadores de mieloma múltiplo após o transplante de células-tronco hematopoiéticas e submetidos ao tratamento de manutenção com dexametasona acompanhada ou não de talidomida.

Neste estudo os pacientes foram tratados com quimioterapia em altas doses, um tratamento que induz aplasia medular, para depois induzir a reconstituição hematológica dependente do transplante autólogo com células tronco hematopoiéticas (TACTH). O intervalo de tempo entre a realização do transplante e a coleta de amostras (durante o tratamento de manutenção) durou em média um ano.

Alterações no leucograma destes pacientes já eram esperadas. Identificamos que os pacientes estavam leucopênicos, mas sem valores significativamente diminuídos em linfócitos e monócitos que justifiquem os baixos valores de leucócitos globais. Os valores de granulócitos do hemograma apresentaram diminuição de aproximadamente 1500 células/ $\mu$ L nos pacientes após TACTH (dados não mostrados), o que, somado à discreta diminuição na quantidade de linfócitos, seria capaz de gerar a diferença na leucometria global.

A reconstituição hematológica varia para cada subpopulação de leucócitos. Está descrito que pacientes com mieloma podem apresentar leve redução de leucócitos totais devido à presença de neutropenia (Lee e cols., 1993). O processo de recuperação hematológica após TACTH em pacientes com mieloma foi bem estudado por Schütt e colaboradores (2006). Os autores mostraram que os pacientes com até um ano após TACTH, espaço de tempo equivalente ao momento em que foram colhidas as amostras do presente trabalho, apresentavam neutropenia, uma leve diminuição de linfócitos gerada pela queda brusca nos linfócitos T CD4 e quantidades normais de monócitos. Nossos resultados corroboram esta informação.

No presente estudo, os linfócitos B e as células NK se encontraram em níveis normais nos pacientes após o TACTH, e a talidomida não foi capaz de influenciar a

---

proporção destas populações linfóides, exceto uma subpopulação minoritária de células NK, representada pela alta expressão de CD56 e baixa expressão de CD16. Segundo Davies e colaboradores (2001), a talidomida é capaz de estimular a atividade de células NK em pacientes com mieloma múltiplo.

Esta subpopulação de células NK tem menos atividade citotóxica que a célula NK CD56+CD16bright e é capaz de proliferar na presença de IL-2 e de produzir citocinas quando ativadas por monócitos (Cooper e cols., 2001). O aumento discreto dos níveis destas células NK minoritárias, em detrimento a invariabilidade nos níveis de NK convencionais, pode estar relacionado à produção de IL-2 pelos linfócitos T ativados que se encontraram em maior quantidade nos pacientes deste estudo.

Schütt e colaboradores (2006) também reportaram uma diminuição na quantidade de linfócitos B, que em um ano já retornou aos níveis iniciais, e uma manutenção nos níveis de células NK. O tratamento com talidomida já foi descrito como sendo capaz de induzir a proliferação e atividade de linfócitos T e de células NK, indiretamente pelo aumento da produção de IL-2 (Shannon & Sandoval, 2002; Hayashi e cols., 2005).

A inversão da relação CD4/CD8 observada nos pacientes deste estudo, e em todos os pacientes que foram tratados com altas doses de quimioterápicos, foi influenciada tanto pela queda nos níveis de linfócitos T CD4 quanto pelo aumento nos níveis de linfócitos T CD8.

Estes dados são coerentes com o perfil de reconstituição de linfócitos após o transplante descritos por Schütt e colaboradores (2006), que descreveram a razão da linfopenia estando relacionada, principalmente, à redução intensa na quantidade de linfócitos T CD4+, e que é compensada pelo aumento na população de linfócitos T citotóxicos (CD8+). Os valores de linfócitos T CD4+ demoram mais de dois anos para retornar aos valores normais, enquanto que os valores de linfócitos T CD8+ tendem a normalizar em menos de um ano. A subpopulação de linfócitos T ativados (CD3+HLA-DR+) nestes pacientes está aumentada no primeiro ano após TACTH, normalizando em até dois anos (Schütt e cols., 2006).

Segundo uma revisão publicada por Williams e colaboradores (2007), pacientes em recuperação hematológica apresentam dificuldade em restaurar os níveis de linfócitos T CD4 devido ao fato de sua ontogenia ser dependente do timo. Este órgão linfóide sofre involução com a ação da idade e da quimioterapia. Os linfócitos T CD8,

---

por sua vez, não dependem do timo, e podem proliferar pelo estímulo de IL-15, uma citocina constitutiva secretada em altos níveis em pacientes após transplante, principalmente durante a leucopenia.

Os linfócitos T ativados (HLA-DR+) também estavam aumentados nos pacientes deste estudo, porém, o dado que mais chamou a atenção foi o fato dos linfócitos T CD4+ ativados não terem demorado tanto para recuperar os níveis normais quanto a população global (CD4+). Os linfócitos T CD8 ativados aumentaram nos pacientes após o TACTH com uma taxa maior do que a população global de linfócitos T CD8 totais. Isto condiz com as informações passadas por Williams e colaboradores (2007), que inferem que os linfócitos T *naive* apresentam mais dificuldade de expandir do que as células de memória.

Os indícios apresentados neste estudo levam a crer que este estágio de redução de carga tumoral, somado às alterações nas populações linfóides (aumento da população CD8 e NK), formariam uma janela terapêutica propícia para a indução de uma resposta imune antitumoral, como a aplicada na imunoterapia com células dendríticas.

Apesar da diminuição da leucometria global, os monócitos dos pacientes tratados com quimioterapia em altas doses e transplante, e que fizeram terapia de manutenção há pelo menos três meses, apresentaram um aumento significativo, quando comparados com doadores saudáveis ou pacientes antes do tratamento de manutenção.

Este resultado não correlaciona com nenhum achado científico relatado. Até mesmo o aumento no número de monócitos circulantes nos primeiros dois meses após o TACTH, relatado por Schütt e colaboradores (2006), está fora da janela temporal em que os pacientes se encontravam. Estes mesmos autores apontam a influência da talidomida na população de monócitos circulantes após quimioterapia convencional, porém não foi possível detectar este evento nos pacientes do presente estudo.

Quando os monócitos foram analisados por citometria de fluxo, usando o marcador CD14, a diferença encontrada no leucograma não se repetiu. A diferença nos critérios usados para quantificação dos monócitos nestes dois métodos pode ter influenciado estes resultados. As diferenças morfológicas entre as populações linfomonocitóides podem exercer maior variação nos dados encontrados nos hemocitômetros automatizados. Os linfócitos ativados podem sofrer aumento do tamanho, diminuição da relação núcleo/citoplasma, e até apresentar maior

---

granulosidade que os linfócitos típicos do sangue (Lee e cols., 1993). Conseqüentemente alguns destes linfócitos poderiam ser detectados como monócitos, estas alterações merecem investigação mais acurada.

A recuperação das células mononucleares após separação por gradiente de densidade do Ficoll foi baixa (mediana de 20%) para todas as amostras do estudo, ficando aproximadamente 45% abaixo do que seria considerado aproveitamento total. Já na adesão ao plástico obtivemos uma recuperação de 76% de monócitos CD14+, o que gerou no total uma recuperação de aproximadamente 40% de monócitos CD14+ do sangue total coletado. Esta recuperação final foi consistente com o esperado, considerando o número de etapas incluídas no processo de separação. Desta forma, consideramos que esta técnica poderia ser usada para o preparo de DC para imunoterapia.

A diferenciação de células dendríticas a partir de monócitos no pacientes com mieloma múltiplo foi equivalente aos controles saudáveis deste estudo. Apesar das células dendríticas do sangue de pacientes com mieloma já terem sido descritas como deficientes na sua capacidade de maturar e apresentar antígenos (Ratta e cols., 2002; Brimnes e cols., 2006), a diferenciação *in vitro* a partir de monócitos é considerada normal e eficiente (Pfeiffer e cols., 1997; Chen e cols., 2001; Schütt e cols., 2005).

A quantidade de células dendríticas geradas a partir dos monócitos foi em torno de 20% sem diferença entre doadores saudáveis e pacientes com mieloma múltiplo. Schütt e colaboradores (2005) obtiveram rendimento semelhante nos controles saudáveis, entretanto, o rendimento em células dendríticas dos pacientes com mieloma múltiplo foi reduzido. Os autores justificam a diferença de rendimento pela alta concentração de imunoglobulinas no plasma dos pacientes. Em nosso estudo o plasma foi depletado em todas as amostras, o que pode ter eliminado esta interferência.

A avaliação do rendimento foi útil para estimar o volume de sangue a ser colhido para produção de células dendríticas em larga escala, um fator limitante em imunoterapia. Nos protocolos de tratamento com células dendríticas a dose utilizada é bastante variável ( $10^6$ - $10^8$ ), devido ao rendimento das células dendríticas geradas (Barbuto e cols., 2004; Prince e cols., 2008). Considerando nossos resultados, para uma dose com 10 milhões de células dendríticas, o volume de sangue estimado seria de aproximadamente 250 mL.

---

Assim como descrito na literatura, as células dendríticas produzidas neste estudo apresentaram baixa ou nula expressão de CD14, alta expressão de HLA-DR, variável expressão de CD1a e CD86, e uma baixa, mas presente, expressão de CD80 (Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Pickl e cols., 1996).

A ausência do marcador CD1a em células dendríticas maduras pode significar uma subpopulação de células que não produzem IL-12, e são capazes de estimular a diferenciação de linfócitos T CD4 a uma resposta TH0/TH2 e secretar IL-10 em grandes quantidades (Chang e cols., 2000). A presença de células dendríticas que não expressavam CD1a em sua superfície não correlacionou com baixa estimulação linfocitária observada no presente trabalho.

A família B7 de moléculas coestimulatórias, representadas neste estudo pelas moléculas CD80 e CD86, é necessária para haver estímulo entre células dendríticas e linfócitos T. Foi possível notar que quase 100% das células dendríticas produzidas foram CD86+. E apesar da baixa expressão de CD80 nestas células, todos os pacientes foram capazes de gerar algum nível de estimulação de proliferação linfocitária.

O marcador que mais sofreu alterações entre as células analisadas neste estudo foi o HLA-DR. Este marcador está presente em monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e linfócitos T ativados. (Schwiebert e cols., 1995)

A talidomida adicionada em culturas de células não altera o perfil de expressão de HLA-DR. O efeito direto da talidomida sobre HLA-DR em leucócitos, quando administrada em pacientes não está bem descrito, mas Haslett e colaboradores (1998; 2003), documentaram aumento na atividade de linfócitos T CD8+. Nosso achado no aumento do índice de fluorescência de HLA-DR em linfócitos T CD8+ em pacientes tratados com talidomida, em comparação com pacientes que não receberam a droga, é compatível com o aumento de atividade nestes linfócitos.

A população de linfócitos B circulantes em pacientes com mieloma tratados com talidomida é diminuída, segundo Schütt e colaboradores (2005), mas nenhuma informação quanto aos índices de HLA-DR nestes linfócitos B já foi descrita. Não existem informações sobre a influência da terapia com corticosteróides neste marcador em linfócitos B. O índice de fluorescência do HLA-DR nos linfócitos B dos pacientes em terapia de manutenção neste estudo foi maior que os controles saudáveis e que os pacientes antes de começar a terapia de manutenção. Isto pode estar relacionado com

---

um aumento tardio nos níveis de linfócitos B em pacientes em recuperação hematológica após o TACTH (Schütt e cols., 2006).

As células dendríticas derivadas *in vitro* a partir de monócitos na presença de talidomida apresentam perfil imaturo, com baixa expressão de HLA-DR e outros marcadores (Piemonti e cols. 1999). Já foi demonstrado que tanto os monócitos do sangue periférico de pacientes com mieloma tratados com talidomida quanto as células dendríticas imaturas e maduras derivadas a partir destes monócitos *in vitro*, apresentam expressão reduzida de HLA-DR em até 50% (Schütt e cols., 2005).

Outra medicação utilizada pelo grupo de pacientes estudados foi a dexametasona. Entre os efeitos da administração deste medicamento estão ações imunorregulatórias e anti-inflamatórias, pela repressão da expressão de ampla variedade de genes (Asadullah e cols., 2002). A administração de dexametasona resulta em rápida diminuição (3-6hs) no número de monócitos circulantes, conforme modelos experimentais (Thompson & Van Furth 1970). A exposição *in vitro* a dexametasona modula negativamente o HLA-DR em células mononucleares de sangue periférico (Schwiebert e cols., 1995). Para afastar um efeito direto desta droga sobre a análise celular, as amostras de sangue foram colhidas somente após três semanas de sua aplicação.

Apesar disto, os monócitos dos pacientes com mieloma e as células dendríticas aqui estudadas não apresentaram diferenças significativas na expressão de HLA-DR sob influência da talidomida. Houve uma menor expressão de HLA-DR (não estatisticamente significativa) nos pacientes tratados, mas equivalente nos dois grupos de tratamento, com e sem talidomida. Diante desta informação resolvemos avaliar se havia algum outro fator que pudesse estar influenciando este resultado.

O critério de seleção do grupo controle saudável para este estudo foi baseado na escolha de indivíduos elegíveis para doação de sangue e prováveis doadores de monócitos para terapia celular. Outros autores também utilizaram este critério (Brimmes e cols., 2006). Quando analisamos os doadores saudáveis percebemos que a diferença de idade era significativa (31 anos para os controles saudáveis e 59 anos para os pacientes com mieloma).

A escolha para estratificação da idade em maiores e menores de 50 anos levou em consideração a disponibilidade de indivíduos com idade avançada que não tivessem nenhum outro problema de saúde que pudesse intervir no estudo. Definindo este ponto

---

de corte dividimos em dois grupos, um com nove indivíduos com menos de 50 anos (mediana de idade de 25 anos e o mais velho com 32) e cinco indivíduos com mais de 50 anos (mediana de idade 54 anos).

Foram re-analisados todos os parâmetros entre estes dois grupos. Evidenciou-se uma menor expressão de HLA-DR de superfície nas células dendríticas dos indivíduos do grupo de mais de 50 anos, e os níveis apresentados eram bem semelhantes aos dos pacientes com mieloma (medianas de 14 e 21 respectivamente). Outros autores também verificaram que células dendríticas de humanos idosos podiam apresentar menor expressão de HLA-DR de superfície quando comparados com humanos jovens (Steger e cols., 1996; Pietschmann e cols., 2000; Lung e cols., 2000).

Encontramos um aumento da relação CD4/CD8 nos controles saudáveis com mais de 50 anos. Ginaldi e colaboradores (2000) não encontraram diferença em quantidades de linfócitos CD4 e CD8 entre idosos e jovens. No presente estudo, o número de indivíduos pode ter influenciado para esta conclusão.

Apesar disto, não encontramos razão para descartar os doadores saudáveis com menos de 50 anos do grupo de controles deste estudo. Mesmo porque o objetivo foi controlar a produção de células dendríticas dos pacientes com mieloma usando um grupo que pudesse representar a outra melhor opção de fonte para estas células: doadores saudáveis de bancos de sangue. Este grupo de doadores não apresenta idade mediana relacionada com pacientes portadores de mieloma.

Uma limitação importante neste estudo foi a quantidade de sujeitos avaliados. Por condições inerentes ao processo de tratamento de neoplasias, muitos pacientes que iniciaram o tratamento no estudo multicêntrico de avaliação de risco em MM não puderam fazer parte do estudo de DC. Por este motivo não foi possível estratificar os grupos de pacientes usando mais parâmetros do que os demonstrados.

O tamanho reduzido das amostras influenciou a escolha do método de análise estatística usado. Escolhemos uma análise não paramétrica e não pareada para estudar as amostras, análise de Mann-Whitney. Este método pode revelar diferenças estatísticas significantes em amostras onde não se revelariam diferenças usando análises paramétricas.

Apesar do tamanho das amostras, foi possível demonstrar que é viável produzir células dendríticas *ex vivo* a partir de monócitos do sangue de pacientes com mieloma, independente do uso de drogas imunomodulatórias e que estas células são tão

---

competentes em estimular uma resposta linfocitária mista quanto as de doadores saudáveis.

A opção de usar células autólogas para imunoterapia, além da questão óbvia de biossegurança quanto a infecções virais, vem da tentativa de melhorar a resposta estimulatória por reconhecimento do MHC de classe I por parte dos linfócitos CD8.

O próximo passo para este trabalho será definir a melhor técnica de apresentação dos antígenos tumorais para as células dendríticas autólogas dos pacientes com mieloma. O uso de lisado de células tumorais do próprio paciente como fonte de antígenos está sendo bem visto por diversos grupos, pois além de montar resposta contra os antígenos genéricos de mieloma existe a possibilidade de se expor antígenos não ainda identificados, mas respectivos do mieloma de cada paciente.

Outra forma de induzir a apresentação de antígenos tumorais específicos pelas células dendríticas é através da fusão entre estas células e plasmócitos isolados da medula dos pacientes (Avigan e cols., 2009).

Em nosso laboratório já foram testados dois protocolos de fusão para estas células: eletroporação ou fusão por polietilenoglicol (PEG). O protocolo que gerou mais fusões viáveis foi a fusão por PEG, e já foram realizados estudos de estimulação de proliferação linfocitária que mostram que estas células conseguem gerar resposta.

A imunoterapia com células dendríticas ganhou força nova com o aparecimento das novas drogas lenalidomida e bortezomib. Agora os pacientes conseguem sustentar remissão por mais tempo, abrindo espaço para que terapias com menos potência, porém com mais precisão, alcancem as células do mieloma, garantindo mais tempo de vida para os pacientes.

No entanto a realidade brasileira não permite que a maioria da população tenha acesso a estas novas drogas, que podem vir a custar, em um mês, mais do que um ano de terapia com dexametasona e talidomida.

A expectativa é que em pouco tempo o HUCFF já possa estar oferecendo imunoterapia com células dendríticas para os pacientes com mieloma, uma opção mais cara que as terapias em uso, entretanto mais barata que as novas drogas.

---

#### 4.1 Conclusões

- a) A quantidade de monócitos (CD14+) no sangue de pacientes com mieloma foi equivalente aos monócitos do sangue de controles saudáveis, e não sofreu influência da talidomida.
  - b) O rendimento na obtenção de monócitos, a sua diferenciação em células dendríticas e posterior maturação com TNF- $\alpha$  apresentaram valores equivalentes em todos os grupos de indivíduos estudados.
  - c) O protocolo usado foi capaz de gerar células dendríticas com morfologia e fenótipo de células maduras, caracterizado pela baixa ou nula expressão de CD14, pelo aumento na expressão de HLA-DR a partir de monócitos CD14+ e pela presença dos marcadores CD1a e CD86 em altos níveis.
  - d) As células dendríticas produzidas, de controles saudáveis e pacientes, apresentaram capacidade de estimulação da proliferação linfocitária em níveis semelhantes, o que indica equivalência funcional das células dendríticas nos grupos estudados.
  - e) O tratamento de manutenção que incluiu talidomida só foi capaz de modular positivamente a expressão de HLA-DR de superfície em linfócitos T CD8+ ativados e em linfócitos B CD20+, e não gerou alterações em células dendríticas, o que indica que a administração desta droga não altera o curso de uma imunoterapia.
  - f) Verificamos que a idade é um fator que modula negativamente a expressão de HLA-DR. Portanto a redução do HLA-DR encontrada em alguns pacientes pode também estar relacionada com a idade e não somente com a doença de base e seus tratamentos.
-

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANIA, R. *e cols.* Treatment for multiple myeloma - combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *Journal of the American Medical Association* [S.I.], v. 208, n. 9, p. 1680-&, 1969.
- APPELBAUM, F. R. Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy. *Nature* [S.I.], v. 411, n. 6835, p. 385-389, May 2001.
- APPELBAUM, F. R. Hematopoietic-cell transplantation at 50. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 357, n. 15, p. 1472-1475, Oct 2007.
- ARDAVIN, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* [S.I.], v. 3, n. 7, p. 582-590, Jul 2003.
- ASADULLAH, K. *e cols.* Dichotomy of glucocorticoid action in the immune system. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 23, n. 3, p. 120-122, 2002.
- ATTAL, M. *e cols.* Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 349, n. 26, p. 2495-2502, Dec 2003.
- ATTAL, M. *e cols.* Maintenance, therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood* [S.I.], v. 108, n. 10, p. 3289-3294, Nov 2006.
- AVIGAN, D. Dendritic cells: development, function and potential use for cancer immunotherapy. *Blood Reviews* [S.I.], v. 13, n. 1, p. 51-64, 1999.
- AVIGAN, D. *e cols.* Fusion cell vaccination in conjunction with stem cell transplantation is well tolerated, induces anti-tumor immunity and is associated with responses in patients with multiple myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [S.I.], v. 15, n. 2, p. 174, 2009.
- BANCHEREAU, J. *e cols.* Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 18, p. 767-+, 2000.
- BARBUTO, J. A. M. *e cols.* Dendritic cell-tumor cell hybrid vaccination for metastatic cancer. *Cancer Immunology Immunotherapy* [S.I.], v. 53, n. 12, p. 1111-1118, Dec 2004.
- BARLOGIE, B. Advances in therapy of multiple myeloma: Lessons from acute leukemia. *Clinical Cancer Research* [S.I.], v. 3, n. 12, p. 2605-2613, Dec 1997.
- BARLOGIE, B. Effective treatment of advanced multiple-myeloma refractory to alkylating-agents. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 310, n. 21, p. 1353-1356, 1984.
- BASHA, G. *e cols.* MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells. *Plos One* [S.I.], v. 3, n. 9, 2008.
-

BATAILLE, R. *e cols.* Excessive bone-resorption in human plasmacytomas - direct induction by tumor-cells in-vivo. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 90, n. 3, p. 721-724, Jul 1995.

BERENSON, J. R. *e cols.* Maintenance therapy with alternate-day prednisone improves survival in multiple myeloma patients. *Blood* [S.I.], v. 99, n. 9, p. 3163-3168, May 2002.

BRIMNES, M. K. *e cols.* Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. *Clinical and Experimental Immunology* [S.I.], v. 144, n. 1, p. 76-84, 2006.

BROWN, R. *e cols.* Either interleukin-12 or interferon-gamma can correct the dendritic cell defect induced by transforming growth factor beta(1) in patients with myeloma. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 125, n. 6, p. 743-748, Jun 2004.

BROWN, R. D. *e cols.* Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta(1) and interleukin-10. *Blood* [S.I.], v. 98, n. 10, p. 2992-2998, Nov 2001.

CELLA, M. *e cols.* Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* [S.I.], v. 9, n. 1, p. 10-16, 1997.

CELLUZZI, C. M. *e cols.* Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific, CTL-mediated protective tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 183, n. 1, p. 283-287, Jan 1996.

CHANG, C. C. J. *e cols.* Monocyte-derived CD1a(+) and CD1a(-) dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection, and capacities to direct Th cell differentiation. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 165, n. 7, p. 3584-3591, Oct 2000.

CHEN, B. *e cols.* Replicative response, immunophenotype, and functional activity of monocyte-derived versus CD34(+)-derived dendritic cells following exposure to various expansion and maturational stimuli. *Clinical Immunology* [S.I.], v. 98, n. 2, p. 280-292, 2001.

CHILD, J. A. *e cols.* High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* [S.I.], v. 348, n. 19, p. 1875-1883, May 2003.

COOPER, M. A. *e cols.* The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 22, n. 11, p. 633-640, Nov 2001.

CULL, G. *e cols.* Generation of anti-idiotypic immune responses following vaccination with idiotypic-protein pulsed dendritic cells in myeloma. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 107, n. 3, p. 648-655, Dec 1999.

D'AMICO, A.; WU, L. The early progenitors of mouse dendritic cells and

---

plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 198, n. 2, p. 293-303, 2003.

DAVIES, F. E. *e cols.* Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood* [S.I.], v. 98, n. 1, p. 210-216, 2001.

DRAYSON, M. T. *e cols.* MRC trial of alpha 2b-interferon maintenance therapy in first plateau phase of multiple myeloma. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 101, n. 1, p. 195-202, Apr 1998.

DREDGE, K. *e cols.* Immunological effects of thalidomide and its chemical and functional analogs. *Critical Reviews in Immunology* [S.I.], v. 22, n. 5-6, p. 425-437, 2002.

DUBSKY, P. *e cols.* Human dendritic cell subsets for vaccination. *Journal of Clinical Immunology* [S.I.], v. 25, n. 6, p. 551-572, Nov 2005.

DURIE, B. G. M.; SALMON, S. E. Clinical staging system for multiple-myeloma - correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* [S.I.], v. 36, n. 3, p. 842-854, 1975.

DUSTIN, M. L.; COOPER, J. A. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nature Immunology* [S.I.], v. 1, n. 1, p. 23-29, 2000.

FACON, T. *e cols.* Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta(2)-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* [S.I.], v. 97, n. 6, p. 1566-1571, 2001.

FORSTER, R. *e cols.* CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology* [S.I.], v. 8, n. 5, p. 362-371, 2008.

GARCIASANZ, R. *e cols.* Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 93, n. 1, p. 81-88, Apr 1996.

GINALDI, L. *e cols.* Immunophenotypical changes of T lymphocytes in the elderly. *Gerontology* [S.I.], v. 46, n. 5, p. 242-248, 2000.

GREIPP, P. R. *e cols.* International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology* [S.I.], v. 23, n. 15, p. 3412-3420, May 2005.

GROOTHUIS, T. A. M.; NEEFJES, J. The many roads to cross-presentation. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 202, n. 10, p. 1313-1318, 2005.

GRULICH, A. E. *e cols.* Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* [S.I.], v. 370, n. 9581, p. 59-67, Jul 2007.

---

HARRISON, S. J.; COOK, G. Immunotherapy in multiple myeloma - possibility or probability? *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 130, n. 3, p. 344-362, Aug 2005.

HASLETT, P. A. J. *e cols.* Thalidomide costimulates primary human T lymphocytes, preferentially inducing proliferation, cytokine production, and cytotoxic responses in the CD8+ subset. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 187, n. 11, p. 1885-1892, 1998.

HASLETT, P. A. J. *e cols.* Thalidomide and a thalidomide analogue drug costimulate virus-specific CD8(+) T cells in vitro. *Journal of Infectious Diseases* [S.I.], v. 187, n. 6, p. 946-955, Mar 2003.

HAYASHI, T. *e cols.* Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 128, n. 2, p. 192-203, 2005.

HSU, F. J. *e cols.* Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nature Medicine* [S.I.], v. 2, n. 1, p. 52-58, Jan 1996.

HUNGRIA, V. T. M.; MAIOLINO, A. Mieloma Múltiplo: progressos e desafios. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* [S.I.], v. 29, p. 1-2, 2007.

JAGANNATH, S. *e cols.* Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 151-157, Jan 2007.

JANEWAY, C. A. *e cols.* Imunologia. O sistema imune na saúde e na doença. *Artmed* 6ª edição, 2007.

KADOWAKI, N. Dendritic cells: a conductor of T cell differentiation. *Allergology International.*, v. 56, n. 3, p. 193-199, Sep 2007.

KARROW, N. A. *e cols.* Thalidomide stimulates splenic IgM antibody response and cytotoxic T lymphocyte activity and alters leukocyte subpopulation numbers in female B6C3F1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* [S.I.], v. 165, n. 3, p. 237-244, Jun 2000.

KIM, R. *e cols.* Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* [S.I.], v. 121, n. 1, p. 1-14, May 2007.

KINLEN, L. Infections and immune factors in cancer: the role of epidemiology. *Oncogene* [S.I.], v. 23, n. 38, p. 6341-6348, Aug 2004.

KNIGHT, S. C. *e cols.* Influence of dendritic cells on tumor-growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 82, n. 13, p. 4495-4497, 1985.

KOLB, H. J. *e cols.* Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions

---

in marrow grafted patients. *Blood* [S.I.], v. 86, n. 5, p. 2041-2050, Sep 1995.

LACY, M. Q. *e cols.* Dendritic cell-based idiotype vaccination in post transplant multiple myeloma. *Blood* [S.I.], v. 96, n. 11, p. 1613, Nov 2000.

LEBLANC, R. *e cols.* Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood* [S.I.], v. 103, n. 5, p. 1787-1790, Mar 2004.

LEE, G. R. *Wintrob's Clinical Hematology. Lea & Febiger*, v. 1 & 2, 1993

LIM, S. H.; BAILEY-WOOD, R. Idiotypic protein-pulsed dendritic cell vaccination in multiple myeloma. *International Journal of Cancer* [S.I.], v. 83, n. 2, p. 215-222, Oct 1999.

LISO, A. *e cols.* Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [S.I.], v. 6, n. 6, p. 621-627, 2000.

LIU, Y. *e cols.* Cell-Mediated Immunotherapy: A New Approach to the Treatment of Malignant Glioma. *Cancer Control* [S.I.], v. 10, n. 2, 2003. H. Lee Moffitt Cancer Center and Research Institute, Inc. Postado em 05/01/2003

LUDWIG, H. *e cols.* Interferon-alpha for induction and maintenance in multiple-myeloma - results of 2 multicenter randomized trials and summary of other studies. *Annals of Oncology* [S.I.], v. 6, n. 5, p. 467-476, May 1995.

LUNG, T. L. *e cols.* Unimpaired dendritic cells can be derived from monocytes in old age and can mobilize residual function in senescent T cells. *Vaccine* [S.I.], v. 18, n. 16, p. 1606-1612, 2000.

MACKENZIE, M. *e cols.* Immunotherapy of advanced refractory multiple myeloma with idiotype-pulsed dendritic cells (Mylovenge). *Blood* [S.I.], v. 96, n. 11, p. 713, Nov 2000.

MAIOLINO, A. *e cols.* Thalidomide plus dexamethasone as maintenance after single autologous stem cell transplantation improves progression-free survival in advanced multiple myeloma. A prospective Brazilian randomised trial. *Bone Marrow Transplantation* [S.I.], v. 43, p. S145-S145, Mar 2009.

MANZ, M. G. *e cols.* Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* [S.I.], v. 97, n. 11, p. 3333-3341, 2001.

MARASKOVSKY, E. *e cols.* Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: Multiple dendritic cell subpopulations identified. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 184, n. 5, p. 1953-1962, 1996.

MARTIN-GAYO, E. *e cols.* Plasmacytoid dendritic cells resident in human thymus drive natural Treg cell development. *Blood* [S.I.], v. 115, n. 26, p. 5366-5375, July 1, 2010.

---

MASSAIA, M. *e cols.* Idiotype vaccination in human myeloma: Generation of tumor-specific immune responses after high-dose chemotherapy. *Blood* [S.I.], v. 94, n. 2, p. 673-683, Jul 1999.

MATTHEWS, W. *e cols.* A receptor tyrosine kinase specific to hematopoietic stem and progenitor cell-enriched populations. *Cell* [S.I.], v. 65, n. 7, p. 1143-1152, 1991.

MCHUGH, S. M. *e cols.* The immunosuppressive drug thalidomide induces t-helper cell-type 2 (th2) and concomitantly inhibits th1 cytokine production in mitogen-stimulated and antigen-stimulated human peripheral-blood mononuclear cell-cultures. *Clinical and Experimental Immunology* [S.I.], v. 99, n. 2, p. 160-167, Feb 1995.

MICHALEK, J. *e cols.* Individual myeloma-specific T-cell clones eliminate tumour cells and correlate with clinical outcomes in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 148, n. 6, p. 859-867, Mar 2010.

MOHTY, M. *e cols.* Differential regulation of dendritic cell function by the Immunomodulatory drug thalidomide: implications for multiple myeloma therapy. *Bone Marrow Transplantation* [S.I.], v. 29, p. P465, 2002.

MORELLI, A. E. *e cols.* Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* [S.I.], v. 98, n. 5, p. 1512-1523, 2001.

MURPHY, G. *e cols.* Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *Prostate* [S.I.], v. 29, n. 6, p. 371-380, Dec 1996.

NESTLE, F. O. *e cols.* Vaccination of melanoma patients with peptide-pulsed dendritic cells. *Journal of Investigative Dermatology* [S.I.], v. 109, n. 3, p. 404-404, Sep 1997.

PALUMBO, A. *e cols.* Thalidomide for treatment of multiple myeloma: 10 years later. *Blood* [S.I.], v. 111, n. 8, p. 3968-3977, Apr 2008.

PANDHA, H. S. *e cols.* Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Drug News & Perspectives* [S.I.], v. 12, n. 3, p. 165-174, 1999.

PEREZ-ANDRES, M. *e cols.* 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-V beta repertoire. *Cancer* [S.I.], v. 106, n. 6, p. 1296-1305, Mar 2006.

PFEIFFER, S. *e cols.* Dendritic cells generated from the blood of patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally identical to those similarly produced from healthy donors. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 98, n. 4, p. 973-982, 1997.

---

- PICKL, W. F. *e cols.* Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14(+) peripheral blood monocytes. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 157, n. 9, p. 3850-3859, Nov 1996.
- PIEMONTE, L. *e cols.* Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *Journal of Immunology* [S.I.], v. 162, n. 11, p. 6473-6481, 1999.
- PIETSCHMANN, P. *e cols.* Surface markers and transendothelial migration of dendritic cells from elderly subjects. *Experimental Gerontology* [S.I.], v. 35, n. 2, p. 213-224, 2000.
- PRINCE, H. M. *e cols.* In vivo tracking of dendritic cells in patients with multiple myeloma. *Journal of Immunotherapy* [S.I.], v. 31, n. 2, p. 166-179, 2008.
- RAGHAVAN, M. *e cols.* MHC class I assembly: out and about. *Trends in Immunology* [S.I.], v. 29, n. 9, p. 436-443, 2008.
- RAITAKARI, M. *e cols.* T cells in myeloma. *Hematological Oncology* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 33-42, Mar 2003.
- RAJE, N. *e cols.* Bone marrow and peripheral blood dendritic cells from patients with multiple myeloma are phenotypically and functionally normal despite the detection of Kaposi's sarcoma herpesvirus gene sequences. *Blood* [S.I.], v. 93, n. 5, p. 1487-1495, 1999.
- RATTA, M. *e cols.* Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 230-237, Jul 2002.
- REICHARDT, V. *e cols.* Induction of myeloma specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood* [S.I.], v. 100, n. 11, p. 3182, 2002.
- REICHARDT, V. L. *e cols.* Idiotypic vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma - A feasibility study. *Blood* [S.I.], v. 93, n. 7, p. 2411-2419, 1999.
- REIMAN, T. *e cols.* Persistent preswitch clonotypic myeloma cells correlate with decreased survival: evidence for isotype switching within the myeloma clone. *Blood* [S.I.], v. 98, n. 9, p. 2791-2799, 2001.
- ROSNET, O. *e cols.* Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 238-248, 1996.
- ROSNET, O. *e cols.* Isolation and chromosomal localization of a novel fms-like tyrosine kinase gene. *Genomics* [S.I.], v. 9, n. 2, p. 380-385, 1991.
- RUFFINI, P. A. *e cols.* Idiomatic vaccination for B-cell malignancies as a model for therapeutic cancer vaccines: from prototype protein to second generation vaccines. *Haematologica* [S.I.], v. 87, n. 9, p. 989-1001, Sep 2002.
-

SÁNCHEZ, J. *e cols.*, Células dendríticas: biología, fisiopatología y posibles aplicaciones clínicas. *Haematologica/edición española*, v.90, n.1, p. 12-20, 2005.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble-antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor-necrosis-factor-alpha. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 179, n. 4, p. 1109-1118, 1994.

SATO, E. *e cols.* Intraepithelial CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8(+)/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [S.I.], v. 102, n. 51, p. 18538-18543, Dec 2005.

SCHUTT, P. *e cols.* Immune parameters in multiple myeloma patients: Influence of treatment and correlation with opportunistic infections. *Leukemia & Lymphoma* [S.I.], v. 47, n. 8, p. 1570-1582, 2006.

SCHUTT, P. *e cols.* In vitro dendritic cell generation and lymphocyte subsets in myeloma patients: influence of thalidomide and high-dose chemotherapy treatment. *Cancer Immunology Immunotherapy* [S.I.], v. 54, n. 5, p. 506-512, 2005.

SCHWIEBERT, L. M. *e cols.* Modulation of mhc class-ii expression in human-cells by dexamethasone. *Cellular Immunology* [S.I.], v. 165, n. 1, p. 12-19, Oct 1995.

SHANNON, E. J.; SANDOVAL, F. Thalidomide increases the synthesis of il-2 in cultures of human mononuclear-cells stimulated with concanavalin-a, staphylococcal-enterotoxin-a, and purified protein derivative. *Immunopharmacology* [S.I.], v. 31, n. 1, p. 109-116, Nov 1995.

SHANNON, E. J.; SANDOVAL, F. G. Thalidomide can costimulate or suppress CD4(+) cells' ability to incorporate H-3 -thymidine-dependence on the primary stimulant. *International Immunopharmacology* [S.I.], v. 2, n. 8, p. 1143-1153, 2002.

SHAUGHNESSY, J. *e cols.* Identification of a distinct clinical entity of myeloma that lacks chromosome 13 deletion by multi-probe TRI-FISH. *Blood* [S.I.], v. 96, n. 11, p. 645, Nov 2000.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Reviews Immunology* [S.I.], v. 2, n. 3, p. 151-161, 2002.

SHORTMAN, K.; NAIK, S. H. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nature Reviews Immunology* [S.I.], v. 7, n. 1, p. 19-30, 2007.

SIROHI, B.; POWLES, R. Multiple myeloma. *Lancet* [S.I.], v. 363, n. 9412, p. 875-887, Mar 2004.

SONG, J. X. *e cols.* Intracellular signals of T cell costimulation. *Cellular & Molecular Immunology* [S.I.], v. 5, n. 4, p. 239-247, 2008.

---

SOZZANI, S. *e cols.* Chemokines and dendritic cell traffic. *Journal of Clinical Immunology* [S.I.], v. 20, n. 3, p. 151-160, May 2000.

SPENCER, A. *e cols.* Consolidation Therapy With Low-Dose Thalidomide and Prednisolone Prolongs the Survival of Multiple Myeloma Patients Undergoing a Single Autologous Stem-Cell Transplantation Procedure. *Journal of Clinical Oncology* [S.I.], v. 27, n. 11, p. 1788-1793, Apr 2009.

STEGER, M. M. *e cols.* Morphologically and functionally intact dendritic cells can be derived from the peripheral blood of aged individuals. *Clinical and Experimental Immunology* [S.I.], v. 105, n. 3, p. 544-550, 1996.

STEINMAN, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology* [S.I.], v. 9, p. 271-296, 1991.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 137, n. 5, p. 1142-1162, 1973.

STEWART, A. K. *e cols.* How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood* [S.I.], v. 114, n. 27, p. 5436-5443, Dec 2009.

THOMPSON, J. & VAN FURTH, R. The effect of glucocorticosteroids on the kinetics of mononuclear phagocytes. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 131, n. 3, p. 429-442, Mar 1970.

TITZER, S. *e cols.* Vaccination of multiple myeloma patients with idiotype-pulsed dendritic cells: immunological and clinical aspects. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 108, n. 4, p. 805-816, Mar 2000.

VYAS, J. M. *e cols.* The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology* [S.I.], v. 8, n. 8, p. 607-618, 2008.

WEN, Y. J. *e cols.* Idiotypic protein-pulsed adherent peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells prime immune system in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* [S.I.], v. 4, n. 4, p. 957-962, 1998.

WILLIAMS, K. A. *e cols.* T cell immune reconstitution following lymphodepletion. *Seminars in Immunology* [S.I.], v. 19, n. 5, p. 318-330, 2007.

WINZLER, C. *e cols.* Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 185, n. 2, p. 317-328, 1997.

YI, Q. *e cols.* Optimizing dendritic cell-based immunotherapy in multiple myeloma. *British Journal of Haematology* [S.I.], v. 117, n. 2, p. 297-305, May 2002.

ZITVOGEL, L. *e cols.* Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: Dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *Journal of Experimental Medicine* [S.I.], v. 183, n. 1, p. 87-97, Jan 1996.

---

## 6 ANEXOS

6.1	Termo de consentimento livre e esclarecido.....	76
6.2	Definições internacionais para estadiamento do MM.....	78
6.3	Formulação de soluções preparadas no LABCAM.....	82
6.4	Mapa da placa de proliferação linfocitária.....	83
6.5	Resumo do artigo submetido à revista Haematologica.....	84

---

## 6.1 Termo de consentimento livre e esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto:** Caracterização de Células Dendríticas em Pacientes Portadores de Mieloma Múltiplo Submetidos a Estratégias Terapêuticas Baseadas no Risco.

**Introdução:**

O Mieloma Múltiplo é uma doença caracterizada por lesões ósseas, comprometimento dos rins e da medula óssea e infecções. Como conseqüências, a qualidade de vida do paciente é intensamente comprometida, padecendo de dores intensas por fraturas ósseas, necessitando de transfusões de sangue para controle da anemia.

**Finalidade:**

Este estudo nos permitirá comparar a produção e atividade de células apresentadoras de antígenos tumorais. Os resultados deste projeto nos permitirão compreender o comportamento destas células. Além disso, poderão contribuir para estabelecer um protocolo de imunoterapia que possa atingir a expectativa de uma terapêutica mais eficaz contra esta neoplasia.

**Procedimento:**

O paciente será submetido a uma coleta de 40 mL de sangue. As células vermelhas serão descartadas e as células brancas serão utilizadas nos experimentos. A utilização deste material será de uso exclusivo neste projeto de pesquisa e nenhum material será preservado.

**Risco:**

A coleta será realizada através de materiais descartáveis, o que não apresentará risco ao paciente.

**Alternativa:**

O paciente pode se recusar a participar do estudo sem prejuízo ao seu tratamento médico.

**Consentimento:**

Em virtude de considerar claras e satisfatórias as informações acima expostas eu,

---

voluntariamente, aceito participar do estudo sobre tratamento de mieloma múltiplo. Com garantia de sigilo que assegure minha privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos, quando da sua divulgação ou publicações científicas, e, garantia de acesso ao responsável pelo estudo, professor Hélio dos Santos Dutra,

---

através do telefone: (21) 2562-2249.

Responsável: Professor Hélio dos Santos Dutra.

Assinatura: \_\_\_\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_

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

Assinatura: \_\_\_\_\_

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

Pesquisador: \_\_\_\_\_

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

Assinatura: \_\_\_\_\_

---

## 6.2 Definições internacionais para estadiamento do MM

### 6.2.1 *Estágio Durie Salmon*

---

#### Estágio Salmon Durie

---

##### **Estágio I- Todos os seguintes achados**

Hemoglobina > 10 g/dl

Cálcio sérico < 12 mg/dl

Estrutura óssea normal ou (escala 0)  
 plasmocitoma solitário no estudo radiológico  
 Ig G < 5 g/dl ou Ig A < 3 g/dl ou cadeia leve urinária < 4 g/24h em eletroforese

##### **Estágio II- Achados entre os estágios I e III**

##### **Estágio III - Um ou mais dos achados abaixo**

Hemoglobina < 8,5 g/dl

Cálcio sérico > 12 mg/dl

Doença lítica óssea avançada (escala 3)  
 Ig G > 7 g/dl ou Ig A > 5 g/dl ou cadeia leve urinária > 12 g/24h em eletroforese

**A** - Função renal normal (creatinina < 2 mg/dl)

**B** - Função renal anormal (creatinina > 2 mg/dl)

---

A escala de lesão óssea é: 0 sem lesão; 1 osteoporose; 2 lesões líticas; 3 destruição óssea extensa com fraturas.

### 6.2.2 *Sistema prognóstico internacional (ISS)*

---

#### Sistema de Prognóstico Internacional (ISS)

---

**Estágio 1**       $\beta$ 2-micro < 3.5 mg/dl  
 Albumina > 3.5 g/dl

**Estágio 2**       $\beta$ 2-micro < 3.5 mg/dl  
 Albumina < 3.5 mg/dl  
 ou  
 $\beta$ 2-micro 3.5-5.5 mg/dl

**Estágio 3**       $\beta$ 2-micro > 5.5

---

ISS – *International score system*,  $\beta$ 2-micro – Beta2-microglobulina

---

### 6.2.3 Sistema de prognóstico do Intergrupo Francês de Mieloma (IFM)

Sistema prognóstico do grupo IFM	Número de Fatores	Associação de Fatores
<b>Baixo Risco</b>	<b>0-1</b>	$\beta 2\text{-micro} < 2,5\text{mg/dl} + \Delta 13 -$ $\beta 2\text{-micro} < 2,5 \text{ mg/dl} + \Delta 13+$ $\beta 2\text{-micro} > 2,5 \text{ mg/dl} + \Delta 13 -$
<b>Alto Risco</b>	<b>2</b>	$\beta 2\text{-micro} > 2,5\text{mg/dl} + \Delta 13 +$

IFM – Intergrupo Francês de Mieloma;  $\beta 2\text{-micro}$  – Beta2-microglobulina.

### 6.2.4 Critérios de resposta do Registro Internacional de Transplante de Medula óssea

Critérios de Resposta	Definição
<b>Remissão completa (RC)</b>	<p>Para a remissão completa o paciente deverá apresentar <u>todos</u> os itens abaixo:</p> <p>O não preenchimento de algum desses critérios, assim como a não realização da imunofixação (mesmo com eletroforese normal), classifica o paciente como tendo obtido resposta parcial muito boa ou resposta parcial.</p> <p>Ausência da proteína M original no soro e/ou urina, por eletroforese de proteínas e imunofixação, mantida por um mínimo de seis semanas. A presença de bandas oligoclonais compatíveis com reconstituição imunológica não exclui a remissão completa</p> <p>Menos de 5% de plasmócitos em aspirado de medula óssea, ou, no caso de mieloma não secretor, em biópsia de medula óssea. Se a ausência da proteína M se mantiver por seis semanas, o exame de medula é dispensável, exceto nos casos de mieloma não secretor.</p> <p>O não aumento no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão completa</p> <p>Desaparecimento de plasmocitomas existentes</p>
<b>Resposta Parcial Muito Boa (RPMB)</b>	<p>Para resposta parcial muito boa o paciente deverá apresentar todos os itens abaixo:</p> <p>O não preenchimento de algum desses critérios classifica o paciente como tendo obtido resposta parcial.</p>

Critérios de Resposta	Definição
#	<p>Proteína M detectada no soro e na urina somente por imunofixação e não detectada por eletroforese ou redução da proteína M maior que 90% no soro e menor que 100 mg na urina em 24 horas.</p>
Resposta Parcial (RP)	<p><i>Para a remissão parcial o paciente deverá apresentar <b>todos</b> os itens abaixo:</i></p> <p><i>O não preenchimento de algum desses critérios classifica o paciente como tendo obtido resposta mínima.</i></p> <p>Mais que 50% na redução dos níveis da proteína M, mantido por um mínimo de seis semanas.</p> <p>Redução na excreção de cadeia leve, em urina de 24 horas, de 90% ou para menos que 200mg/24h, mantido por um mínimo de seis semanas.</p> <p>Para os pacientes com mieloma não secretor, a redução de pelo menos 50% dos plasmócitos em aspirado ou biópsia (se realizada) de medula óssea, mantido pelo um mínimo de seis semanas.</p> <p>Redução de pelo menos 50% do tamanho dos plasmocitomas existentes, por avaliação clínica ou radiológica</p> <p>Estabilização no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão parcial</p> <p>Para a resposta mínima o paciente deverá apresentar <b>todos</b> os itens abaixo:</p> <p>Redução de 25 a 49% dos níveis de proteína M, sustentados por um mínimo de seis semanas</p> <p>Redução de 50 a 89% da excreção urinária de cadeia leve, em urina de 24 horas, mesmo se acima de 200mg/24h, mantido por pelo menos seis semanas.</p>
Resposta Mínima (Rmin)	<p>Para os pacientes com mieloma não secretor, a redução entre 25 a 49% dos plasmócitos no aspirado ou biópsia (se realizada) de medula óssea, mantido pelo um mínimo de seis semanas.</p> <p>Redução de 25 a 49% no tamanho dos plasmocitomas avaliado clinicamente ou por radiologia</p> <p>Estabilização no número de lesões líticas encontradas no diagnóstico. A evolução para fratura em lesão pré-existente não exclui a remissão completa</p>

<b>Crítérios de Resposta</b>	<b>Definição</b>
<b>Não Resposta (NR)</b>	Considera-se não resposta quando o paciente não apresenta os critérios para doença mínima ou doença progressiva.
<b>Doença Estável</b>	Considera-se doença estável quando os níveis dos parâmetros avaliados flutuam em até 25%, mantidos assim por pelo menos três meses.
	Para os pacientes que não estejam em remissão completa, se caracteriza por um ou mais dos achados abaixo:
	Aumento maior que 25% no nível sérico da proteína M, que também pode ser o aumento absoluto de, pelo menos, 5 g/dl no nível sérico, confirmados em no mínimo uma repetição do exame.
	Aumento maior que 25% na excreção da cadeia leve em urina de 24 horas, que também pode ser o aumento absoluto de, pelo menos, 200mg/24 da excreção, confirmados em no mínimo uma repetição do exame.
<b>Doença Progressiva (DP)</b>	Aumento maior que 25% de plasmócitos na medula óssea, em relação à avaliação da remissão, em aspirado ou biópsia, podendo ser considerado também o aumento absoluto de 10% nos plasmócitos.
	Aumento comprovado no tamanho das lesões líticas e plasmocitomas existentes
	Aparecimento de novas lesões líticas e/ou plasmocitomas
	Desenvolvimento de hipercalcemia (cálcio sérico > 11,5mg/dl ou > 2,8mmol/L), sem outra causa atribuída. A caracterização de recaída de doença requer um ou mais dos achados abaixo, nos pacientes em remissão completa:
	Reaparecimento da proteína M na urina ou sangue, por exame de imunofixação ou eletroforese de proteínas, confirmado em pelo menos uma repetição e excluindo a reconstituição oligoclonal.
<b>Recaída de doença (RD)</b>	Presença de mais de 5% de plasmócitos na medula óssea por aspirado ou biópsia
	Aparecimento de novas, ou crescimento definitivo do tamanho, de lesões ósseas líticas ou plasmocitomas.
	Desenvolvimento de hipercalcemia (cálcio sérico > 11,5mg/dl ou > 2,8mmol/L), sem outra causa atribuída

### 6.3 Formulação de soluções preparadas no LABCAM

#### 6.3.1 PBS 0,15M NaCl

NaCl_____	80g
KCl_____	2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O_____	22,5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	2g
H <sub>2</sub> O destilada__q.s.p.____	1000mL
NaN <sub>3</sub> _____	0,1%

#### 6.3.2 BSS-FACS

- Solução A:

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	0,6g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O_____	3,58g
H <sub>2</sub> O destilada_____q.s.p.	1000mL

- Solução B:

CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O_____	1,86g
KCl_____	4g
NaCl_____	80g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O_____	2g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O_____	2g
H <sub>2</sub> O destilada_____q.s.p.	1000mL

- Preparo: 100mL da solução A + 100mL da solução B, adicionar 0,1% de NaN<sub>3</sub>.

#### 6.3.3 Paraformaldeído 1%

Paraformaldeído_____	1g
PBS_____q.s.p._____	100mL
NaN <sub>3</sub> _____	0,1%



## 6.5 Resumo do artigo submetido à revista *Haematologica*

### **Phenotype Analysis of Lymphocytes, Monocytes and Dendritic Cells of Multiple Myeloma Patients in Maintenance with Thalidomide and Dexamethasone after Autologous Transplantation**

Roberto J. P. Magalhães<sup>1</sup>, Gabriel A. C. V. Silva<sup>1</sup>, Marcia Garnica<sup>1</sup>, Ilana Dines<sup>2</sup>, Carmen M. Nogueira<sup>1</sup>, Vivian M. Runjaneck<sup>2</sup>, Maria I. D. Rossi<sup>1</sup>, Carolina O. Cruz<sup>1</sup>, Glicinia S. Pimenta<sup>1</sup>, Radovan Borojevic<sup>3</sup>, Angelo Maiolino<sup>1</sup>, and Helio S Dutra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University Hospital, Hematology Service, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; <sup>2</sup>Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, and <sup>3</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence: Angelo Maiolino, Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rua Professor Rodolpho Paulo Rocco 255 – Cidade Universitária – 21941-913 – Rio de Janeiro – Brazil. Phone: +5521-25622462 Fax: +5521-25622460 E-mail: maiolino@hucff.ufrj.br

**Funding:** MG was supported by Pró Vita, Rio de Janeiro and by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); AM was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, grant 301455/2006-6; HLS was supported by FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado do Rio de Janeiro) grant E-26/170.548/2004.

---

## ABSTRACT

**Background:** During the treatment of multiple myeloma (MM), immune system is hardly affected with decreased humoral and cellular responses. Immunomodulatory drugs, such as thalidomide and dexamethasone, have been introduced in different moments, such as in maintenance post autologous stem cell transplant (ASCT). In this study, we analyzed the immune influence of two different maintenance strategies (dexamethasone vs. thalidomide + dexamethasone) after ASCT in MM patients, according to lymphocytes subsets, monocytes and dendritic cells obtained *in vitro*.

**Design and Methods:** This study included patients enrolled in a multicenter clinical trial that compared two different maintenance treatments after ASCT. The immune status before and after maintenance treatment was compared to health controls. Treatment arms (DEX and TAL-DEX) were compared regarding lymphocytes subsets and total number of monocytes by flow-cytometry. Generation of dendritic cells *in vitro* by monocytes culture and a functional assay were also analyzed.

**Results:** Post maintenance therapy MM patients had decrease in CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio, as well as an increase in the number of monocytes when compared to health controls, independently of the treatment arm (DEX or TAL-DEX). Patients in TAL-DEX had also fewer CD19<sup>+</sup> B lymphocytes. Performance of monocytes cultures to generate dendritic cells was similar between patients and controls, although it was necessary almost two times more monocytes to obtain the same number of DC in patients.

**Conclusion:** Steroids with or without thalidomide as maintenance modified the immune reconstitution after ASCT in immune status regarding lymphocytes subsets, monocytes and dendritic cells.

---

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)