



MATHEUS RODRIGUES LOPES

**SISTEMA IMUNE E FMNL1 EM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA**

Campinas

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

MATHEUS RODRIGUES LOPES

**SISTEMA IMUNE E FMNL1 EM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA**

Orientadora: Dra. Patrícia Maria Bergamo Favaro

Co-orientadora: Dra Sara Teresinha Olalla Saad

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELO ALUNO MATHEUS RODRIGUES LOPES
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. PATRÍCIA MARIA BERGAMO FAVARO**

Assinatura do Orientador

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

L881s Lopes, Matheus Rodrigues, 1986-
 Sistema imune e FMNL1 em síndrome
 mielodisplásica / Matheus Rodrigues Lopes. --
 Campinas, SP : [s.n.], 2012.

 Orientador : Patrícia Maria Bergamo Favaro.
 Coorientador : Sara Teresinha Olalla Saad.
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
 Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

 1. Sistema imunológico. 2. Formin-like 1 protein,
 human. 3. Linfócitos T. 4. Linfócitos T reguladores. 5.
 Interleucina-10. I. Favaro, Patrícia Maria Bergamo. II.
 Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. III. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
 IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Immune system and FMNL1 in Myelodysplastic syndrome.

Palavras-chave em inglês:

Immune system
Formin-like 1 protein, human
T lymphocytes
T-Lymphocytes, Regulatory
Interleukin-10

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Patrícia Maria Bergamo Favaro [Orientador]
Roger Chammas
Katia Borgia Barbosa Pagnano

Data da defesa: 09-10-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

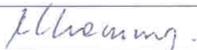
Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Matheus Rodrigues Lopes

Orientador(a): Profa. Dra. Patrícia Maria Bergamo Favaro
Co-Orientador(a): Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Roger Chammas



Professor (a) Doutor (a) Katia Borgia Barbosa Pagnano



Professor (a) Doutor (a) Patrícia Maria Bergamo Favaro



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/10/2012

Dedicatória

Dedico este trabalho àqueles que me apoiaram nessa trajetória, em especial ao meu irmão Marcelo, meu padrasto Francisco e principalmente aquela que me apoiou sempre e incondicionalmente, minha mãe Leni

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e mostrar os caminhos nas horas incertas.

A minha mãe Leni, que por vezes mesmo sem entender minhas escolhas, me apoiou sempre e incondicionalmente. Por me ensinar a dar valor nas pequenas realizações e principalmente pelo amor e carinho de todos os dias.

A minha família, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, e compreensão. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

A minha orientadora Profa. Dra. Patricia Favaro, por sua grande orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho, por ter visto potencial em mim quando eu mesmo não o via, mas principalmente por ser um exemplo como pesquisadora e me permitir adquirir ensinamentos que levarei por toda vida.

À Profa. Dra. Sara Saad, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes e por ser um modelo de liderança e conhecimento.

À Dra Fabíola Traina, pela competência científica e pelo inestimável apoio na preparação e elaboração desse trabalho, pela disponibilidade sempre manifestada e pela amizade.

Aos amigos João Agostinho e João Kleber, que muito me ajudaram nos experimentos, pela amizade e aprendizados na bancada.

Aos meus amigos, principalmente Camila e Mayanderson, pelas alegrias, tristezas, aventuras, conversas, pela companhia e principalmente apoio, fundamentais nessa etapa de minha vida.

Aos demais colaboradores do trabalho, pela amizade e auxílio na realização desse trabalho.

À Tereza Sueko, pela ajuda, amizade e ensinamentos essenciais no laboratório.

A todos os alunos, Victor, Tiago, Bruna, Rita, Flavia, Fernanda, Vanessa, Karin, Mariana Lazarini, Juliana, Laure, Letícia, Isabela, Aline, Renata, Fernando, Samuel, Paula, Anamika, Gisele, Marilisa, Rafael, Bruno, Pedro, Mariana Baratti e Carol, agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências, frustrações e as alegrias de todos os dias.

Aos funcionários Karla, Fernanda, Luis, Simone, Janine, Lena, Irene, Ana Leda e Audrey por me auxiliarem durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos docentes da disciplina de Hematologia da UNICAMP, Dr. Fernando F. Costa, Dra. Irene Lorand-Metze, Dra. Joyce Maria Annichino Bizzacchi, Dr. Cármino A. de Souza pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado.

À Nicola Conran pelo auxílio na correção ortográfica do inglês.

À Dra. Simone Gilli pela imensa contribuição e sugestões para realização deste trabalho.

Ao Helymar pela grande ajuda na parte estatística.

Aos funcionários da plaquetaferese, pela ajuda na coleta das amostras do grupo controle.

Aos funcionários do apoio didático pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À secretária Patrícia e à analista administrativa Raquel pela disponibilidade em ajudar e pela amizade.

Às secretárias da pós-graduação Salete e Regina pela disponibilidade no serviço burocrático.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa, por aceitarem fazer parte desta grande etapa da minha vida.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas...”

Luis Fernando Verissimo

RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por hematopoese ineficaz e risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA). SMD de baixo de risco é caracterizada por um aumento de apoptose na medula óssea e alterações clínicas com perfil autoimune, enquanto que na SMD de alto risco há uma evasão imune, baixa apoptose e danos secundários ao DNA, contribuindo para a progressão para LMA. Essas evidências, junto com os dados de terapia imunossupressora em pacientes com SMD, sugerem o papel do sistema imune na progressão desta doença. Entretanto, o papel do sistema imune não é claro, e estudos que abordem o perfil das células T são importantes para o melhor entendimento da patogênese da SMD.

Formin-like 1 (FMNL1) pertence à família de proteínas formina, indispensáveis para muitos processos fundamentais actina-dependentes. FMNL1 é restritamente expressa em células derivadas de linhagem hematopoética e superexpressa em células neoplásicas hematopoéticas malignas. Recentemente, foi descrito que FMNL1 está envolvida no processo de citotoxicidade de células CD8⁺. Desse modo, estudar a expressão de FMNL1 tanto nos linfócitos como nas células da MO dos pacientes com SMD, poderia contribuir para o melhor entendimento do papel dessa nova proteína neste modelo de neoplasia hematológica.

No presente estudo, foi observada uma diminuição significativa na contagem absoluta de linfócitos periféricos no grupo SMD, após ajuste para idade, quando comparada com o grupo de doadores saudáveis (controle). Entretanto, houve um aumento da frequência de células CD3⁺, resultante do aumento significativo das subpopulações de células CD3⁺CD4⁺ no grupo de alto risco e CD3⁺CD8⁺ no grupo de baixo risco, de acordo com as classificações FAB e WHO. A razão CD4:CD8 encontrou-se aumentada no grupo de alto risco comparado com o de baixo risco. Dependência transfusional foi correlacionada positivamente com a porcentagem de CD3⁺CD4⁺, enquanto que a idade dos pacientes correlacionou-se de forma negativa com a porcentagem de CD3⁺ e CD3⁺CD8⁺. Os níveis de expressão de *FOXP3*, nas células CD3⁺ de sangue periférico, foram significativamente menores no grupo de baixo risco quando comparado com o grupo controle, e esse padrão se repetiu para a expressão de *IL10*.

A quantificação dos transcritos de *IL10* correlacionou-se negativamente com a porcentagem de células $CD3^+CD8^+$. Em conclusão, evidenciamos que pacientes com SMD apresentaram um menor número de linfócitos, porém com a frequências das células T $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ aumentadas. Os pacientes de baixo risco apresentaram uma diminuição da expressão de *FOXP3* e de *IL10*, quadro característico de um microambiente apoptótico e inflamatório. Já no grupo de alto risco, a expressão de *FOXP3* e de *IL10* aumenta em relação ao grupo de baixo risco. É interessante ressaltar que nos pacientes com SMD houve uma correlação entre o aumento da expressão de *IL10* e a diminuição das células T $CD3^+CD8^+$, sugerindo a contribuição das Tregs na progressão da doença através da produção de IL10.

A análise da expressão de *FMNLI* em células $CD3^+$ de sangue periférico não denotou diferenças significativas entre os pacientes com SMD e o grupo controle. Entretanto observou-se uma correlação positiva entre a expressão de *FMNLI* e o número de células $CD3^+CD4^+$ e ambos com a dependência transfusional. Quanto à expressão de *FMNLI* em amostras de MO, houve uma expressão significativamente menor nos pacientes com SMD quando comparado com as células de doadores normais, além de uma correlação negativa entre *FMNLI* e número de citopenias. Usando modelos de linhagens celulares hematopoéticas para a diferenciação, observou-se um aumento significativo na expressão gênica e protéica de FMNL1 durante a diferenciação megacariocítica. Esses resultados sugerem a participação de FMNL1 na ativação de linfócitos $CD4^+$ no sangue periférico e na diferenciação hematopoética na medula óssea.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of disorders characterized by ineffective hematopoiesis and risk of progression towards acute myeloid leukemia. Low-risk MDS is characterized by increased apoptosis in the bone marrow (BM), with a clinical autoimmune profile, whereas in high-risk MDS an immune evasion, low apoptosis and secondary DNA damage occurs, contributing to the progression of AML. This evidence, together with the data of immunosuppressive therapy in patients with MDS, suggests a role of the immune system in the progression of this disease. However, this role of the immune system is remains unclear, and studies that address the profile of T cells are important for a better understanding of the pathogenesis of MDS.

Formin-like 1 (FMNL1) belongs to the family of proteins formina indispensable for many fundamental processes in actin-dependent. FMNL1 is strictly expressed in hematopoietic lineage derived cells, and overexpressed in malignant hematopoietic neoplastic cells. FMNL1 has recently been reported to be involved in the cytotoxicity of CD8⁺ cells. Thus, studies on the expression of FMNL1, both in lymphocytes and BM cells of MDS patients, could contribute to a better understanding of the role of this protein in this new model of hematologic malignancy.

In the present study, we observed a significant decrease in absolute peripheral lymphocyte counts in the MDS group, after adjusting for age, compared with the healthy donor group (control). However, there was an increased frequency of CD3⁺, resulting in a significant increase of the CD3⁺CD4⁺ subpopulation in high risk and CD3⁺CD8⁺ in MDS low risk, according to FAB and WHO classifications. CD4:CD8 ratio was increased in the high risk when compared to the low risk group. Transfusion dependence was positively correlated with the percentage of CD3⁺CD4⁺, whereas the age of patients correlated negatively with the percentage of CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺. The expression levels of *FOXP3*, in peripheral blood CD3⁺ cells, was significantly lower in the low risk group compared to controls and this pattern was repeated for the expression of *IL10*. Interestingly, *IL10* transcripts correlated negatively with the percentage of CD3⁺CD8⁺. In conclusion, we found that patients with MDS had a lower lymphocyte number, however presented an increased frequency of CD3⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells. Our low risk patients showed a decreased expression of *FOXP3* and *IL10*, characteristic

of apoptotic and inflammatory microenvironment. In the high risk group, the expression of *FOXP3* and *IL10* was normal. Interestingly, there was a correlation between increasing expression of *IL10* and reduction of CD3⁺CD8⁺ T cells in patients, suggesting the contribution of Treg in disease progression due to IL10 production.

Analysis of *FMNLI* expression in CD3⁺ cells of peripheral blood showed no significant differences between patients with MDS and the control group. However, there was a positive correlation between *FMNLI* expression and the number of CD3⁺CD4⁺, and both were transfusion dependence. *FMNLI* expression in BM samples was significantly lower in MDS patients when compared with cells from normal donors, and there was a negative correlation between *FMNLI* and number of cytopenias. Using models of hematopoietic cell lineages for differentiation, we observed an increase in gene and protein expression of *FMNLI* during megakaryocytic and granulocytic differentiation. These results suggest the participation of FMNL1 in the activation of CD4⁺ lymphocytes in peripheral blood and bone marrow hematopoietic differentiation.

LISTA DE ABREVIACÕES

AAG – anemia aplástica grave
ACD - ácido citrato dextrose
Akt - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
APC - alofocianina
AR – anemia refratária
AREB – anemia refratária com excesso de blastos
AREBt – anemia refratária com excesso de blastos em transformação
ARSA – anemia refratária com sideroblastos em anel
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATG - anti-timoglobulina
ATRA - ácido all-trans-retinóico
BSA - albumina sérica bovina
cDNA - *complementary DNA*
CRDM – citopenia refratária com displasia multilinear
CRDU – citopenia refratária com displasia unilinear
CTLA4 - *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*
DNA - *Desoxiribonucleic Acid*
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
FAB - *French-American-British*
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
FMNL1 - *Formin-like 1*
HE - hemina
HPRT - *hypoxanthine phosphoribosyltransferase*
HU - hidroxiuréia
IL10 – Interleucina 10
Int-1 – Intermediário-1
Int-2 – Intermediário-2
IFN γ – Interferon γ
IPSS - *Internacional Prognostic Score System*
LLC - Leucemia linfocítica crônica
LMA - Leucemia mieloide aguda
LMMC – Leucemia mielomonocítica crônica
MHC - *Major histocompatibility complex*
MO – Medula óssea
NK – células *natural killer*

PBMC – *peripheral blood mononuclear cell*
PBS - *phosphate buffered saline*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PCRq – PCR quantitativo
PE – *Phycoeritrine*
PMA - *phorbol myristate acetate*
R-WPSS - índice prognóstico baseado na WHO revisado
RNA - *Ribonucleic Acid*
RNAm – RNA mensageiro
RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SFB – Soro fetal bovino
SMD - Síndrome mielodisplásica
SMD 5q⁻ - SMD associada com deleção isolada no braço longo do cromossomo 5
SMD-N – Síndrome mielodisplásica não-classificada
TGFβ1 - *Transforming growth factor beta 1*
TNFα – *Tumor necrosis factor α*
TRAIL - *TNF-related apoptosis-inducing ligand*
Tregs – Células T regulatórias
WHO - *World Health Organization*
WPSS - índice prognóstico baseado na WHO

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD.....	60
Tabela 2. Concentração e sequência dos iniciadores.....	66
Tabela 3. Descrição das linhagens leucêmicas.....	69
Tabela 4. Resultados da análise de regressão univariada e multivariada para porcentagem de células CD3 ⁺ , CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺	77
Tabela 5. Resultado da análise de regressão linear univariada e multivariada para expressão de <i>FMNLI</i> em células CD3 ⁺ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD (n=49).....	86
Tabela 6. Resultado da análise de regressão linear univariada e multivariada para expressão de <i>FMNLI</i> em células totais de MO com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD (n=49).....	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Patogênese da SMD: possíveis mecanismos e suas interações. A SMD provavelmente resulta de uma transformação genética na célula-tronco hematopoética. No entanto, posteriores alterações genéticas e epigenéticas contribuem para a diversidade fenotípica, a ineficiência hematopoética e a susceptibilidade à transformação leucêmica. Respostas imunológicas, alterações de citocinas e do estroma também contribuem para o fenótipo da doença (adaptado de Tefferi e Vardiman, 2009 [5])..... 42
- Figura 2. Transformação maligna e manifestações autoimunes são aspectos clínicos da SMD. A desregulação do sistema imune possivelmente participa desse processo (Adaptado de Voulgarelis *et al.*, 2004 [12])..... 43
- Figura 3. Os clones displásicos apresentam antígenos superexpressos ou expressam novos antígenos, provocando a expansão de clones de células T citotóxicas. Estas são responsáveis pela secreção de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF α) e interferon- γ (IFN γ) que promovem a apoptose de células progenitoras, suprimindo a hematopoese (adaptado de Sloand and Barret, 2010 [40])..... 46
- Figura 4. Perfil do sistema imune na SMD de baixo e alto risco. No baixo risco, a principal característica da MO é a apoptose e já foi descrito um aumento das células T, aumento de linfócitos B e Th17, ativação do sistema Fas/FasL, de TRAIL e caspases, de citocinas como TNF α e IFN γ , com diminuição das células Tregs. Enquanto no alto risco da doença há uma característica de evasão imune, com redução das células *natural killer* (NK), aumento das Tregs e consequentemente diminuição da apoptose (adaptado de Aggarwal *et al.*, 2011 [55])..... 48
- Figura 5. Gel de agarose desnaturante à 1,2% de RNA total. As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra. 64
- Figura 6. Produtos resultantes da PCR para amplificação de β 2–microglobulina visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3–8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de β 2 –microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida. 66
- Figura 7. Citometria de fluxo utilizada para análise das subpopulações de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺. P1: janela na população de linfócitos (A), *dot plot* representando as células CD3⁺CD4⁺ (B), *dot plot* representando as células CD3⁺CD8⁺ (C). 69
- Figura 8. Contagem absoluta de linfócitos periféricos em pacientes com SMD e no grupo controle. (A e B) Análise de regressão multivariada foi realizada com a contagem de linfócitos como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$) e foi retirado do modelo final. A linha tracejada horizontal vermelha representa o limite inferior de normalidade de referência da contagem de linfócitos ($1,1 \times 10^3$ células/mm³). O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO. 73
- Figura 9. Frequência de células T CD3⁺ e de suas subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em SMD e grupo controle determinada por citometria de fluxo. A análise de regressão multivariada foi realizada com a % CD3 (A e B),

- %CD3⁺CD4⁺ (C e D) e % CD3⁺CD8⁺ (E e F), como as variáveis dependentes, e idade e status da doença como as variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO. 75
- Figura 10. Razão CD4:CD8 de linfócitos periféricos em SMD e grupo controle. (A e B) Análise de regressão multivariada foi realizada com a razão CD4:CD8 como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO. 76
- Figura 11. Expressão do RNAm de *FOXP3* nas células CD3⁺ de doadores normais e de pacientes com SMD através de PCRq. (A e B) O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. Uma amostra de controle saudável foi utilizada como amostra calibradora. O valor de P e o número de pacientes estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO. 78
- Figura 12. Expressão do RNAm de *IL10* nas células CD3⁺ de doadores normais e de pacientes com SMD através de PCRq. (A e B) O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. Uma amostra de controle saudável foi utilizada como amostra calibradora. O valor de P e o número de pacientes estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO. 79
- Figura 13. Expressão de *TGFβ1* e *CTLA4* em células CD3⁺ de sangue periférico através de PCRq. Análise de regressão multivariada foi realizada com expressão de *TGFβ1* (A e B) e expressão de *CTLA4* (C e D), como as variáveis dependentes, e idade e status da doença como as variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO..... 80
- Figura 14. Correlação entre os transcritos de *FOXP3* e marcadores de ativação das células Tregs. A expressão relativa de cada gene foi determinada por PCRq. A correlação da expressão de *FOXP3* com as expressões de *IL10* (A), *TGFβ1* (B) e *CTLA4* (C) foi realizada através do teste de correlação de Spearman. 81
- Figura 15. Correlação entre o log da expressão relativa de *IL10/HPRT* e a porcentagem de células CD3⁺CD8⁺ em sangue periférico. A porcentagem de CD3⁺CD8⁺ foi determinada por citometria de fluxo e a expressão relativa de *IL10* através de PCRq. Teste de correlação de *Spearman*. 82
- Figura 16. Expressão gênica de *FMNLI* em células CD3⁺ de sangue periférico em SMD e grupo controle através de PCRq (A) Expressão de *FMNLI* nos controles e nos pacientes com SMD analisados através do teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam a mediana. (B-C) Análise de regressão multivariada foi realizada com o log da expressão de *FMNLI* como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO..... 84

- Figura 17. Correlação entre os transcritos de *FMNLI* e a porcentagem de células CD3⁺CD4⁺ (A) e CD3⁺CD8⁺ (B) em sangue periférico. As porcentagens de CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ foram determinadas por citometria de fluxo e a expressão relativa de *FMNLI* através de PCRq. Teste de correlação de *Spearman*. 85
- Figura 18. Expressão gênica de *FMNLI* em células totais de MO em SMD e grupo controle através de PCRq. Análise de regressão multivariada foi realizada com o log da expressão de *FMNLI* como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de *P* e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com a classificação FAB. 87
- Figura 19. Expressão de FMNL1 durante a diferenciação celular megacariocítica. (A) Imagens de contraste de fase e *dot plot* da expressão do marcador de superfície CD61 de células K562 controle (-PMA) e de células K562 induzidas para diferenciação megacariocítica após 4 dias de tratamento com PMA (+PMA). (B) Expressão do RNAm de *FMNLI*. (C) Expressão protéica de FMNL1. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. A expressão protéica foi analisada por *Western blot* com anti-FMNL1 e anti-Actina que foi utilizado como controle para equalizar as amostras. As barras indicam a média + desvio padrão de três experimentos independentes. Teste t de Student. 90
- Figura 20. Expressão de FMNL1 durante a diferenciação celular granulocítica. (A) Preparação do *citospin* com coloração de Rosenfeld e *dot plot* da expressão do marcador de superfície CD11b de células NB4 controle (-ATRA) e de células NB4 induzidas para diferenciação granulocítica após 4 dias de tratamento com ATRA (+ATRA). Expressão do RNAm (B) e da proteína (C) FMNL1. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. A expressão protéica foi analisada por *Western blot* com anti-FMNL1 e anti-Actina que foi utilizado como controle para equalizar as amostras. As barras indicam a média + desvio padrão de quatro experimentos independentes. Teste t de Student. 92
- Figura 21. Expressão de FMNL1 durante a diferenciação celular eritrocítica. (A) Coloração de benzidina corando a hemoglobina, (B) PCRq da expressão das cadeias de globina de células KU812 controle (- HE e HU) e de células KU812 induzidas para diferenciação eritrocítica após 4 dias de tratamento com hemina e hidroxiuréia (+ HE e HU). (C) Expressão do RNAm de *FMNLI*. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. As barras indicam a média + desvio padrão de três experimentos independentes. Teste t de Student. 94
- Figura 22. Interação entre FMNL1, células T CD4⁺ e a dependência transfusional na SMD. Foi observada, através do teste de regressão multivariada, em pacientes com SMD uma correlação positiva entre três variáveis: dependência transfusional, expressão de *FMNLI* e frequência das células CD3⁺CD4⁺. 101
- Figura 23. Modelo da expressão de FMNL1 durante a diferenciação megacariocítica e granulocítica. A expressão de FMNL1 é menor nas células imaturas e aumenta à medida que ocorre a diferenciação. 102
- Figura 24. Regulação das células CD8⁺, através da produção de IL10 pelas Tregs em SMD de baixo e alto risco. 103

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
LISTA DE ABREVIACÕES	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE FIGURAS	xxix
SUMÁRIO	xxxv
INTRODUÇÃO	39
Síndromes mielodislásicas	41
Classificações das Síndromes Mielodislásicas	43
Terapia imunossupressora na SMD	45
O sistema imune na SMD	47
Citocinas	49
Formin-like 1 (FMNL1)	50
OBJETIVOS	53
Objetivos Gerais	55
Objetivos Específicos	55
CASUÍSTICA	57
Doadores saudáveis	59
Pacientes com diagnóstico de mielodislásia	59
MÉTODOS	61
Processamento das amostras	63
Contagem absoluta do número de linfócitos	63
Extração do RNA total	63
Tratamento do RNA total com DNase I	64
Transcrição em cDNA	65
PCR quantitativo (PCRq)	66
Western Blot	67
Citometria de fluxo	68
Linhagens celulares	69
Diferenciação em linhagens celulares hematopóéticas	70
Análise Estatística	70
RESULTADOS	71
1. Estudo do perfil dos linfócitos em sangue periférico	73
1.1 Número absoluto de linfócitos em pacientes com SMD e grupo controle	73
1.2 Frequência das células CD3 ⁺ e das suas subpopulações CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ em sangue periférico de pacientes com SMD e grupo controle	74
1.3 Razão CD4:CD8 em pacientes com SMD e grupo controle	76
1.4. Correlação da frequência de células CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD	76
2. Estudo de expressão dos genes FOXP3, IL10, TGFB1 e CTLA4 em células CD3 ⁺ de sangue periférico	78
2.1. Análise dos transcritos de <i>FOXP3</i>	78
2.2. Análise dos transcritos de <i>IL10</i>	79
2.3. Análise dos transcritos de <i>TGFβ1</i> e <i>CTLA4</i>	80
2.4. Correlação da expressão gênica de <i>FOXP3</i> com os marcadores de ativação das células Tregs	81

2.5. Correlação da expressão gênica de <i>IL10</i> com células CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺	82
3. Estudo de expressão de FMNL1 em células CD3 ⁺ de sangue periférico	83
3.1. Transcritos de <i>FMNL1</i>	83
3.2. Correlação da expressão gênica de <i>FMNL1</i> com células CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD8 ⁺	85
3.3. Correlação da expressão gênica de <i>FMNL1</i> em células CD3 ⁺ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD	86
4. Estudo de expressão de FMNL1 em células totais de medula óssea	87
4.1. Transcritos de <i>FMNL1</i>	87
4.2. Correlação da expressão gênica de <i>FMNL1</i> em células totais de medula óssea com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD	88
5. Estudos de expressão de FMNL1 em modelos de diferenciação hematopoética	89
5.1. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação megacariocítica em células K562	89
5.2. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação granulocítica em células NB4	91
5.3. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação eritrocítica em células KU812	93
DISCUSSÃO	95
CONCLUSÃO	105
REFERÊNCIAS	109
Anexos I	121
Anexo II	125

INTRODUÇÃO

Síndromes mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMD) constituem um grupo de desordens clonais da célula-tronco hematopoética caracterizadas por citopenias, medula óssea displásica, hematopoese ineficaz e risco de progressão para leucemia mieloide aguda (LMA) [1]. A incidência da doença aumenta progressivamente com a idade [2] e globalmente a SMD afeta aproximadamente 1 em cada 500 pessoas com mais de 60 anos de idade. A incidência é significativamente maior nos homens do que nas mulheres [3].

A patogênese precisa da SMD não é conhecida, mas é considerado, em geral, que a doença inicia-se de uma célula-tronco que tenha sofrido um dano irreversível no seu DNA. A heterogeneidade dos achados citogenéticos e histológicos de medula óssea (MO) sugere que esta doença constitui um grupo de entidades com alterações moleculares distintas e graus variáveis de hematopoese ineficaz, além de suscetibilidade para evolução para LMA [4]. Além disso, mutações secundárias, haploinsuficiência, alterações epigenéticas, alterações no sistema imune e nas células estromais também podem contribuir para o fenótipo da doença (Figura 1) [5]. Outros fatores de risco incluem antecedente de tratamento com quimioterapia ou radioterapia e, em menor extensão, o uso de tabaco e a exposição ocupacional a solventes ou produtos químicos agrícolas [6].

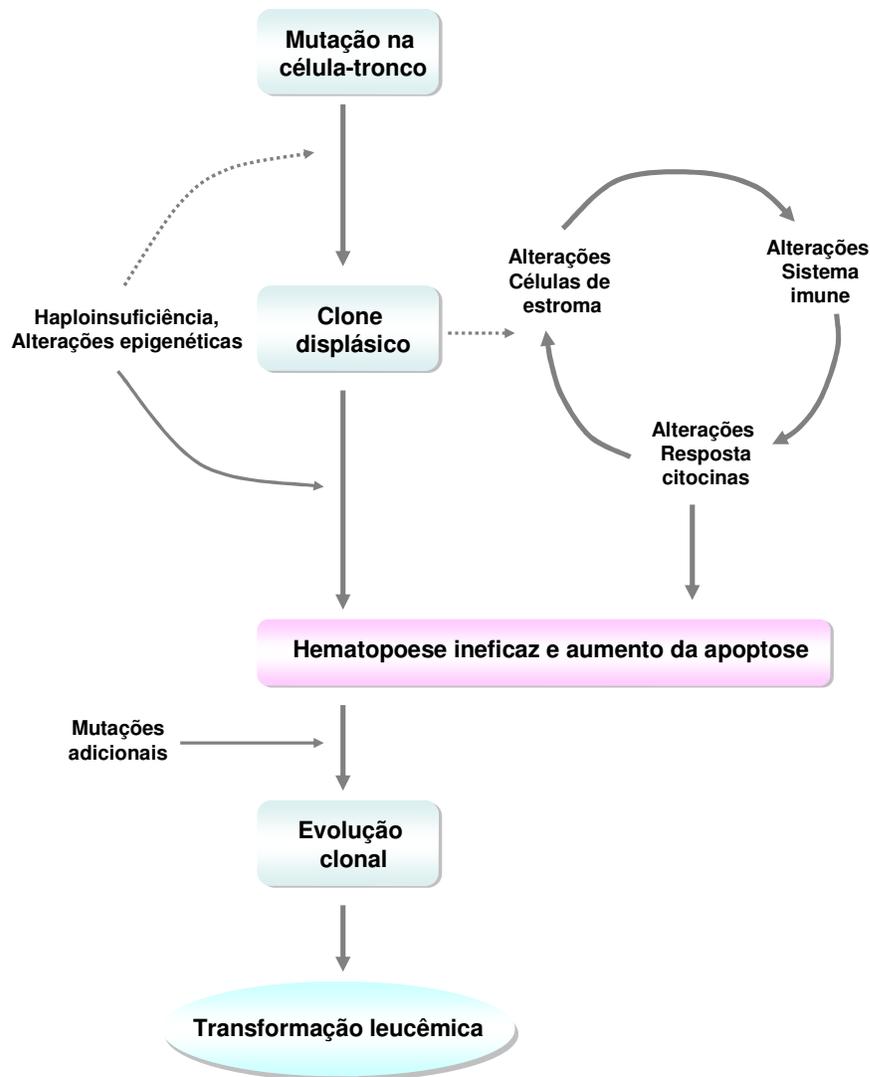


Figura 1. Patogênese da SMD: possíveis mecanismos e suas interações. A SMD provavelmente resulta de uma transformação genética na célula-tronco hematopoética. No entanto, posteriores alterações genéticas e epigenéticas contribuem para a diversidade fenotípica, a ineficiência hematopoética e a susceptibilidade à transformação leucêmica. Respostas imunológicas, alterações de citocinas e do estroma também contribuem para o fenótipo da doença (adaptado de Tefferi e Vardiman, 2009 [5]).

Apesar da MO geralmente apresentar-se normal ou hiperclular (apenas 15% dos casos apresentam MO hipocelular [7]), a citopenia periférica é a principal característica dos pacientes com SMD [8]. Isto se deve a uma hematopoese ineficaz e consequentemente vários graus de anemia, leucopenia e trombocitopenia no sangue periférico [9, 10]. O aumento da morte celular programada (ou apoptose) das células da MO é o responsável, em grande parte, pela hematopoese ineficaz, pois a apoptose

ocorre tanto no clone displásico como nas células hematopoéticas normais. A apoptose aumentada é uma característica bem descrita nos estadios iniciais da doença, enquanto que os estadios avançados são caracterizados por uma resistência à mesma [11]. Várias evidências, baseadas em achados laboratoriais, sugerem o papel do sistema imune nesse processo de falência medular, pois alguns casos de SMD estão associados com autoimunidade, mielossupressão de células T e citopenias induzidas por citocinas (Figura 2) [12]

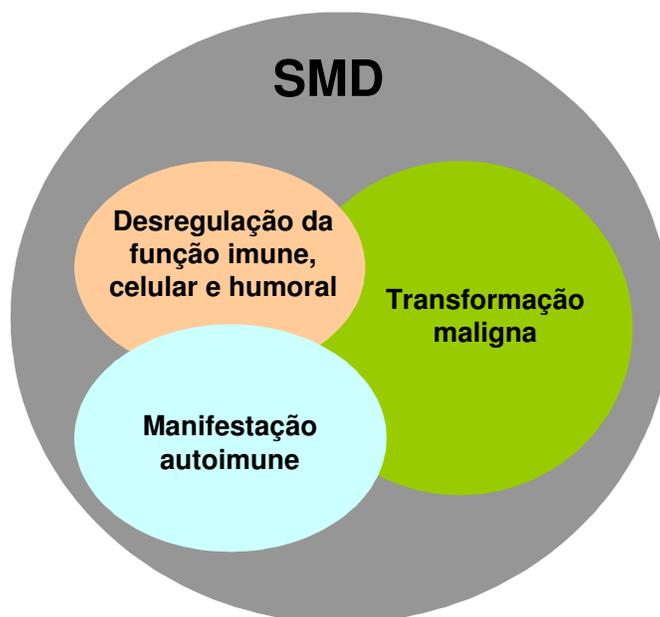


Figura 2. Transformação maligna e manifestações autoimunes são aspectos clínicos da SMD. A desregulação do sistema imune possivelmente participa desse processo (Adaptado de Voulgarelis *et al.*, 2004 [12]).

Classificações das Síndromes Mielodisplásicas

No início do século passado, as síndromes mielodisplásicas eram conhecidas como anemia pseudo-aplásticas devido a combinação de citopenia e MO hiperclular [13]. Em 1941, ao conceito de anemia pseudo-aplástica foram agregadas outras formas de anemia que eram não-responsivas à terapia utilizada na época; coletivamente, estes distúrbios foram denominados como "anemia refratária" [14]. Posteriormente, muitos outros termos foram utilizados antes que a doença adquirisse a sua designação oficial, de síndrome mielodisplásica [5]. Devido à grande heterogeneidade da doença, diversas classificações foram propostas. Em 1982, o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB)

estabeleceu a primeira classificação, baseada na quantidade de blastos na MO, sendo os subgrupos classificados em: anemia refratária (AR) (menos que 5% de blastos) e anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) (menos que 5% de blastos e mais que 15% de sideroblastos em anel); anemia refratária com excesso de blastos (AREB) (de 5 a 20% de blastos); leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (de 1 a 20% de blastos na MO e monocitose periférica), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt) (de 21 a 30% de blastos) [15].

Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (WHO) propôs uma nova classificação que associa imunofenotipagem e genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos utilizados na classificação FAB [16, 17]. Dentre as alterações propostas pela WHO estão a diminuição do número de blastos para o diagnóstico de LMA para 20%, eliminando o subgrupo AREBt; a AREB foi subdividida em dois grupos de acordo com o número de blastos na MO: AREB-1 (5 a 9%) e AREB-2 (10 a 19%); separação dos subgrupos AR e ARSA em 4 entidades, baseado no número de displasias; a síndrome 5q- foi separada das demais por constituir um grupo com características bem definidas e com bom prognóstico; transferência do subgrupo LMMC, por suas características clínicas e biológicas, para um novo grupo de doenças hematológicas. Em 2008 a classificação WHO foi revisada e subdividida nas seguintes categorias: anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU), citopenia refratária com displasias multilinear (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada com deleção isolada no braço longo do cromossomo 5 (SMD 5q-) [18].

O Índice de Prognóstico Internacional (International Prognostic Score System; IPSS) foi concebido para ser aplicado apenas no momento do diagnóstico e pode não ser adequado para avaliação de acordo com a evolução da doença [19], sendo este utilizado como um sistema universal de estratificação de risco para a decisão do critério de tratamento. O IPSS considera o percentual de blastos na medula, o número de citopenias e a citogenética da MO para prever a sobrevida e o risco de progressão para LMA. Os pacientes com SMD não tratados são classificados em quatro grupos prognósticos de risco: baixo, intermediário-1 (Int-1), intermediário-2 (Int-2), e de alto risco com estimativas de sobrevivência mediana de 5,7; 3,5; 1,2 e 0,4 anos, respectivamente [20].

Em 2005, o índice prognóstico baseado na WHO (WPSS) foi proposto como um sistema dinâmico de avaliação de sobrevida e risco de transformação em LMA, podendo ser usado em qualquer momento durante o curso da doença. A pontuação da WPSS integra três importantes fatores prognósticos em pacientes com SMD: cariótipo, os subgrupos da WHO, e a dependência transfusional como um indicador de anemia sintomática. A WPSS estratifica os pacientes em cinco grupos de risco: muito baixo (escore = 0), baixo (1), intermediário (2), alto (3-4), ou muito alto (5-6) [21]. Mais tarde, em 2008, a dependência transfusional começou a ser criticada por ser um critério subjetivo [22] e, recentemente, foi substituída pelo critério de anemia grave, resultando na WPSS revisada (R-WPSS). A anemia grave foi definida como níveis de hemoglobina menores que 9g/dL em homens e menores que 8g/dL em mulheres [23].

Outras propostas de classificações incluem idade, *performance status*, novas categorias para o risco de citogenético, trombocitopenia, fibrose da MO, níveis séricos de lactato desidrogenase e β 2-microglobulina e imunofenótipos de células progenitoras mielóides [24-27].

Terapia imunossupressora na SMD

As opções de tratamento para os pacientes com SMD são limitadas, sendo o transplante alogênico de células tronco hematopoéticas a única opção terapêutica para cura. Porém, a minoria dos pacientes é elegível para o transplante de células hematopoéticas, devido principalmente a idade e a disponibilidade de doadores compatíveis [28]. Muitos pacientes recebem terapia de suporte convencional que oferece baixas taxas de resposta e alto risco e sem impacto na sobrevida [29]. Outras formas de tratamento utilizam fatores de crescimento para células hematopoéticas, tais como eritropoietina, fator estimulante de colônias de granulócitos e fator estimulador de colônias de granulócitos-monócitos, ou combinações destes, que podem induzir resposta satisfatória em alguns pacientes [30-32].

O uso de terapia imunossupressora em pacientes com falência de MO originou-se de um estudo com pacientes com anemia aplástica grave (AAG) [33]. Gluckman e colaboradores foram os primeiros a mostrar a recuperação da hematopoese em pacientes com AAG, tratados somente com anti-timoglobulina (ATG) [34]. O sucesso desse tratamento resultou no uso de ATG também em pacientes com SMD com medula hipocelular. Esses resultados iniciais levaram ao estabelecimento em 1997 de um

estudo clínico pelo “National Institutes of Health” (NIH) para avaliar a resposta ao ATG na falência de MO em todas as formas de SMD [35]. O resultado foi uma melhora no hemograma em 30% dos pacientes com SMD após tratamento com ATG, que levou a uma melhora da hematopoese destes pacientes e aumento da sobrevida dos mesmos [36, 37]. Entretanto, apenas um grupo de pacientes é responsivo à terapia imunossupressora com ATG, dentre eles os pacientes mais jovens (abaixo de 60 anos de idade) e que apresentam o HLA-DR15 [38]. Nesse grupo responsivo, também encontramos um predomínio de mulheres com anemia refratária e pacientes com trissomia do cromossomo 8 [39].

Os resultados da terapia com ATG sugerem que a causa da citopenia em cerca de 20 a 30% dos pacientes com SMD é a supressão da MO mediada por células T. A Figura 3 ilustra a hipótese da relação entre sistema imune e as citopenias na SMD [40].

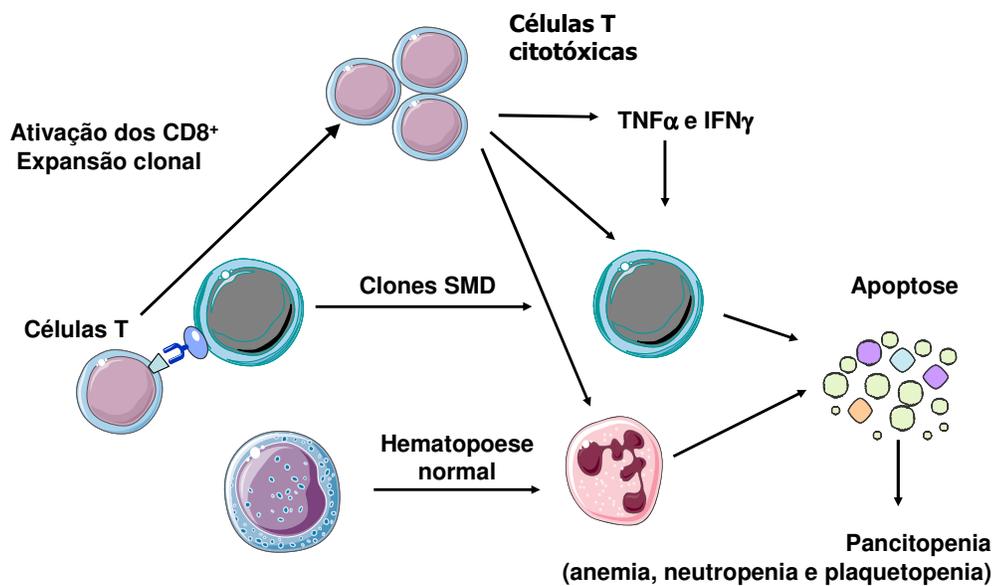


Figura 3. Os clones displásicos apresentam antígenos superexpressos ou expressam novos antígenos, provocando a expansão de clones de células T citotóxicas. Estas são responsáveis pela secreção de citocinas, como fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$) e interferon- γ ($IFN\gamma$) que promovem a apoptose de células progenitoras, suprimindo a hematopoese (adaptado de Sloand and Barret, 2010 [40]).

O sistema imune na SMD

Evidências clínicas e imunológicas sugerem a associação entre disfunção do sistema imune e a patogênese da SMD. Artrite reumatóide, anemia aplástica, vasculite, gamopatia monoclonal [41-44] são manifestações clínicas relacionadas à SMD. Além disso, alterações com características de doença autoimune são descritas durante o estadio inicial (baixo risco) da doença tais como: linfócitos T citotóxicos ativados [45], baixo número de Tregs, aumento de Th17, células B com disfunção, níveis elevados de fator de necrose tumoral- α (TNF α), de interferon- γ (IFN γ) [46, 47], de citocinas pró-apoptóticas [48, 49] e do sistema Fas/FasL [50, 51]. Por outro lado, em estadios avançados (alto risco) da doença há uma evasão do sistema imune, redução da função das células NK [52], aumento de células T regulatórias (Tregs) e baixos níveis de apoptose [53, 54]. O ambiente medular propício, associado com o aumento de alterações citogenéticas favoreceria os clones displásicos à progressão da doença. Portanto, esta desregulação imune poderia participar da progressão da SMD [55]. A Figura 4 demonstra de forma simplificada o perfil do sistema imune na SMD.

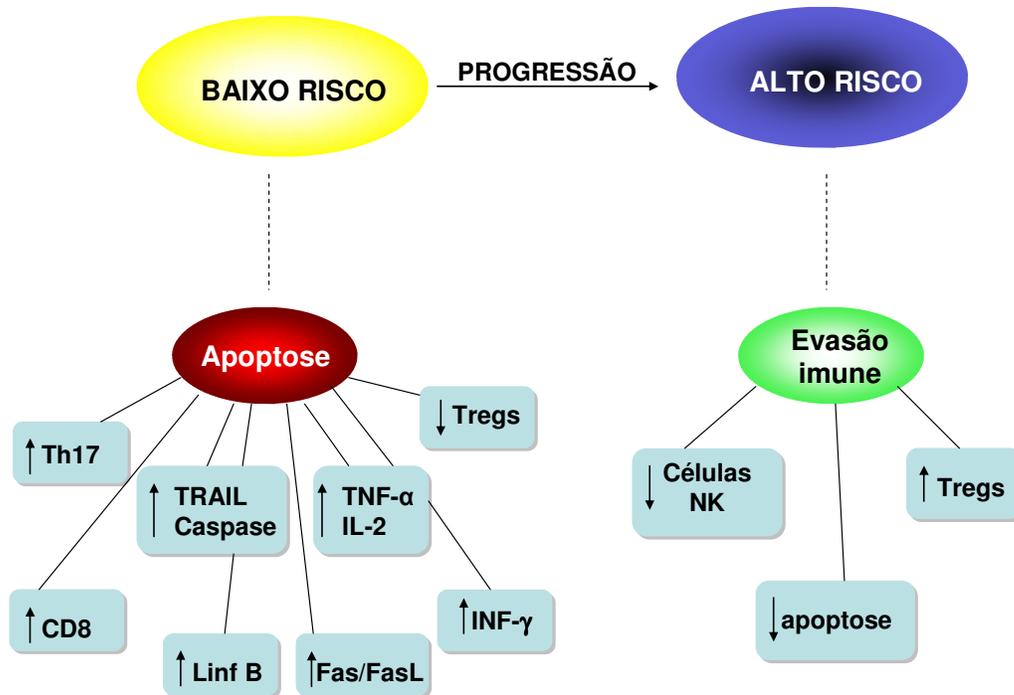


Figura 4. Perfil do sistema imune na SMD de baixo e alto risco. No baixo risco, a principal característica da MO é a apoptose e já foi descrito um aumento das células T, aumento de linfócitos B e Th17, ativação do sistema Fas/FasL, de TRAIL e caspases, de citocinas como TNF α e IFN γ , com diminuição das células Tregs. Enquanto no alto risco da doença há uma característica de evasão imune, com redução das células *natural killer* (NK), aumento das Tregs e consequentemente diminuição da apoptose (adaptado de Aggarwal *et al.*, 2011 [55]).

Pellagatti e colaboradores, através de estudo de expressão gênica, mostraram que a desregulação de várias vias envolvendo a resposta imune em células-tronco hematopoéticas de pacientes com SMD estava associada com determinadas alterações citogenéticas [56]. Este resultado sugere que o desequilíbrio imune é uma consequência da SMD. Entretanto, este desequilíbrio também pode contribuir para um dos principais sintomas da doença, a citopenia periférica, que é causada pela apoptose, decorrente das células T específicas que reconhecem os autoantígenos expressos tanto nos clones displásicos como também nas células normais, como exemplificado na Figura 3. Células T ativadas são encontradas na maioria dos pacientes com SMD [36, 57, 58], porém o significado funcional exato dessas células ainda não está totalmente elucidado [59]. Portanto, não é claro se o estado imune alterado nos pacientes com SMD reflete, predominantemente, uma resposta autoimune contra os precursores celulares normais na

medula (como ocorre claramente na anemia aplástica, por exemplo) ou apenas representa uma imunovigilância efetiva contra os clones displásicos.

Os estudos de células T em SMD têm sido contraditórios. Alguns apontam para uma variação no número de células T [60, 61], enquanto outros não relatam alterações numéricas [62]. Já foi relatado o aumento da subpopulação de células T CD8⁺ na SMD de baixo risco [63] e diminuição no grupo de alto risco [64, 65], havendo, conseqüentemente, divergências nos resultados da razão CD4:CD8 [54, 66, 67].

Portanto, entender melhor o perfil das células T poderia contribuir não só para a compreensão do papel do sistema imune na SMD como para a seleção dos pacientes responsivos ao tratamento com imunossupressor, eliminando a toxicidade àqueles pacientes que não respondem a esse tipo de terapia.

Citocinas

As citocinas têm um papel importante na regulação da hematopoese normal e o balanço entre os fatores de crescimento e os fatores mielossupressores garante a produção das diferentes linhagens hematopoéticas. Excesso de citocinas inibitórias resulta numa hematopoese ineficaz, característica própria da SMD [68].

As alterações imunológicas relatadas acima demonstram que a SMD de baixo e alto risco podem ser consideradas duas desordens com características distintas [69]. Assim, SMD de baixo risco está associada a um ambiente pró-apoptótico com níveis elevados de TNF α , IFN γ [46, 47] e de interleucinas (IL)6, IL7, IL12, IL1 β e IL32 [48, 49, 70, 71]. O TNF α é a citocina mais envolvida na fisiopatologia da SMD e é produzido por monócitos e células T [72]. Em pacientes com SMD, já foram descritos níveis aumentados de TNF α em células mononucleares de sangue periférico [73] e medula óssea [47], além de uma correlação positiva de sua produção com a taxa de apoptose [74], grau de anemia e densidade dos microvasos [75]. IFN γ também está aumentado em células mononucleares em medula óssea de pacientes com SMD [76]. Juntos, TNF α e IFN γ , ativam a expressão de óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que pode mediar a desregulação da hematopoese em pacientes com SMD [77].

Em contraste, a SMD de alto risco está associada com aumento das células Tregs, baixa apoptose e aumento de citocinas imunossupressoras, tais como IL10, fator de transformação do crescimento β (TGF β) e o receptor solúvel da IL2 [19]. As Tregs

suprimem a proliferação de células T e conseqüentemente a resposta imune, tanto pelo contato célula-célula, via CTLA4 [78], quanto através de secreção de citocinas imunossupressoras tais como IL10 e TGF β 1 [79, 80].

IL10 além de ser secretada pelas Tregs, também pode ser produzida pela maioria das células T, pelas células apresentadoras de antígenos, macrófagos e células epiteliais [81]. IL10 é conhecida por inibir a secreção de IL2, IFN γ , TNF α e IL5 das células T [82] e conseqüentemente sua proliferação [83]; a expressão de moléculas de MHC e co-estimulatórias comprometendo a apresentação de antígenos e a atividade anti-inflamatória [84]. Também foi demonstrado que a IL10 pode afetar a resposta secundária de linfócitos T CD8⁺ [85].

O TGF β é uma citocina com funções conhecidas no controle da inibição do crescimento, apoptose e diferenciação como também na supressão de vários tipos celulares [86]. Na SMD, o TGF β tem sido relacionado com a supressão hematopoética [46, 87] e alguns estudos demonstram níveis plasmáticos de TGF β aumentados em pacientes com SMD [88-90]. Também foi descrito em SMD, a relação de TGF β com a produção autócrina de outras citocinas mielossupressoras como TNF, IL6, e IFN γ [91]. O fato da via do TGF β estar ativada na SMD, resultou em estudos que apontam o seu receptor como um possível alvo terapêutico na SMD de baixo risco [68].

Formin-like 1 (FMNL1)

As forminas constituem uma família de proteínas amplamente expressas nos organismos eucariotos, e são definidas pela presença de um domínio único na porção C-terminal, denominado FH2, que participa da regulação de várias funções do citoesqueleto das células [92-94]. De fato, as proteínas da família das forminas são indispensáveis para muitos processos fundamentais actina-dependentes incluindo migração, endocitose, tráfego de vesículas, morfogênese, e citocinese [93]. Como estes processos polarizados também estão envolvidos na inflamação, proliferação desregulada e metástase, as proteínas dessa família têm sido sugeridas como alvo terapêutico nas doenças inflamatórias e malignas [95].

Formin-like 1 (FMNL1), uma proteína humana da família das forminas, foi descrita pela primeira vez pelo nosso grupo [96, 97]. Em tecidos normais, a expressão de FMNL1 foi restrita as células mononucleares, timo, baço e linfonodos [98]. É sabido

que o silenciamento de FMNL1 em linfócitos normais resulta na perda da função citotóxica das células T CD8⁺, pois FMNL1 está envolvida no controle da polarização dos centrômeros [99]. A ativação de PBMC com IL2 e OKT3 resulta no aumento da expressão de FMNL1 [98].

Em neoplasias, foi descrita uma alta expressão de FMNL1 em células leucêmicas de pacientes com leucemia linfóide crônica (LLC), como também em várias linhagens celulares neoplásicas humanas linfóides e mieloides e também em linhagens de carcinoma renal [96, 98]. FMNL1 também foi caracterizada altamente expressa em doença linfoproliferativa, em especial linfoma não-Hodgkin T (LNH-T), quando comparada ao tecido linfóide normal [97]. Interessantemente, *KW13*, que constitui parte do cDNA de *FMNL1*, foi descrito como um antígeno de tumor superexpresso em LLC, corroborando os resultados de expressão de FMNL1 descritos por Favaro e colaboradores [100]. Esse mesmo grupo também descreveu um peptídeo derivado da proteína FMNL1 com atividade anti-tumor contra células leucêmicas de pacientes com LLC [98]. Outro fato marcante é a correlação da expressão de FMNL1 com parâmetros biológicos de prognóstico de LLC. Em um estudo colaborativo entre nosso grupo e o grupo do Dr. Francesc Bosch (Hospital das Clínicas de Barcelona), a análise de 73 pacientes com LLC mostrou que alta expressão de FMNL1 está associada aos casos de LLC em pacientes com idade inferior a 50 anos no momento do diagnóstico, elevada contagem de linfócitos, altos níveis de β 2-microglobulina, alta expressão de ZAP-70 e CD-38, estadió avançado da doença e altas taxas de mortalidade [101]. A expressão de ZAP-70 na LLC está associada com a ativação prolongada da Akt e ERK kinases, as quais estão relacionadas com a indução de várias proteínas anti-apoptóticas como Mcl-1, Bcl-xL e XIAP. Esses resultados sugerem o envolvimento de FMNL1 na sobrevivência celular durante a evolução da LLC. A proteína ortóloga em camundongo, FRL, foi descrita como uma proteína envolvida na transmissão de um sinal essencial para a sobrevivência celular, embora ainda não esteja claro o mecanismo dessa sinalização. Estes dados corroboram a hipótese de que FMNL1 esteja envolvida na sobrevivência das células neoplásicas em humanos.

Desse modo, estudar a expressão de FMNL1 nos linfócitos e nas células da MO dos pacientes com SMD, poderia contribuir para o melhor entendimento do papel dessa nova proteína neste modelo de neoplasia hematológica.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Caracterizar a frequência das subpopulações de linfócitos T, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ e correlacioná-las com a expressão gênica de *FOXP3*, *IL10*, *TGFβ1*, *CTLA4* e com parâmetros clínicos. Estudar a expressão de *FMNL1* em sangue periférico e MO de pacientes com SMD e correlacioná-la com parâmetros clínicos.

Objetivos Específicos

1. Em controles saudáveis e pacientes com SMD (baixo *versus* alto risco):
 - a. Avaliar a contagem absoluta de linfócitos;
 - b. Avaliar a porcentagem das células CD3⁺, CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ e calcular a razão CD4:CD8.
2. Em pacientes com SMD (baixo *versus* alto risco):
 - a. Correlacionar a frequência das células CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ com parâmetros clínicos.
3. Em células CD3⁺ de sangue periférico de controles saudáveis e pacientes com SMD:
 - a. Analisar as expressões de *FOXP3*, *IL10*, *TGFβ1* e *CTLA4* e correlacioná-las com a frequência dos linfócitos T.
 - b. Correlacionar a expressão de *FOXP3* com a expressão de *IL10*, *TGFβ1* e *CTLA4*.
4. Caracterizar a expressão de *FMNL1* em linfócitos CD3⁺ de sangue periférico e em células totais de MO de pacientes com SMD e controles saudáveis e correlacioná-la com parâmetros clínicos dos pacientes.
5. Analisar a expressão de *FMNL1* durante a diferenciação celular hematopoética, usando modelos de linhagens celulares.

CASUÍSTICA

Doadores saudáveis

As células hematopoéticas foram obtidas de sangue periférico (n=29) ou de MO (n=18) de doadores saudáveis do Hemocentro da Unicamp com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. Foram incluídos 37 homens e 10 mulheres, com idade mediana de 36 anos (15-60 anos). Denominaremos a partir de agora, os doadores saudáveis como grupo controle.

Pacientes com diagnóstico de mielodisplasia

As amostras foram obtidas de sangue periférico e/ou MO de pacientes, antes de qualquer tratamento, atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. Neste estudo, utilizamos as amostras que foram coletadas entre o período de março de 2005 a junho de 2011 de pacientes que tiveram a confirmação do diagnóstico de mielodisplasia através de mielograma, citoquímica, citogenética e biopsia de MO. Foram incluídos 80 pacientes com diagnóstico de SMD, sendo 49 amostras de MO e 49 amostras de sangue periférico, e 18 pacientes contribuíram com ambos os tipos de amostras. As características dos pacientes com SMD estão descritas na tabela 1. Os pacientes foram clinicamente agrupados em baixo risco e alto risco para evolução da doença. De acordo com a FAB, baixo risco: AR e ARSA, alto risco: AREB e AREBt; WHO, baixo risco: CRDU, CRDM e ARSA, alto risco: AREB-1 e AREB-2.

Coincidentemente, os pacientes utilizados para as análises em sangue periférico apresentaram a mesma estratificação para baixo e alto risco, de acordo com as classificações FAB e WHO.

Os parâmetros clínicos avaliados foram: idade, sexo, nível de hemoglobina, contagens de leucócitos, granulócitos e plaquetas, número de citopenias e displasias, cariótipo, porcentagem de blastos e sideroblastos na medula óssea, celularidade da medula óssea e dependência transfusional.

Dependência transfusional foi definida como pelo menos 1 transfusão de concentrado de hemácias a cada 4 semanas, num período de pelo menos 4 meses [102].

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD

	Sangue periférico	Medula óssea
Pacientes	49*	49
Gênero (masculino/feminino)	24/25	32/17
Idade, mediana (range)	67 (27-89)	67 (16-89)
Dependência transfusional**	10	09
AR/ARSA	04/02	03/00
AREB/AREBt	04/00	04/02
FAB		
AR/ARSA	32/08	21/06
AREB/AREBt	09/00	16/06
WHO		
CRDU/CRMD/ARSA	09/23/08	05/20/02
AREB-1/AREB-2	07/02	11/08
LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia***	00	03
IPSS		
Baixo/Int-1	23/21	13/22
Int-2/Alto	02/00	10/03
Não classificados	03	01
Número de Citopenias		
0/1	06/20	05/17
2/3	20/03	18/09
Número de Displasias		
0/1	04/11	03/06
2/3	17/17	15/25
Citogenética		
Baixo risco (normal/-Y)	41 (40/01)	40 (39/01)
Intermediário	03	03
Alto risco (complexo/cromossomo 7)	02 (02/00)	05 (03/02)
Não avaliada	03	01

SMD: síndrome mielodisplásica; FAB: *French-American-British*, AR: anemia refratária; ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB: anemia refratária com excesso de blastos; AREBt: anemia refratária com excesso de blastos em transformação; WHO: *World Health Organization*, CRDU: Citopenia refratária com displasia unilinear, CRDM: citopenia refratária com displasia multilinear, ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel, AREB-1: anemia refratária com excesso de blastos-1, AREB-2: anemia refratária com excesso de blastos-2, LMA: leucemia mieloide aguda, IPSS: *International Prognostic Scoring System*, INT-1: intermediário-1, INT-2: intermediário-2,

* Foram coletadas amostras de 18 pacientes para ambos os estudos: sangue periférico e MO.

** Dependência transfusional foi definida como pelo menos 1 transfusão de concentrado de hemácias a cada 4 semanas, num período de pelo menos 4 meses [102].

*** Excluídos das análises da classificação WHO.

MÉTODOS

Processamento das amostras

Para obtenção das células CD3⁺ do sangue periférico, foram coletados 14 mL de sangue periférico em tubos com o anticoagulante heparina. As células foram diluídas 1:1 em tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,5 % de albumina sérica bovina (BSA) e 0,6% do anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD). Em seguida esse homogeneizado foi distribuído sobre 14 mL de Ficoll Hypaque (Sigma, St. Louis, MO). Os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, as células mononucleares foram transferidas para um novo tubo e lavadas com PBS. As células mononucleares foram tratadas com tampão de lise (cloreto de amônio 0,8%) para eliminar hemácias remanescentes e novamente lavadas. Em seguida, as células CD3⁺ foram separadas através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS, usando um anticorpo anti-CD3⁺, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Após purificação, as células foram submetidas à extração de RNA.

As células de MO foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão de lise e subsequente lavagem com PBS. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA.

Contagem absoluta do número de linfócitos

A contagem absoluta de linfócitos foi feita de maneira automatizada através do aparelho *CELL-DYN Sapphire automated hematology analyzer* (Abbott Diagnostics, Illinois, USA). Os limites da normalidade foram de $1,1 \times 10^3$ células/mm³ (limite inferior) e $3,5 \times 10^3$ células/mm³ (limite superior).

Extração do RNA total

O RNA das células CD3⁺ foi extraído usando o kit RNASpin Mini RNA Isolation Kit, de acordo com as instruções do fabricante (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK).

O RNA de células de MO foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi [103]. Ao precipitado de células,

contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA deu-se segundo o protocolo do fabricante.

A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e este varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A qualidade das amostras de RNA obtidas após a extração foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante com formaldeído 1,2% e as bandas 28 e 18S foram visualizadas em luz ultravioleta (Figura 5).

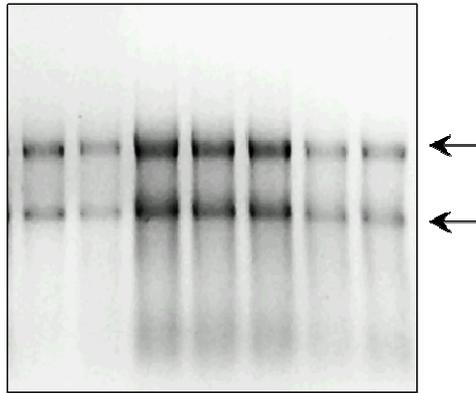


Figura 5. Gel de agarose desnaturante à 1,2% de RNA total. As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra.

Tratamento do RNA total com DNase I

O RNA total de células totais de MO foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μL (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 μg de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 5 µg de RNA e tratadas com DNase I, ou aquelas obtidas das células CD3⁺ através da extração pelo kit, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 µL (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando aos 5 µg de RNA tratado 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL e 1µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,1 M DTT, e 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz ultravioleta (Gene Quant-Pharmacia).

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene *β2-microglobulina*. A PCR para amplificação de *β2-microglobulina* foi realizada para um volume final de 50 µL de reação que contém: 1,5 µL do cDNA sintetizado, 5 µL de tampão de reação, 3 µL MgCl₂ 50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo, sem adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de *β2-microglobulina* utilizados foram: FW: 5' ATGTCTCG CTCCGTGGCCTTAGCT 3'; RV: 5' CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC 3'. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94°C, seguido por 35 ciclos de 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 55°C e 40 segundos à 72°C, com uma fase final de 72°C por 7 minutos, os fragmentos resultantes contém 300 pb e foram visualizadas em luz ultravioleta em gel de agarose 2% (Figura 6).

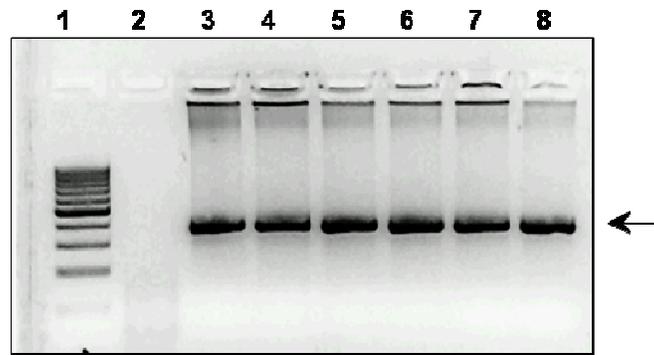


Figura 6. Produtos resultantes da PCR para amplificação de β 2-microglobulina visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3–8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de β 2 –microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.

PCR quantitativo (PCRq)

Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) para todos os genes, exceto para *FOXP3*, que foi utilizada a metodologia Taqman PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Cento e vinte ng ou 40 ng (para *FOXP3*) de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os iniciadores, cujas concentrações utilizadas e sequências são descritas na Tabela 2. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. Cada reação foi feita em triplicata. A expressão do gene *HPRT* foi utilizada como controle endógeno. Amostras de cDNA da linhagem celular Jurkat ou de um doador saudável foram utilizadas como amostras calibradoras. A quantificação relativa da expressão gênica de *FMNL1*, *FOXP3*, *IL10*, *CTLA4* e *TGFB1* foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [104].

Tabela 2. Concentração e sequência dos iniciadores

Gene	Concentração	Sequência dos Iniciadores
<i>FMNL1</i>	100 nM	FW: 5' GAA GCT GAA GAG CTA TGT GG 3' RW: 5' CCT GCG TGG ACT CCT GAA CT 3'
<i>IL10</i>	150 nM	FW: 5'GCTGAGAACCAAGACCCAGA 3' RW: 5'AAATCGATGACAGCGCCGT 3'

<i>CTLA4</i>	150 nM	FW: 5' GGC ACA AGG CTC AGC TGA AC 3' RW: 5' GCC ACG TGC ATT GCT TTG 3'
<i>TGFβ1</i>	150 nM	FW: 5' GCG TGC TAA TGG TGG AAA CC 3' RW: 5' GCT TCT CGG AGC TCT GAT GTG 3'
<i>α-globina</i>	150 nM	FW: 5' GGC GAG TAT GGT GCG GAG 3' RW: 5' TGC GGG AAG TAG GTC TTG GT 3'
<i>β-globina</i>	150 nM	FW: 5' CAC TGT GAC AAG CTG CAC GTG 3' RW: 5' GCA CAC AGA CCA GCA CGT TG 3'
<i>γ-globina</i>	150 nM	FW: 5' TGT GGA AGA TGC TGG AGG AGA 3' RW: 5' CAA AGA ACC TCT GGG TCC ATG 3'
<i>HPRT</i>	150 nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3' RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

Western Blot

Ao extrato celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): sendo, o anticorpo monoclonal que reconhece FMNL1 (sc-81274) e o

anticorpo policlonal que reconhece actina (sc-1616). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminêscencia, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado ao HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram determinadas utilizando o programa *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD, USA). A intensidade de expressão protéica foi normalizada pela expressão da actina.

Citometria de fluxo

À suspensão celular, ajustada para a concentração de 1×10^6 células e lavada com PBS, foram adicionados os respectivos anticorpos marcados. A mistura foi homogeneizada e incubada por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após essa etapa, as células foram lavadas duas vezes em PBS e finalmente ressuspendidas em paraformaldeído 1% em PBS e mantidas à temperatura de 4°C ao abrigo da luz até o momento da aquisição. Os eventos foram adquiridos no FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do programa FACSDiva (version 4.0.1, Becton–Dickinson, CA, USA). Foram utilizados anticorpos monoclonais conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD8, ficoeritrina (PE) anti-CD4 e a alofocianina (APC) anti-CD3 para análise das subpopulações de linfócitos T. Foi feita uma aquisição de 10.000 eventos, utilizando-se uma janela de análise P1 (*gate*) a partir da população de linfócitos (Figura 7A). A partir dessa janela, foram obtidas as porcentagens das populações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ (Figura 7B e C, respectivamente).

Para análise das diferenciações foram utilizados os anticorpos monoclonais conjugados com ficoeritrina (PE) anti-CD11b e isotiocianato de fluoresceína (FITC) anti-CD61. Neste caso, a janela inicial foi feita a partir dos parâmetros FSC e SSC.

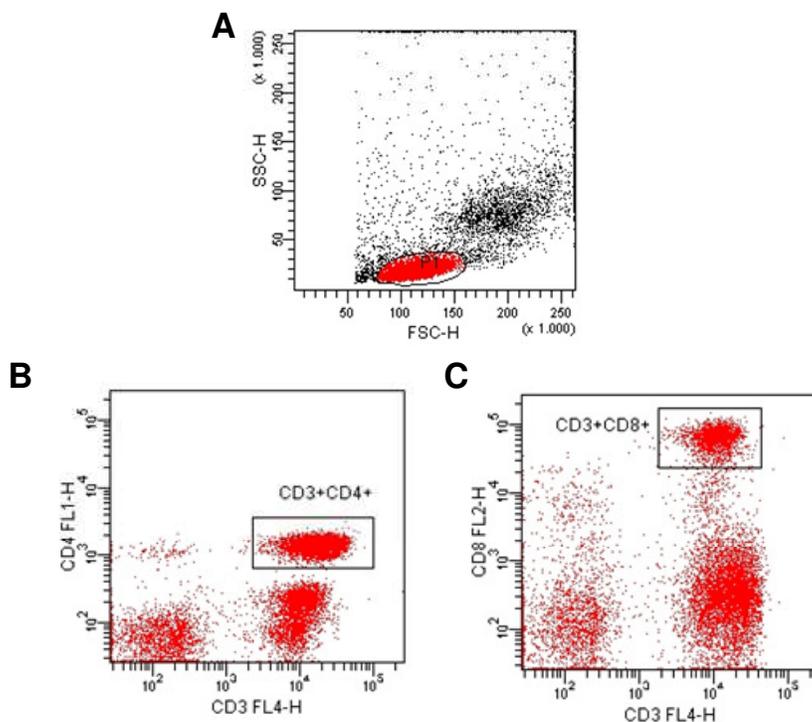


Figura 7. Citometria de fluxo utilizada para análise das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$. P1: janela na população de linfócitos (A), dot plot representando as células $CD3^+CD4^+$ (B), dot plot representando as células $CD3^+CD8^+$ (C).

Linhagens celulares

Linhagens celulares humanas de leucemias agudas foram adquiridas no ATCC, Philadelphia, USA (Tabela 3).

Tabela 3. Descrição das linhagens leucêmicas

Linhagem	Descrição
Jurkat	Leucemia Linfóide Aguda T
K562	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;22)
NB4	Leucemia promielocítica aguda, t(15;17)
KU812	Leucemia mieloide crônica em fase crônica, t(9;22)

Todas as linhagens celulares foram cultivadas de acordo com recomendações da ATCC, mantidas a 37°C e em incubadora de CO₂. Resumidamente, as células foram mantidas em meio RPMI (Gibco) com 10% SFB, penicilina/estreptomicina e anfotericina B.

Diferenciação em linhagens celulares hematopóéticas

Foram utilizadas linhagens celulares na concentração inicial de 2×10^5 células/mL em um volume de 50 mL. Células KU812 foram induzidas para diferenciação eritroide através do tratamento com $50 \mu\text{M}$ de hemina (HE) (Sigma; St. Louis, MO, USA) e $100 \mu\text{M}$ de hidroxiuréia (HU) (Sigma; St. Louis, MO, USA) por 4 dias e avaliada por análise da coloração de benzidina e pela expressão de α -globina, β -globina e γ -globina por PCR quantitativo. Células NB4 foram induzidas para diferenciação granulocítica por tratamento com 10^{-6} M de ácido all-trans-retinóico (ATRA) (Roche; Basel, Switzerland) por 4 dias e avaliado por análise morfológica e pela expressão de CD11b por citometria de fluxo. Células K562 foram induzidas para diferenciação megacariocítica por tratamento com 20 nM de acetato de forbol miristato (PMA) (Sigma; St. Louis, MO, USA) por 4 dias e avaliada por análise morfológica e pela expressão de CD61 por citometria de fluxo.

Análise Estatística

O método usado para análise dos resultados foi o teste de regressão linear multivariada, após o ajuste dos grupos pela idade. A correlação entre os dados e parâmetros clínicos dos pacientes foi feita através das análises de regressão univariada e multivariada. Para ajuste do teste de regressão multivariado foi utilizado o critério de *Stepwise*. Para comparação da expressão de *FMNLI*, em sangue periférico, entre os grupos SMD e controle também foi utilizado o teste de Mann Whitney. Nos testes de diferenciação celular foi usado o teste t de Student. Quando necessário, análise de covariância (ANCOVA) foi aplicada. Variáveis numéricas sem distribuição normal foram transformadas em rankings para análise. O teste de *Spearman* foi utilizado para analisar correlação entre dois grupos. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

1. Estudo do perfil dos linfócitos em sangue periférico

1.1 Número absoluto de linfócitos em pacientes com SMD e grupo controle

Foi observada uma diminuição no número absoluto de linfócitos no grupo de pacientes com SMD quando comparado com o grupo controle, após o ajuste pela idade através da análise de regressão multivariada ($P=0,002$, Figure 8A). Entretanto, apenas 26,5% ($n=13$) pacientes apresentaram a contagem de linfócitos abaixo do limite inferior da normalidade ($1,1 \times 10^3$ células/ mm^3). Ao subdividirmos os pacientes em baixo e alto risco, de acordo com a FAB e WHO, foi mantida a significância estatística ($P<0,05$, Figura 8B).

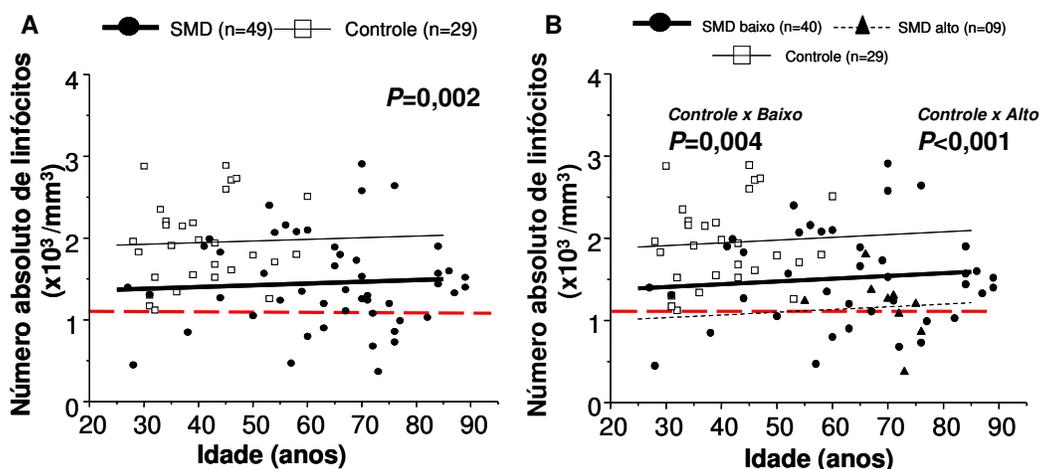


Figura 8. Contagem absoluta de linfócitos periféricos em pacientes com SMD e no grupo controle. (A e B) Análise de regressão multivariada foi realizada com a contagem de linfócitos como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. A linha tracejada horizontal vermelha representa o limite inferior de normalidade de referência da contagem de linfócitos ($1,1 \times 10^3$ células/ mm^3). O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

1.2 Frequência das células CD3⁺ e das suas subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ em sangue periférico de pacientes com SMD e grupo controle

Observamos que a porcentagem de células CD3⁺, após o ajuste pela idade através da análise de regressão multivariada, apresentou um significativo aumento no grupo de pacientes com SMD quando comparado com o grupo controle ($P=0,004$, Figura 9A). Ao subdividirmos os pacientes de acordo com as classificações FAB e WHO, observamos que este aumento na frequência de CD3⁺ foi estatisticamente maior no alto risco em relação ao baixo risco da doença ($P=0,02$, Figura 9B).

Quando analisamos individualmente as porcentagens de cada subtipo celular, também ajustados pela idade, não observamos alterações na fração de células CD3⁺CD4⁺ entre SMD e controle ($P=0,2$, Figura 9C). Entretanto, foi observado um aumento significativo na frequência CD3⁺CD4⁺ no alto risco da doença quando comparado com o grupo controle ($P=0,02$, Figura 9D).

A fração de células CD3⁺CD8⁺ está aumentada no grupo de pacientes quando comparado com o grupo controle ($P=0,05$, Figura 9E), resultado mantido ao compararmos o baixo risco da doença, de acordo com FAB e WHO, com o grupo controle ($P=0,04$, Figura 9F).

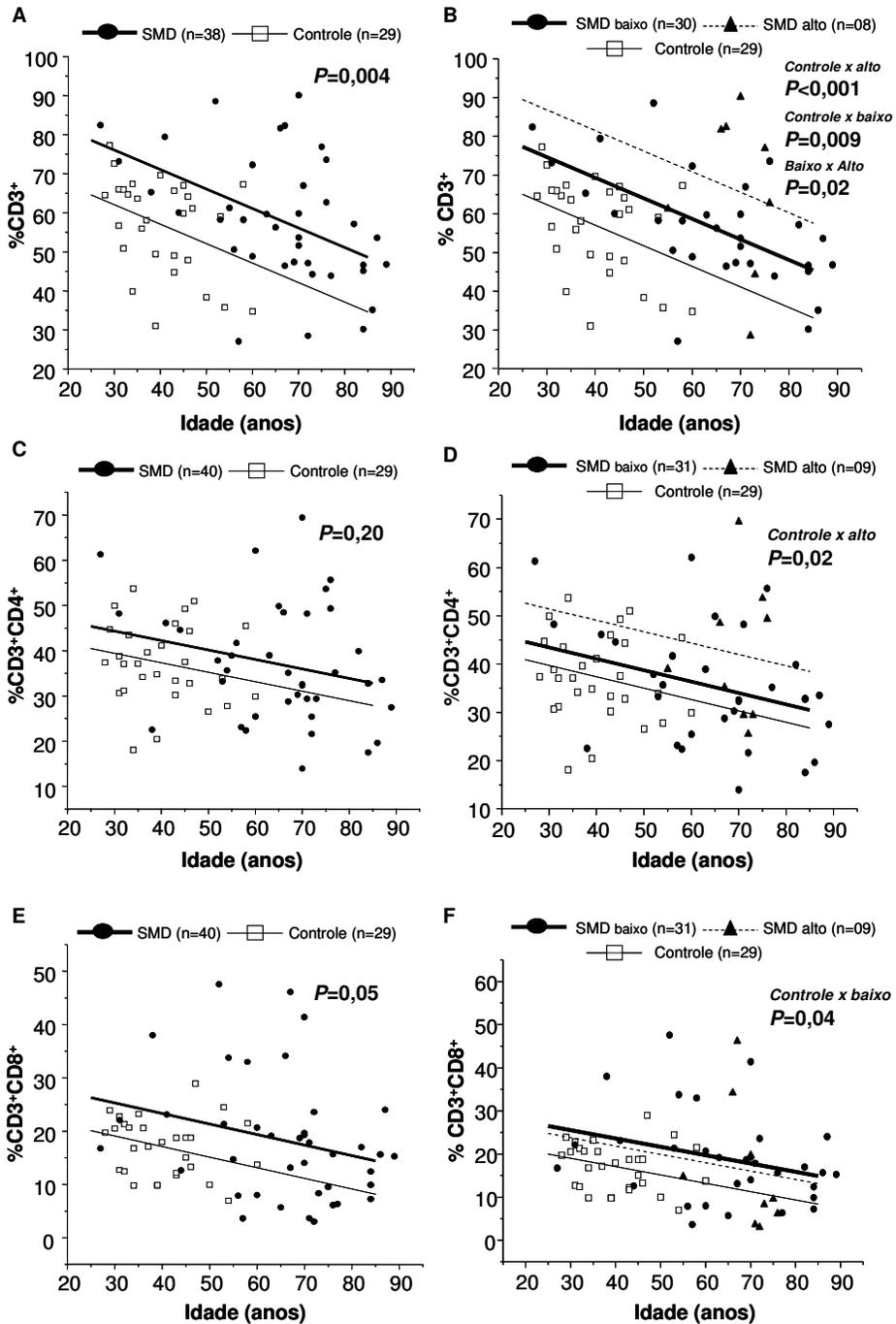


Figura 9. Frequência de células T $CD3^+$ e de suas subpopulações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ em SMD e grupo controle determinada por citometria de fluxo. A análise de regressão multivariada foi realizada com a % $CD3$ (A e B), % $CD3^+CD4^+$ (C e D) e % $CD3^+CD8^+$ (E e F), como as variáveis dependentes, e idade e status da doença como as variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

1.3 Razão CD4:CD8 em pacientes com SMD e grupo controle

A comparação da razão CD4:CD8 entre os pacientes e o grupo controle, após o ajuste pela idade, através da análise de regressão multivariada, não apresentou alterações estatísticas significativas (Figura 10A). Entretanto, foi observado um aumento da razão CD4:CD8 no alto risco em comparação com o grupo de SMD de baixo risco, de acordo com as classificações FAB e WHO ($P=0,03$, Figura 10B).

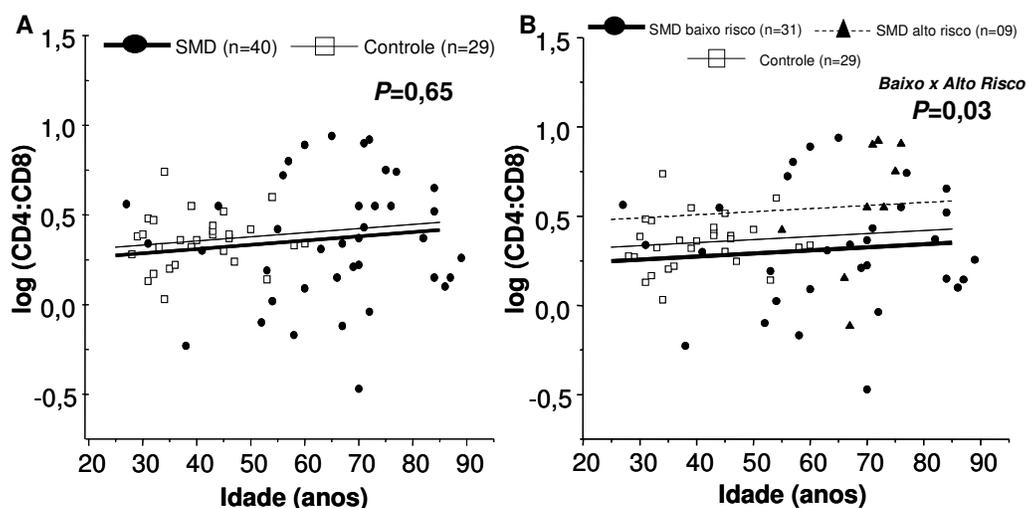


Figura 10. Razão CD4:CD8 de linfócitos periféricos em SMD e grupo controle. (A e B) Análise de regressão multivariada foi realizada com a razão CD4:CD8 como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

1.4. Correlação da frequência de células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD

As frequências das células $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ foram correlacionadas com os seguintes dados clínicos dos pacientes: idade, sexo, nível de hemoglobina, contagens de leucócitos, granulócitos e plaquetas, número de citopenias e displasias, cariótipo e dependência transfusional [102]. Foi observado, através da análise de regressão univariada, que o avanço da idade correlacionou-se com a diminuição da porcentagem das células $CD3^+$ e $CD3^+CD8^+$ ($P<0,04$), resultado este

confirmado também pela análise de regressão multivariada ($P < 0,03$). O critério de dependência transfusional foi correlacionado positivamente com a porcentagem de células $CD3^+$ e $CD3^+CD4^+$, pela análise univariada ($P < 0,04$), mas apenas com a porcentagem de células $CD3^+CD4^+$ de acordo com a análise multivariada ($P = 0,04$) (Tabela 4). Os outros parâmetros clínicos não apresentaram correlação significativa com as frequências das células $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$.

Tabela 4. Resultados da análise de regressão univariada e multivariada para porcentagem de células $CD3^+$, $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$

	Análise univariada			Análise multivariada		
	% $CD3^+$	% $CD3^+CD4^+$	% $CD3^+CD8^+$	% $CD3^+$	% $CD3^+CD4^+$	% $CD3^+CD8^+$
Idade	Beta= -0,39 $P = 0,002$ $R^2 = 0,23$	Beta=-0,20 $P = 0,13$ $R^2 = 0,06$	Beta= -0,28 $P = 0,04$ $R^2 = 0,11$	Beta= -0,39 $P = 0,002$ $R^2 = 0,23$	----	Beta= -0,30 $P = 0,02$ $R^2 = 0,14$
Dependência transfusional	Beta = 9,37 $P = 0,04$ $R^2 = 0,11$	Beta= 9,96 $P = 0,04$ $R^2 = 0,11$	Beta= 2,16 $P = 0,66$ $R^2 = 0,005$	----	Beta= 10,39 $P = 0,04$ $R^2 = 0,11$	----

* Beta: valor da estimativa ou coeficiente angular (*slope*) na reta de regressão

R^2 : coeficiente de determinação (% de variabilidade da variável resposta explicada pela variável independente). Variáveis numéricas transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição normal.

2. Estudo de expressão dos genes *FOXP3*, *IL10*, *TGFB1* e *CTLA4* em células CD3⁺ de sangue periférico

2.1. Análise dos transcritos de *FOXP3*

A expressão gênica de *FOXP3* nas células CD3⁺ de pacientes com SMD, após o ajuste pela idade, através da análise de regressão multivariada, apresentou uma diminuição significativa quando comparada com o grupo controle ($P=0,009$, Figura 11A). Observamos que essa diferença foi mantida quando comparamos o grupo de baixo risco, de acordo com FAB e WHO, com o grupo controle ($P=0,006$, Figura 11B). Não houve diferenças significativas na comparação do alto risco com os demais grupos ($P>0,05$, Figura 11B).

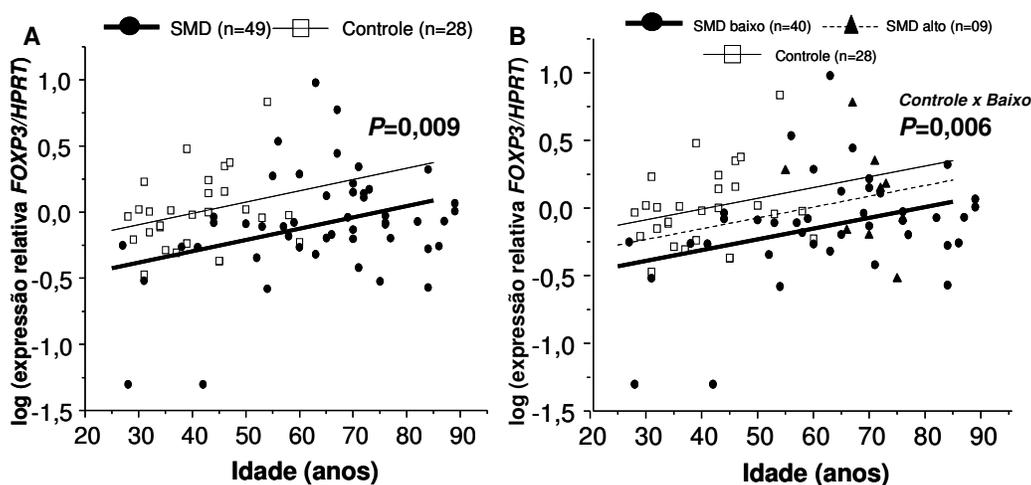


Figura 11. Expressão do RNAm de *FOXP3* nas células CD3⁺ de doadores normais e de pacientes com SMD através de PCRq. (A e B) O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. Uma amostra de controle saudável foi utilizada como amostra calibradora. O valor de P e o número de pacientes estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

2.2. Análise dos transcritos de *IL10*

A expressão gênica de *IL10* não apresentou diferença significativa, após ajuste da idade, entre o grupo controle e SMD ($P=0,06$, Figura 12A). Entretanto, a expressão de *IL10* foi significativamente menor no subgrupo de baixo risco, de acordo com FAB e WHO, quando comparada com alto risco e grupo controle ($P<0,05$, figuras 12B).

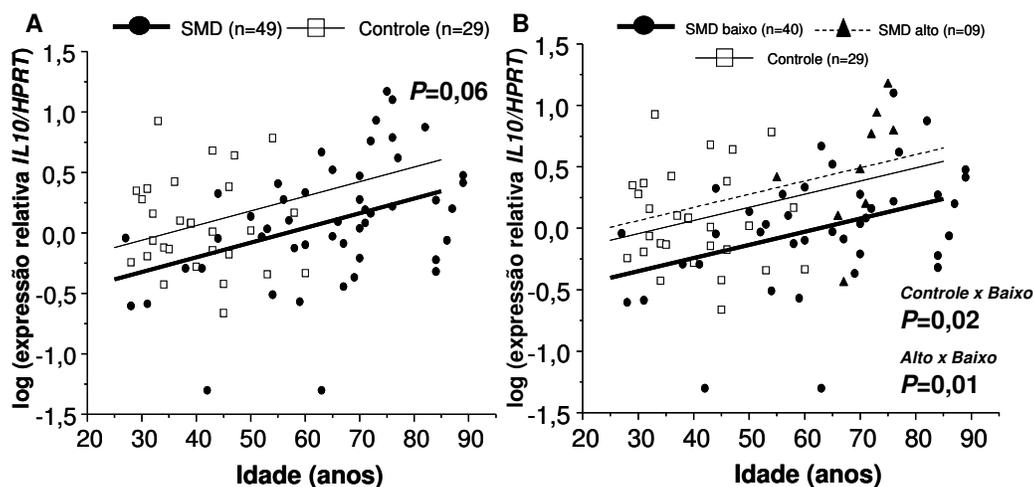


Figura 12. Expressão do RNAm de *IL10* nas células CD3⁺ de doadores normais e de pacientes com SMD através de PCRq. (A e B) O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. Uma amostra de controle saudável foi utilizada como amostra calibradora. O valor de P e o número de pacientes estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

2.3. Análise dos transcritos de *TGFβ1* e *CTLA4*

Na análise das expressões de *TGFβ1* e *CTLA4*, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e SMD, como também nos subgrupos de acordo com as classificações FAB e WHO (Figuras 13 A-D).

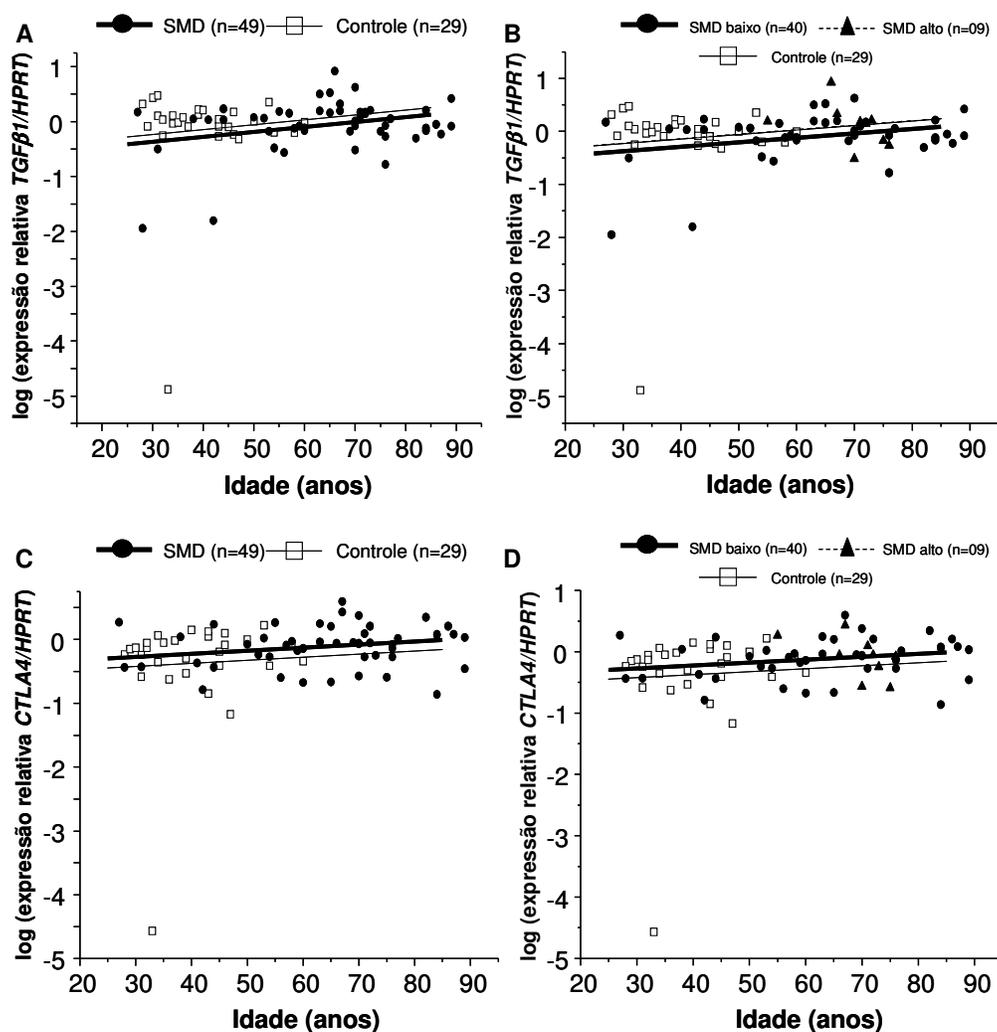


Figura 13. Expressão de *TGFβ1* e *CTLA4* em células CD3⁺ de sangue periférico através de PCRq. Análise de regressão multivariada foi realizada com expressão de *TGFβ1* (A e B) e expressão de *CTLA4* (C e D), como as variáveis dependentes, e idade e status da doença como as variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

2.4. Correlação da expressão gênica de *FOXP3* com os marcadores de ativação das células Tregs

Através da correlação de Spearman, podemos afirmar que houve uma correlação positiva, de magnitude moderada, entre a expressão dos transcritos de *FOXP3* com a expressão dos genes das citocinas *IL10* (Figura 14A, $r=0,37$; $P=0,008$) e *TGFβ1* (Figura 14B, $r=0,28$; $P=0,04$), como também com *CTLA4* (Figura 14C, $r=0,35$; $P=0,01$).

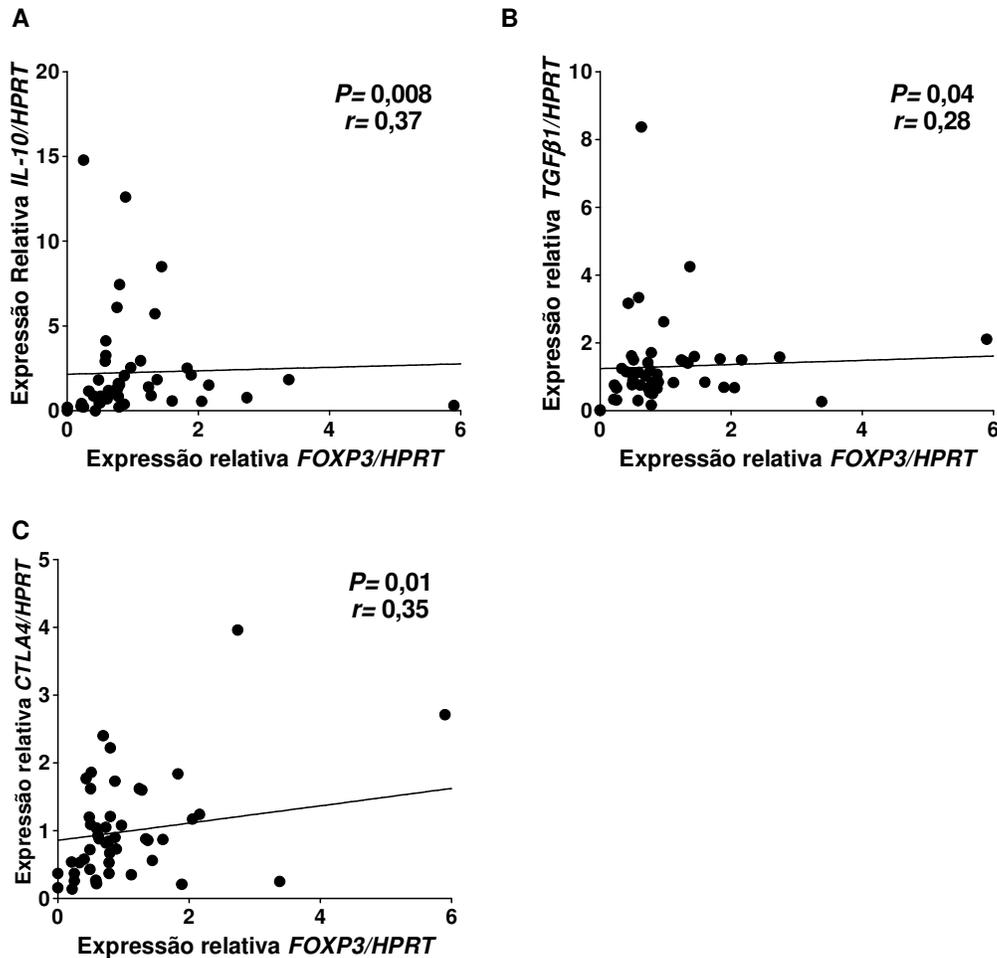


Figura 14. Correlação entre os transcritos de *FOXP3* e marcadores de ativação das células Tregs. A expressão relativa de cada gene foi determinada por PCRq. A correlação da expressão de *FOXP3* com as expressões de *IL10* (A), *TGFβ1* (B) e *CTLA4* (C) foi realizada através do teste de correlação de Spearman.

2.5. Correlação da expressão gênica de *IL10* com células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$

A expressão dos transcritos de *IL10* apresentou uma correlação negativa e significativa, de magnitude moderada, com a porcentagem de células $CD3^+CD8^+$, através da correlação de *Spearman* (Figura 15, $r = -0,35$; $P = 0,02$). Essa correlação foi confirmada pela análise de regressão linear univariada (Beta = $-0,41$; $P = 0,02$; $r^2 = 0,12$). Não houve resultados significativos para as correlações de expressão de *IL10* com a população de células $CD3^+CD4^+$ e também da expressão de *TGF β 1* e *CTLA4* com as subpopulações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ (dados não mostrados).

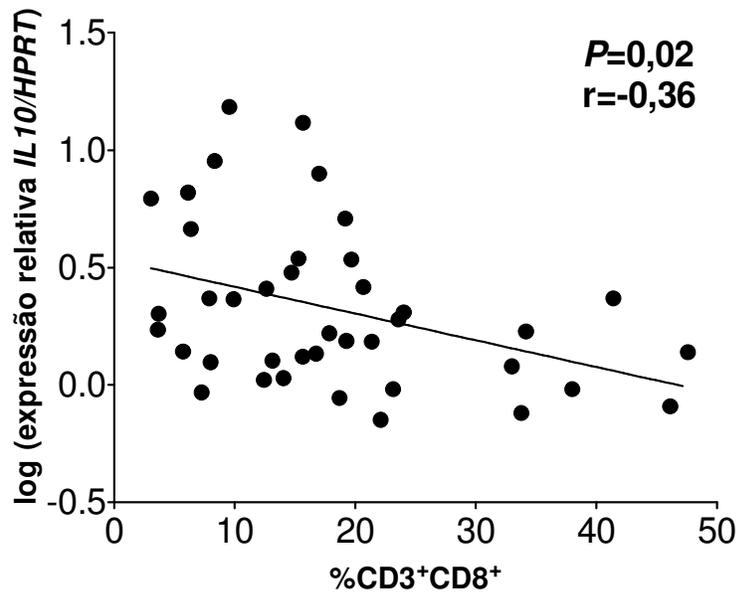


Figura 15. Correlação entre o log da expressão realtiva de *IL10/HPRT* e a porcentagem de células $CD3^+CD8^+$ em sangue periférico. A porcentagem de $CD3^+CD8^+$ foi determinada por citometria de fluxo e a expressão relativa de *IL10* através de PCRq. Teste de correlação de *Spearman*.

3. Estudo de expressão de FMNL1 em células CD3⁺ de sangue periférico

3.1. Transcritos de *FMNL1*

Utilizando o teste de Mann-Whitney, foi observado que a expressão de *FMNL1* foi significativamente maior nos linfócitos CD3⁺ do grupo SMD quando comparado com o grupo controle ($P=0,02$, figura 16A). Entretanto, ao ajustarmos os valores pela idade, através do teste de regressão linear multivariada, não observamos mais essas diferenças (Figura 16B), como também não houve diferenças na comparação do baixo risco, alto risco e controle ($P>0,05$, Figura 16C). É importante ressaltar que o através do teste ANCOVA, no qual sexo e idade são ajustados, há uma tendência de maior expressão de *FMNL1* no grupo de SMD ($P=0,09$; dado não mostrado).

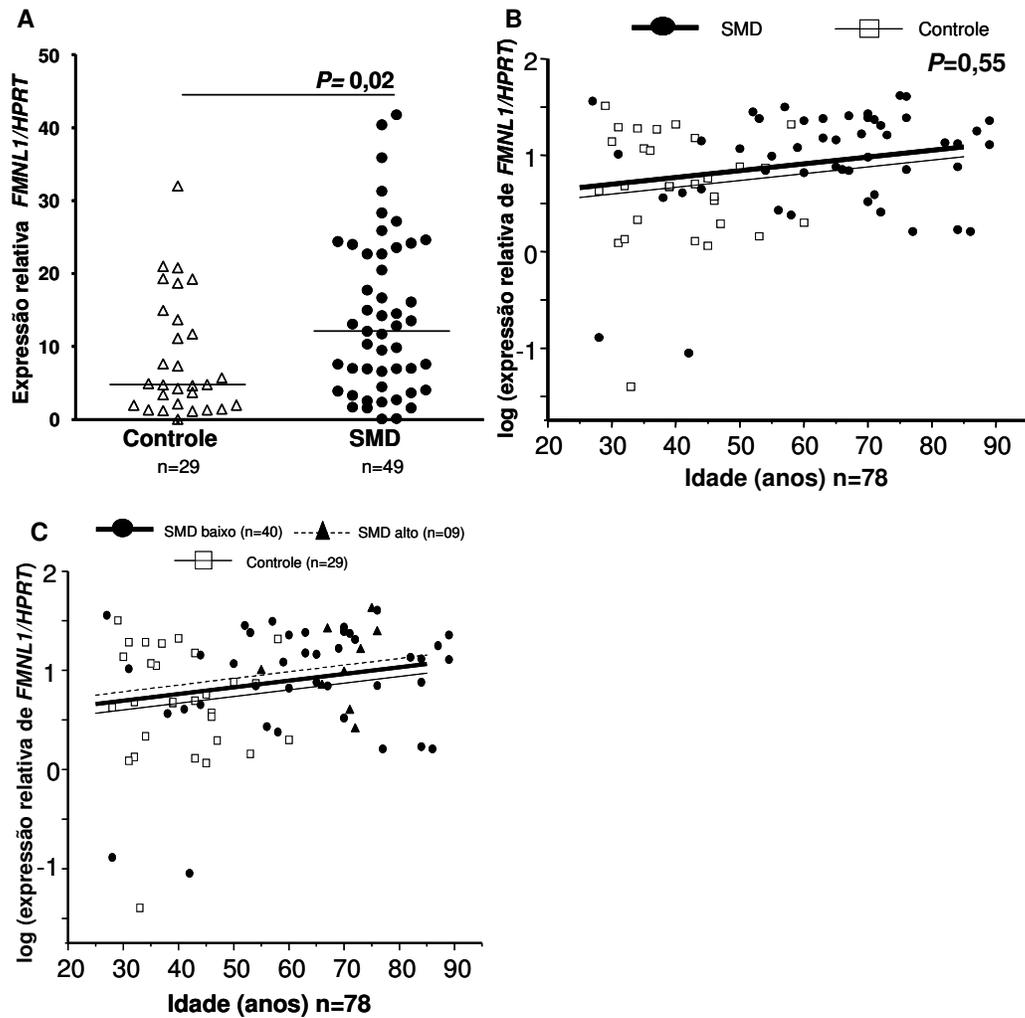


Figura 16. Expressão gênica de *FMNL1* em células $CD3^+$ de sangue periférico em SMD e grupo controle através de PCRq (A) Expressão de *FMNL1* nos controles e nos pacientes com SMD analisados através do teste de Mann-Whitney. As linhas horizontais representam a mediana. (B-C) Análise de regressão multivariada foi realizada com o log da expressão de *FMNL1* como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO.

3.2. Correlação da expressão gênica de *FMNLI* com células $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$

A expressão dos transcritos de *FMNLI* apresentou uma correlação positiva, de magnitude moderada, com a porcentagem de células $CD3^+CD4^+$, através da correlação de *Spearman* (Figura 17A, $r = 0,31$; $P=0,05$). Não houve resultados significativos para a correlação de expressão de *FMNLI* com a população de células $CD3^+CD8^+$ (Figura 18 B, $r = 0,16$; $P=0,32$).

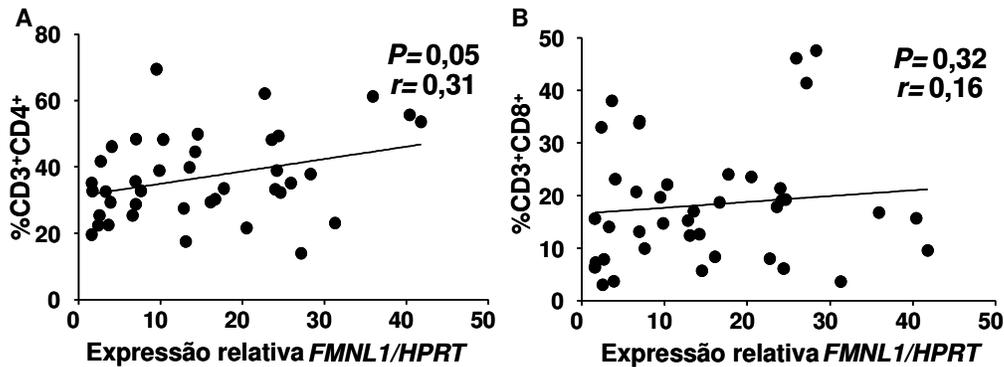


Figura 17. Correlação entre os transcritos de *FMNLI* e a porcentagem de células $CD3^+CD4^+$ (A) e $CD3^+CD8^+$ (B) em sangue periférico. As porcentagens de $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ foram determinadas por citometria de fluxo e a expressão relativa de *FMNLI* através de PCRq. Teste de correlação de *Spearman*.

3.3. Correlação da expressão gênica de *FMNLI* em células CD3⁺ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD

Novamente, utilizando as técnicas de regressão linear univariada e multivariada, com critério *Stepwise*, correlacionamos a expressão de *FMNLI* com os seguintes parâmetros biológicos: sexo, idade, nível de hemoglobina, contagens de leucócitos, granulócitos e plaquetas, número de citopenias, cariótipo e dependência transfusional. Houve uma correlação positiva significativa entre a expressão de *FMNLI* com a dependência transfusional, de acordo com a regressão univariada e multivariada ($P=0,03$, Tabela 7).

Tabela 5. Resultado da análise de regressão linear univariada e multivariada para expressão de *FMNLI* em células CD3⁺ de sangue periférico com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD (n=49).

	<i>FMNLI</i>	
	Análise univariada	Análise multivariada
Dependência transfusional	Beta= 10,49 $P= 0,03$ $R^2= 0,08$	Beta= 10,66 $P= 0,04$ $R^2= 0,09$

* Beta: valor da estimativa ou coeficiente angular (*slope*) na reta de regressão; EP: erro padrão de beta. R^2 : coeficiente de determinação (% de variabilidade da variável resposta explicada pela variável independente). Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. R^2 Total: 0,095. Intercepto (EP): 21,61 (2,30); $P<0,001$. Variáveis numéricas transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição Normal.

4. Estudo de expressão de *FMNLI* em células totais de medula óssea

4.1. Transcritos de *FMNLI*

A expressão do RNAm de *FMNLI* foi significativamente menor em células totais de MO de pacientes com SMD, após o ajuste pela idade, quando comparada às amostras do grupo controle, através da análise de regressão multivariada ($P=0,01$, Figura 18A). Esta diferença entre doença e controle é mantida mesmo quando os pacientes são subdivididos em baixo e alto risco, de acordo com a classificação FAB ($P<0,05$, Figura 18B).

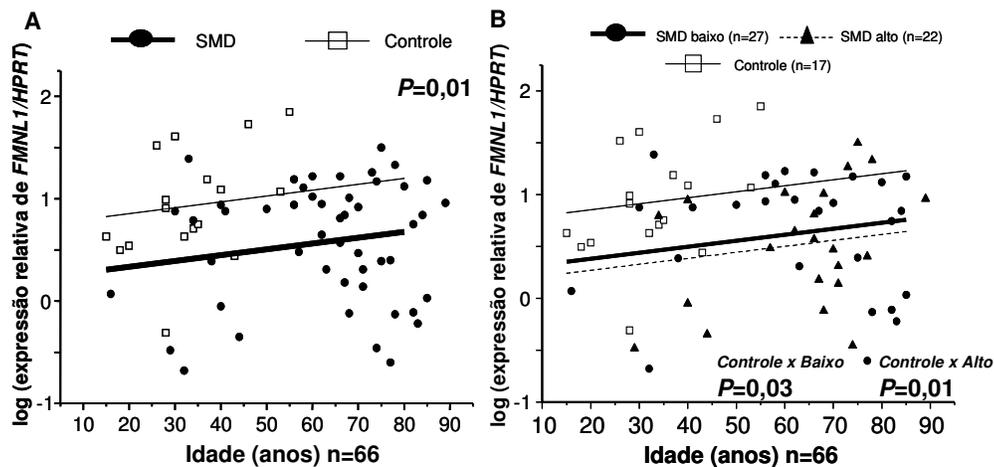


Figura 18. Expressão gênica de *FMNLI* em células totais de MO em SMD e grupo controle através de PCRq. Análise de regressão multivariada foi realizada com o log da expressão de *FMNLI* como a variável dependente, idade e status da doença como variáveis independentes. O termo de interação entre a idade e o status da doença não foi estatisticamente significativo ($P>0,05$) e foi retirado do modelo final. O valor de P e o número de indivíduos estão indicados na figura. SMD baixo e alto risco de acordo com a classificação FAB.

4.2. Correlação da expressão gênica de *FMNLI* em células totais de medula óssea com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD

Os seguintes parâmetros clínicos foram correlacionados com a expressão de *FMNLI*: idade, sexo, cariótipo, nível de hemoglobina, contagens de leucócitos, segmentados e plaquetas, número de citopenias, % blastos e sideroblastos na MO, dependência transfusional e celularidade da MO. Foram realizadas as análises univariada e multivariada com critério *Stepwise*. A expressão de *FMNLI* correlacionou-se negativamente com o número de citopenias pela análise univariada ($P=0,007$, tabela 6), sendo a mesma confirmada através da análise multivariada ($P=0,002$, tabela 6).

Tabela 6. Resultado da análise de regressão linear univariada e multivariada para expressão de *FMNLI* em células totais de MO com parâmetros clínicos dos pacientes com SMD (n=49)

	<i>FMNLI</i>	
	Análise univariada	Análise multivariada
Número de citopenias	Beta= -0,40 $P= 0,007$ $R^2= 0,14$	Beta= -0,50 $P= 0,002$ $R^2= 0,20$

*Beta: valor da estimativa ou coeficiente angular (*slope*) na reta de regressão; EP: erro padrão de beta. R^2 : coeficiente de determinação (% de variabilidade da variável resposta explicada pela variável independente). Critério *Stepwise* de seleção de variáveis. R^2 Total: 0,2048. Intercepto (EP): 36,97 (4,24); $P<0,001$. Variáveis numéricas transformadas em postos (*ranks*) devido à ausência de distribuição Normal.

5. Estudos de expressão de FMNL1 em modelos de diferenciação hematopoética

5.1. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação megacariocítica em células K562

A diferenciação megacariocítica foi realizada por 4 dias de cultura de células K562. No quarto dia de cultura, as células foram coletadas e avaliadas para a expressão do marcador de superfície de membrana CD61, para expressão de FMNL1, como também sua morfologia celular. A diferenciação foi efetiva, uma vez que 70% das células foram positivas para o marcador CD61 e confirmada pela análise morfológica (Figura 19A). A expressão de *FMNL1* apresentou um aumento de cerca de quinze vezes durante a diferenciação ($P=0,002$, Figura 19B). Dados de *Western blot* corroboraram esses achados (Figura 19C).

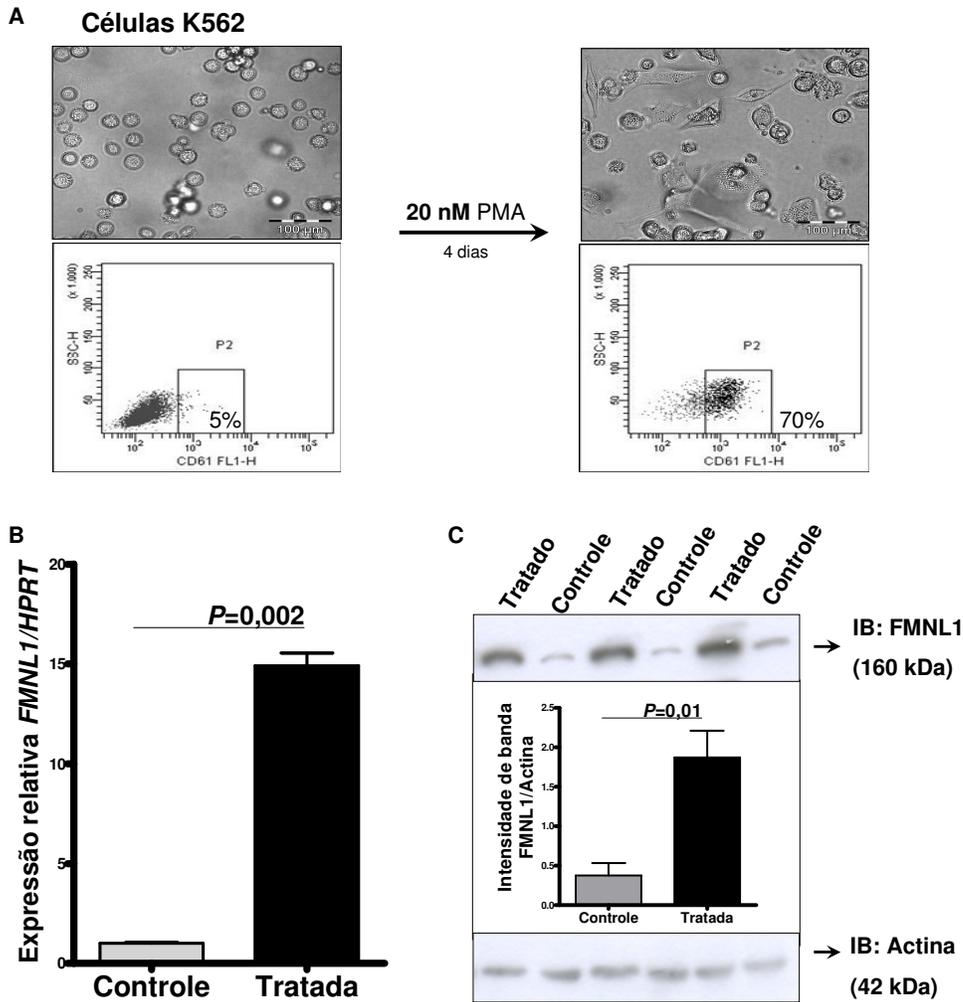


Figura 19. Expressão de FMNL1 durante a diferenciação celular megacariocítica. (A) Imagens de contraste de fase e *dot plot* da expressão do marcador de superfície CD61 de células K562 controle (-PMA) e de células K562 induzidas para diferenciação megacariocítica após 4 dias de tratamento com PMA (+PMA). (B) Expressão do RNAm de *FMNL1*. (C) Expressão protéica de FMNL1. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. A expressão protéica foi analisada por *Western blot* com anti-FMNL1 e anti-Actina que foi utilizado como controle para equalizar as amostras. As barras indicam a media + desvio padrão de três experimentos independentes. Teste t de Student.

5.2. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação granulocítica em células NB4

Para diferenciação granulocítica, as células NB4 foram mantidas por 4 dias em cultura com ATRA. Observamos que a diferenciação foi efetiva, através da positividade de marcação de CD11b e também da sua morfologia (Figura 20A). A expressão de *FMNL1* teve um aumento de cerca de cinco vezes durante a diferenciação ($P=0,05$, Figura 20B) e a expressão proteica confirmou esses achados (Figura 20C).

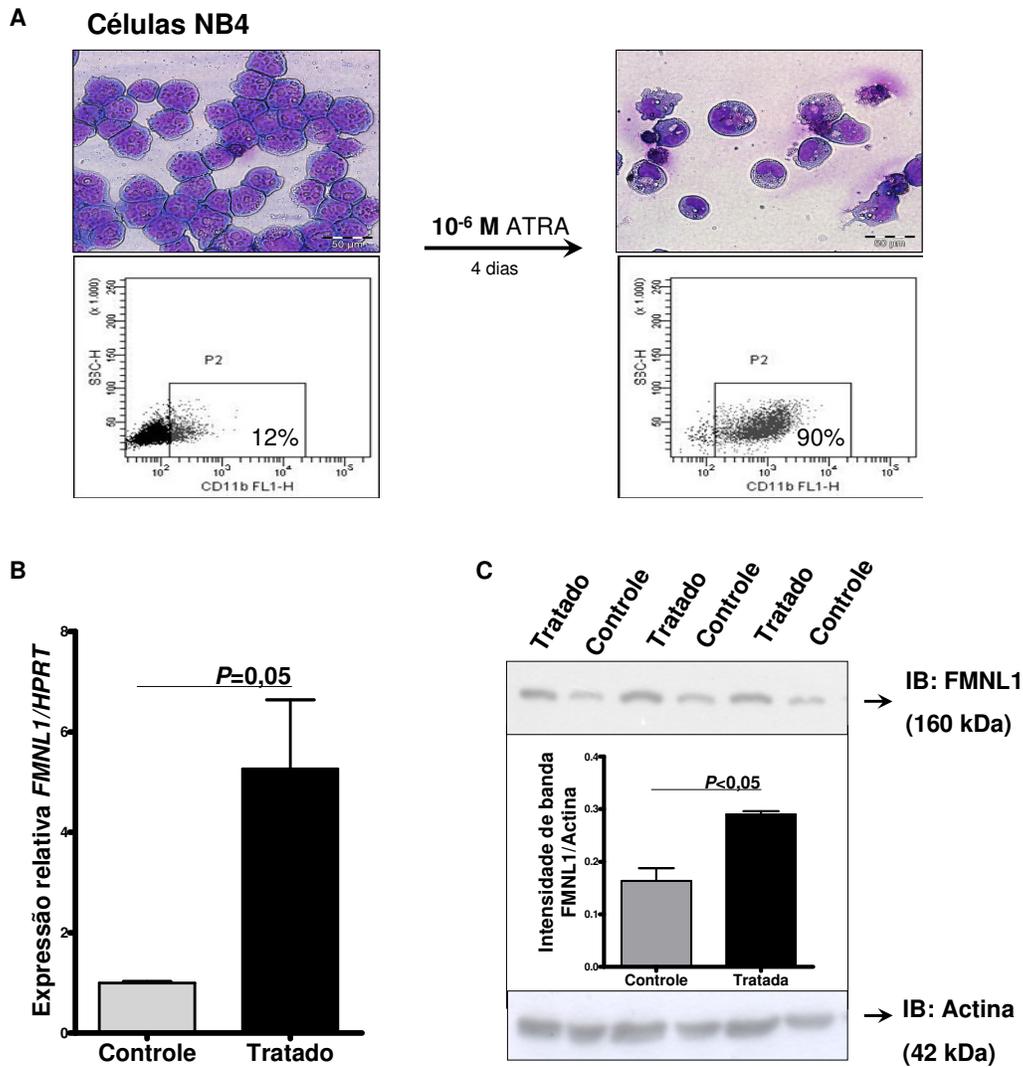


Figura 20. Expressão de FMNL1 durante a diferenciação celular granulocítica. (A) Preparação do *cytospin* com coloração de Rosenfeld e *dot plot* da expressão do marcador de superfície CD11b de células NB4 controle (-ATRA) e de células NB4 induzidas para diferenciação granulocítica após 4 dias de tratamento com ATRA (+ATRA). Expressão do RNAm (B) e da proteína (C) FMNL1. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. A expressão protéica foi analisada por *Western blot* com anti-FMNL1 e anti-Actina que foi utilizado como controle para equalizar as amostras. As barras indicam a média + desvio padrão de quatro experimentos independentes. Teste t de Student.

5.3. Análise da expressão FMNL1 durante a diferenciação eritrocítica em células KU812

Para diferenciação eritrocítica, as células KU812 foram mantidas por 4 dias em cultura com hemina e hidroxuréia. Observamos na figura 21A e B que a diferenciação foi efetiva, através da coloração de benzidina e expressão das cadeias de globina. A expressão de *FMNL1* não teve diferença significativa durante a diferenciação (Figura 21C).

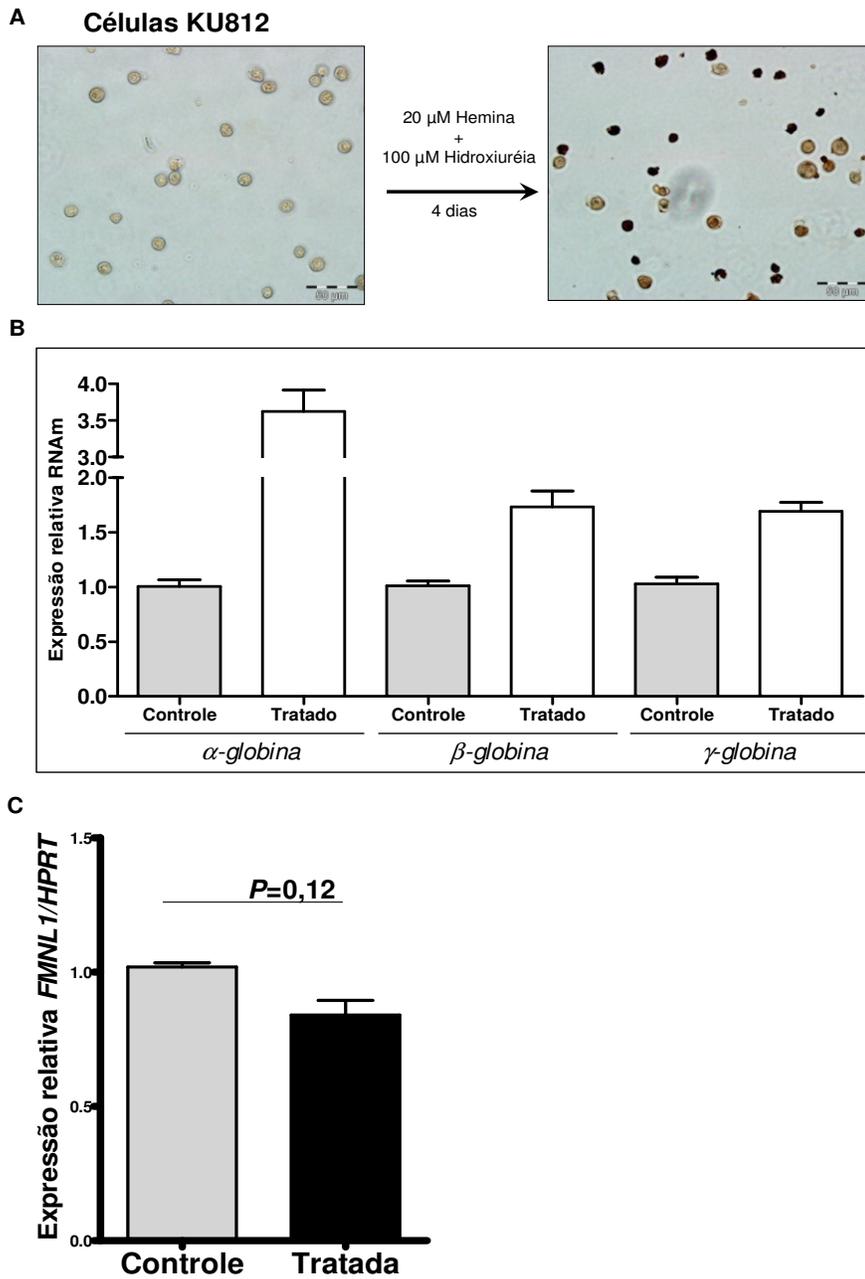


Figura 21. Expressão de FMNL1 durante a diferencia o celular eritrocítica. (A) Colora o de benzidina corando a hemoglobina, (B) PCRq da expressão das cadeias de globina de células KU812 controle (- HE e HU) e de células KU812 induzidas para diferencia o eritrocítica após 4 dias de tratamento com hemina e hidroxiur eia (+ HE e HU). (C) Expressão do RNAm de *FMNL1*. A expressão relativa do RNAm foi obtida por PCRq. As barras indicam a média + desvio padrão de três experimentos independentes. Teste t de Student.

DISCUSSÃO

Os progenitores hematopoéticos clonais dos pacientes com SMD apresentam diferentes graus de diferenciação mielóide. A perda da capacidade de diferenciação destes progenitores, junto com a apoptose destas células parcialmente diferenciadas, resultam em um quadro de pancitopenia periférica nestes pacientes [105, 106]. O envolvimento de múltiplas linhagens mielóides no clone SMD é claro, mas se os linfócitos destes pacientes também derivam do clone maligno depende muito das aberrações cromossômicas envolvidas na doença [107]. Os estudos mostram que na maioria dos casos de SMD, os linfócitos não estão envolvidos com o clone maligno [108, 109], entretanto, nossos resultados mostraram uma diminuição significativa dessas células no sangue periférico dos pacientes com SMD. Já foi descrito um aumento de apoptose nos linfócitos B em MO de pacientes com SMD, quando comparados com pacientes com LMA e com controles saudáveis [110]. Shioi e colaboradores mostraram um aumento de apoptose das células T em sangue periférico de pacientes com SMD, sendo maior no grupo de alto risco [108]; este resultado corrobora nossos achados em que o grupo de alto risco apresentou uma maior diminuição da contagem absoluta de linfócito em sangue periférico. Outros estudos também apontam para as células T como principais responsáveis pela diminuição do número total de linfócitos nestes pacientes [66, 67]. É importante ressaltar, que apenas 26,5% dos pacientes apresentaram uma linfopenia absoluta. Poucos estudos abordam o significado prognóstico da contagem absoluta de linfócitos periféricos nas neoplasias mielóides. Jacobs e colaboradores mostraram que a diminuição da contagem absoluta de linfócitos de pacientes com SMD, no momento do diagnóstico, tem um impacto negativo no prognóstico, sugerindo a influência do sistema imune da evolução da doença [111].

Embora houvesse a diminuição do número absoluto de linfócitos nos pacientes com SMD, os mesmos apresentaram um aumento da frequência das suas células CD3⁺ em relação ao controle saudável, e isso se deve tanto ao aumento da frequência da subpopulação de células CD3⁺CD4⁺ no alto risco, como também ao aumento da frequência da subpopulação CD3⁺CD8⁺ no baixo risco. Estes resultados estão parcialmente de acordo com Chamuleau e colaboradores [102]. Esses autores também observaram nos pacientes com SMD um aumento na porcentagem dos linfócitos CD3⁺ e um estado de ativação das células CD3⁺CD8⁺, caracterizado por aumento de grânulos citotóxicos de granzima, entretanto não viram alterações na frequência destas como também das células CD3⁺CD4⁺ [102]. Por outro lado, uma proliferação aumentada de células T CD8⁺ mono e oligoclonal, bem como um aumento da citotoxicidade dessas

células em pacientes com SMD já foram descritos [55, 57, 112, 113]. Epling-Burnette e colaboradores mostraram que a expansão clonal de células T ocorre em 50% dos pacientes com SMD em comparação com 5% em indivíduos saudáveis de uma faixa etária semelhante [45].

Nos pacientes a expansão das células $CD3^+CD8^+$ foi estatisticamente significativa no grupo de baixo risco quando comparada com o controle, o que sugere a contribuição dessas células na eliminação dos progenitores hematopoéticos, visto que nos estádios iniciais da doença há um aumento da atividade apoptótica [55]. Já foi demonstrado que a deleção das células $CD8^+CD57^+$ resultou no crescimento das células malignas da MO de pacientes com SMD de baixo risco, indicando o papel destas células no controle do crescimento das células tronco e progenitores destes pacientes [114]. Vários estudos descreveram o sistema imune ativado em pacientes com SMD [36, 57, 58]. Esta ativação imune exerce um papel importante na fisiopatologia da SMD por desencadear a apoptose dos progenitores hematopoéticos, causada pela expansão dos linfócitos T $CD8^+$ ativados [79, 115, 116], que devido principalmente ao aumento de $TNF\alpha$ e $IFN\gamma$ no microambiente, induzem a morte celular na tentativa de eliminar potenciais clones displásicos [41, 116].

É importante ressaltar que os estudos das células T e seus subtipos, em pacientes com SMD, são inconsistentes na literatura [60-62]. Consequentemente, existem divergências também nos estudos sobre a razão $CD4:CD8$ [54, 60, 66, 67]. O nosso resultado de correlação negativa entre a frequência de células $CD3^+$ e $CD3^+CD8^+$ com a idade nos pacientes, além de estar de acordo com a literatura [117-119], confirma a importância do ajuste dos valores da idade entre grupo controle e a doença em questão. Em relação às células $CD3^+CD4^+$, observamos um aumento da frequência de $CD3^+CD4^+$, seguida de um aumento da razão $CD4:CD8$ no subgrupo de alto risco da doença. É interessante apontar que nos pacientes houve uma correlação positiva entre a frequência das células $CD3^+CD4^+$ com a dependência transfusional, que é sabidamente um fator prognóstico desfavorável [120-122]. Estes resultados sugerem que esse aumento na razão $CD4:CD8$ seja um fator importante na progressão da doença.

As células T reguladoras (Treg) desempenham um papel importante na manutenção da autotolerância, controle de autoimunidade e regulação da homeostase das células T [123]. A maioria das células $CD4^+$ Tregs apresentam a expressão específica de FOXP3, um fator de transcrição que é importante para o desenvolvimento

e função destas células [124-126]. A ativação das células Treg inclui a produção de IL10 e TGF β 1 [80, 127], além da expressão de CTLA4 [78]. Nós observamos uma diminuição significativa dos transcritos de *FOXP3* nas células CD3⁺ dos pacientes com SMD quando comparados com o controle. Embora os nossos resultados sejam baseados na expressão gênica de *FOXP3*, estes estão de acordo com a literatura, onde também já foi descrito, através de citometria de fluxo, uma diminuição de células Tregs nos pacientes com SMD quando comparados com indivíduos saudáveis [102]. Portanto, nossos resultados sugerem que os transcritos de *FOXP3* têm uma relação direta com o número de células Tregs.

Nos pacientes, foi claro que a diminuição de *FOXP3* deve-se à sua baixa expressão no grupo de SMD de baixo risco, que foi significativamente menor quando comparado com grupo controle. Estes resultados sugerem que houve uma diminuição das Tregs nos pacientes de baixo risco. Não foi observado um aumento significativo da expressão de *FOXP3* nos pacientes de alto risco, o que reflete provavelmente ao baixo número de pacientes estudados (n=9). O primeiro estudo publicado sobre o número absoluto de células Tregs em sangue periférico de pacientes com SMD descreveu uma significativa correlação entre aumento do número de células Tregs e vários marcadores de progressão da doença [53]. Também já foi descrito que as células Tregs apresentam diferentes perfis entre o baixo e o alto risco da doença [115]. Nos estádios iniciais da doença estas células apresentam suas funções e *homing* prejudicados, enquanto nos estádios avançados encontram-se expandidas com suas funções e *homing* mantidos [115, 128].

Nós também analisamos a expressão de marcadores de ativação de Tregs: IL10, TGF β 1 e CTLA 4 [78, 80, 127] e correlacionamos com a expressão de *FOXP3*. Nosso resultado significativo da correlação positiva entre a expressão de IL10, TGF β 1 e a expressão de *FOXP3* sugere que a secreção dessas citocinas é proveniente das células Tregs.

Em relação à expressão de *IL10*, observamos uma diminuição nos pacientes quando comparados ao grupo controle, sendo esta diferença um reflexo da diminuição da expressão de *IL10* no subgrupo de baixo risco. Esse padrão de expressão é o mesmo observado nas análises de *FOXP3*. Poucos trabalhos abordam a expressão de IL10 em SMD. Um estudo mostrou a secreção aumentada de IL10 em pacientes com anemia refratária com excesso de blastos e outro, um aumento de IL10 nos pacientes de alto

risco em relação ao controle [69]. Nosso trabalho apresenta pela primeira vez em pacientes com SMD, uma correlação negativa entre a produção de *IL10* e a frequência de $CD3^+CD8^+$.

Acredita-se que o microambiente determina quais dos múltiplos mecanismos de supressão as células Tregs utilizam [129, 130]. No modelo apresentado recentemente por Yamaguchi e colaboradores, a ativação de células T virgem poderia ser suprimida pelas Tregs naturais via inibição de sinais de ativação como CD28 e produção de IL2 pelas células T efectoras, mantendo, portanto, estas células num estado virgem nos órgãos linfoides. Em condições de inflamação, esses mecanismos são transitoriamente quebrados, permitindo a reposta das células T contra um determinado antígeno. Entretanto, em microambientes de extrema inflamação, células Tregs ativadas adquirem a capacidade de matar ou inativar as células T efectoras e apresentadoras de antígenos, via produção de granzima/perforina ou secreção de IL10, controlando desta forma, repostas imunes excessivas [130]. Na SMD temos um ambiente pró-inflamatório na MO, caracterizado pela produção principalmente de $TNF\alpha$ [72, 77, 131], sendo a citocina mais envolvida na fisiopatologia da SMD [76]. Entretanto, não podemos esquecer que várias evidências apontam que a malignidade na SMD coexiste com um ambiente autoimune, principalmente nos estádios iniciais da doença. Assim, nos indivíduos de baixo risco, temos uma diminuição das células Tregs e da produção de IL10 com consequente expansão de células $CD3^+CD8^+$, característico de autoimunidade. À medida que a doença evolui, as células Treg são restabelecidas, caracterizada principalmente pelo aumento da produção de IL10 e consequente diminuição da frequência das células $CD3^+CD8^+$, favorecendo o clone leucêmico.

As análises da expressão de *FMNLI* em $CD3^+$ de sangue periférico são bastante contraditórias. Enquanto que o teste de Mann-Whitney aponta para um aumento da expressão de *FMNLI* no grupo SMD, essa diferença significativa desaparece na análise multivariada, após o ajuste pela idade. Por outro lado, o teste ANCOVA, que também leva em consideração o sexo, aponta para uma tendência de aumento de *FMNLI* no grupo SMD ($P=0,09$). A ativação do sistema imune na SMD é amplamente descrita em vários trabalhos [57, 58]. Já foi demonstrado que a ativação de PBMC com IL2 e OKT3 resulta no aumento da expressão de FMNL1 [98]. Nossos resultados sugerem que há um aumento da expressão de *FMNLI* nas células $CD3^+$ ativadas dos pacientes com SMD. Entretanto, não foi possível observarmos diferenças na expressão de *FMNLI* entre baixo e alto risco, o que poderia nos ajudar a definir subgrupos de relevância clínica.

Por outro lado, houve uma correlação positiva entre a expressão de *FMNL1* e a dependência transfusional, que é um marcador de prognóstico bem definido [120-122]. Interessantemente, também vimos uma correlação positiva entre *FMNL1*, células $CD3^+CD4^+$ (Figura 22). Assim, podemos sugerir que *FMNL1* participe do processo de ativação das células $CD4^+$, e estudos futuros são necessários para melhor elucidar essa hipótese. É importante lembrar, que já foi descrito que *FMNL1* participa do processo de ativação dos linfócitos $CD8^+$ [99].

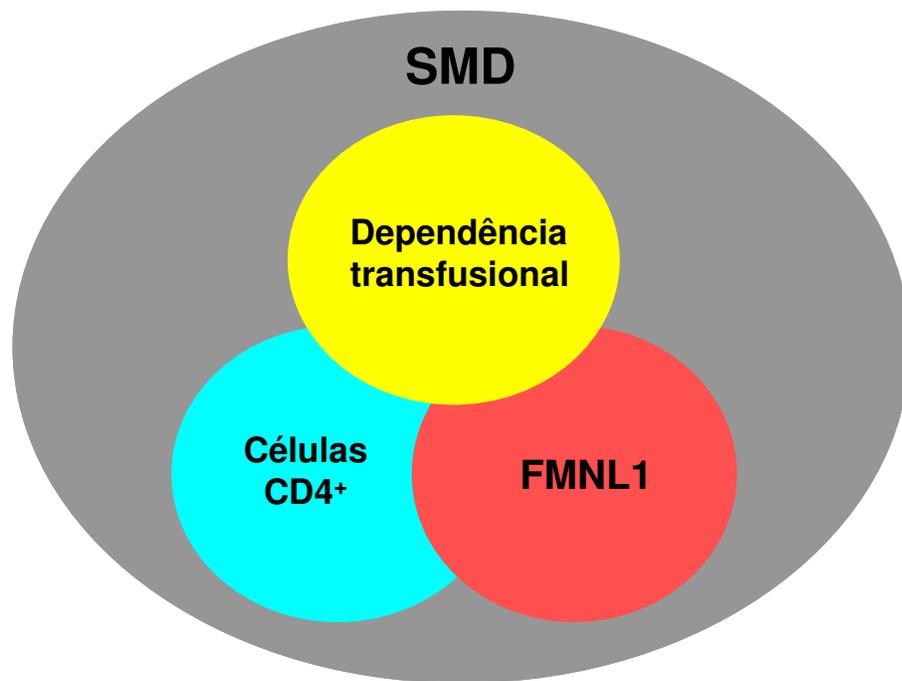


Figura 22. Interação entre *FMNL1*, células T $CD4^+$ e a dependência transfusional na SMD. Foi observada, através do teste de regressão multivariada, em pacientes com SMD uma correlação positiva entre três variáveis: dependência transfusional, expressão de *FMNL1* e frequência das células $CD3^+CD4^+$.

Os estudos de *FMNL1*, em células totais de MO, mostraram que houve uma baixa expressão dos transcritos de *FMNL1* em SMD em relação ao controle e que esta diferença se mantém após subdividimos os pacientes em baixo e alto risco. O critério mínimo morfológico para o diagnóstico da SMD, de acordo com a WHO, é a displasia em pelo menos 10% das células de linhagem mieloide na MO [132]. Nossos resultados sugerem que *FMNL1* tenha um papel na diferenciação de células mieloides. Para investigar essa hipótese, realizamos ensaios de diferenciação para as três linhagens mais afetadas na SMD [109]. O aumento significativo na expressão de *FMNL1* durante as

diferenciações megacariocítica e granulocítica favorece nossa hipótese (Figura 23). Estudos estão em andamento no nosso laboratório para melhor entendermos o papel de FMNL1 na diferenciação hematopoética.

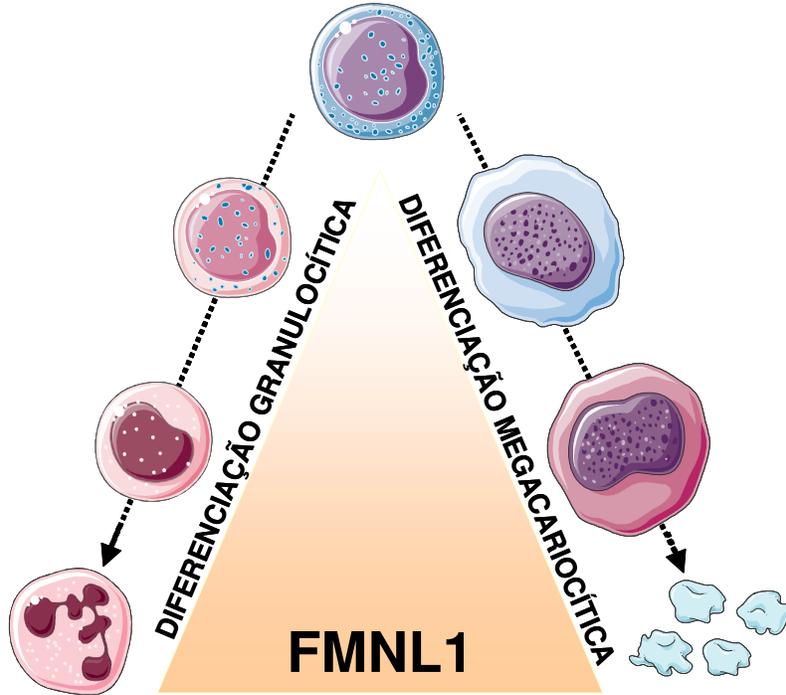


Figura 23. Modelo da expressão de FMNL1 durante a diferenciação megacariocítica e granulocítica. A expressão de FMNL1 é menor nas células imaturas e aumenta à medida que ocorre a diferenciação.

Em conclusão, evidenciamos que pacientes com SMD apresentam uma menor contagem de linfócitos, porém com a frequências das células T $CD3^+$ e suas subpopulações $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ aumentadas. Os pacientes de baixo risco apresentaram uma diminuição da expressão de *FOXP3* e de *IL10*, quadro característico de um microambiente apoptótico e inflamatório. Já no grupo de alto risco a expressão de *IL10*, uma citocina supressora, está aumentada. É importante ressaltar que nos pacientes houve uma correlação entre o aumento da expressão de *IL10* e a diminuição das células T $CD3^+CD8^+$, sugerindo a contribuição das Tregs na progressão da doença através da produção de IL10 (Figura 24).

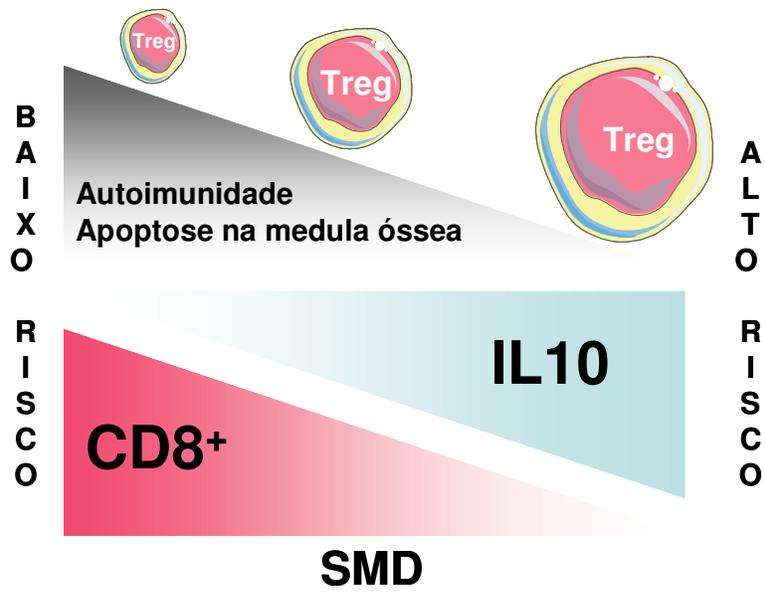


Figura 24. Regulação das células CD8⁺, através da produção de IL10 pelas Tregs em SMD de baixo e alto risco.

CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

A) *Em relação ao sistema imune e SMD:*

Evidenciamos que pacientes com SMD apresentam uma menor contagem absoluta de linfócitos, porém com a frequências das células T CD3⁺ e suas subpopulações CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD8⁺ aumentadas. Além disso, observamos um aumento da razão CD4:CD8 em pacientes com alto risco em relação ao baixo risco e uma correlação das células T CD3⁺CD4⁺ com a dependência transfusional.

Por fim, os pacientes de baixo risco apresentaram uma diminuição da expressão de *FOXP3* e de *IL10*, quadro característico de um microambiente apoptótico e inflamatório, retornando a níveis similares aos do grupo controle na doença de alto risco. Interessantemente, nos pacientes houve uma correlação entre o aumento da expressão de *IL10* e a diminuição das células T CD3⁺CD8⁺.

B) *Em relação a FMNLI e SMD:*

Em células CD3⁺ de sangue periférico, não observamos diferenças significativas na expressão de *FMNLI* entre os grupos controle e SMD, entretanto, houve uma correlação positiva com as células T CD3⁺CD4⁺ e com o critério de dependência transfusional.

Os estudos de expressão de *FMNLI*, em células totais de MO, mostraram que houve uma baixa expressão dos transcritos em SMD em relação ao controle e que esta diferença se mantém após subdividirmos os pacientes em baixo e alto risco. Além disso, observamos uma correlação negativa da expressão de *FMNLI* e o número de citopenias. Realizamos também, ensaios de diferenciação em linhagens celulares hematopoéticas que mostraram um aumento significativo na expressão de *FMNLI* durante as diferenciações mega e granulocítica.

Esses resultados deram origem a um manuscrito que está em fase final antes da submissão.

REFERÊNCIAS

- [1] M. Stern, A.S. Buser, A. Lohri, A. Tichelli, C. Nissen-Druey, Autoimmunity and malignancy in hematology--more than an association, *Crit Rev Oncol Hematol* 63 (2007) 100-110.
- [2] N. Galili, J. Cerny, A. Raza, Current treatment options: impact of cytogenetics on the course of myelodysplasia, *Curr Treat Options Oncol* 8 (2007) 117-128.
- [3] D.E. Rollison, N. Howlader, M.T. Smith, S.S. Strom, W.D. Merritt, L.A. Ries, B.K. Edwards, A.F. List, Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs, *Blood* 112 (2008) 45-52.
- [4] F. Nolte, W.K. Hofmann, Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes, *Ann Hematol* 87 (2008) 777-795.
- [5] A. Tefferi, J.W. Vardiman, Myelodysplastic syndromes, *N Engl J Med* 361 (2009) 1872-1885.
- [6] C. Nisse, C. Lorthois, V. Dorp, E. Eloy, J.M. Haguenoer, P. Fenaux, Exposure to occupational and environmental factors in myelodysplastic syndromes. Preliminary results of a case-control study, *Leukemia* 9 (1995) 693-699.
- [7] N.S. Young, J. Maciejewski, The pathophysiology of acquired aplastic anemia, *N Engl J Med* 336 (1997) 1365-1372.
- [8] M. Jadersten, E. Hellstrom-Lindberg, Myelodysplastic syndromes: biology and treatment, *J Intern Med* 265 (2009) 307-328.
- [9] Y.E. Claessens, D. Bouscary, J.M. Dupont, F. Picard, J. Melle, S. Gisselbrecht, C. Lacombe, F. Dreyfus, P. Mayeux, M. Fontenay-Roupie, In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis, *Blood* 99 (2002) 1594-1601.
- [10] D.H. Biesma, J.G. van den Tweel, L.F. Verdonck, Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome, *Cancer* 79 (1997) 1548-1551.
- [11] E.M. Sloand, K. Rezvani, The role of the immune system in myelodysplasia: implications for therapy, *Semin Hematol* 45 (2008) 39-48.
- [12] M. Voulgarelis, S. Giannouli, K. Ritis, A.G. Tzioufas, Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts, *Eur J Clin Invest* 34 (2004) 690-700.
- [13] A.M. Luzzatto, Sull anemia grave megiloblastica senza reporto ematologica corrispondente (anemia pseudoaplastica), *Riv Ven* 47 (1907).
- [14] R.R. Bomford, Refractory anemia, *Quart. J. Med* 10 (1941) 175.
- [15] J.M. Bennett, D. Catovsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A. Galton, H.R. Gralnick, C. Sultan, Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes, *Br J Haematol* 51 (1982) 189-199.
- [16] N.L. Harris, E.S. Jaffe, J. Diebold, G. Flandrin, H.K. Muller-Hermelink, J. Vardiman, T.A. Lister, C.D. Bloomfield, World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997, *J Clin Oncol* 17 (1999) 3835-3849.
- [17] J.W. Vardiman, N.L. Harris, R.D. Brunning, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms, *Blood* 100 (2002) 2292-2302.
- [18] J.W. Vardiman, J. Thiele, D.A. Arber, R.D. Brunning, M.J. Borowitz, A. Porwit, N.L. Harris, M.M. Le Beau, E. Hellstrom-Lindberg, A. Tefferi, C.D. Bloomfield, The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes, *Blood* 114 (2009) 937-951.

- [19] C. Sugimori, A.F. List, P.K. Epling-Burnette, Immune dysregulation in myelodysplastic syndrome, *Hematol Rep* 2 (2010) e1.
- [20] P. Greenberg, C. Cox, M.M. LeBeau, P. Fenaux, P. Morel, G. Sanz, M. Sanz, T. Vallespi, T. Hamblin, D. Oscier, K. Ohyashiki, K. Toyama, C. Aul, G. Mufti, J. Bennett, International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes, *Blood* 89 (1997) 2079-2088.
- [21] L. Malcovati, U. Germing, A. Kuendgen, M.G. Della Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, A. Giagounidis, B. Hildebrandt, P. Bernasconi, S. Knipp, C. Strupp, M. Lazzarino, C. Aul, M. Cazzola, Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes, *J Clin Oncol* 25 (2007) 3503-3510.
- [22] D.T. Bowen, P. Fenaux, E. Hellstrom-Lindberg, T. de Witte, Time-dependent prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes has significant limitations that may influence its reproducibility and practical application, *J Clin Oncol* 26 (2008) 1180; author reply 1181-1182.
- [23] L. Malcovati, M.G. Della Porta, C. Strupp, I. Ambaglio, A. Kuendgen, K. Nachtkamp, E. Travaglino, R. Invernizzi, C. Pascutto, M. Lazzarino, U. Germing, M. Cazzola, Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS), *Haematologica* 96 (2011) 1433-1440.
- [24] G. Garcia-Manero, J. Shan, S. Faderl, J. Cortes, F. Ravandi, G. Borthakur, W.G. Wierda, S. Pierce, E. Estey, J. Liu, X. Huang, H. Kantarjian, A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 22 (2008) 538-543.
- [25] U. Germing, B. Hildebrandt, M. Pfeilstocker, T. Nosslinger, P. Valent, C. Fonatsch, M. Lubbert, D. Haase, C. Steidl, O. Krieger, R. Stauder, A.A. Giagounidis, C. Strupp, A. Kundgen, T. Mueller, R. Haas, N. Gattermann, C. Aul, Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS), *Leukemia* 19 (2005) 2223-2231.
- [26] M.G. Della Porta, L. Malcovati, E. Boveri, E. Travaglino, D. Pietra, C. Pascutto, F. Passamonti, R. Invernizzi, A. Castello, U. Magrini, M. Lazzarino, M. Cazzola, Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes, *J Clin Oncol* 27 (2009) 754-762.
- [27] H. Kantarjian, S. O'Brien, F. Ravandi, J. Cortes, J. Shan, J.M. Bennett, A. List, P. Fenaux, G. Sanz, J.P. Issa, E.J. Freireich, G. Garcia-Manero, Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System, *Cancer* 113 (2008) 1351-1361.
- [28] A.J. Barrett, E. Sloand, Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance, *Haematologica* 94 (2009) 449-451.
- [29] W.J. Hirst, G.J. Mufti, Management of myelodysplastic syndromes, *Br J Haematol* 84 (1993) 191-196.
- [30] E. Hellstrom-Lindberg, R. Negrin, R. Stein, S. Krantz, G. Lindberg, J. Vardiman, A. Ost, P. Greenberg, Erythroid response to treatment with G-CSF plus erythropoietin for the anaemia of patients with myelodysplastic syndromes: proposal for a predictive model, *Br J Haematol* 99 (1997) 344-351.

- [31] E. Hellstrom-Lindberg, T. Ahlgren, Y. Beguin, M. Carlsson, J. Carneskog, I.M. Dahl, I. Dybedal, G. Grimfors, L. Kanter-Lewensohn, O. Linder, M. Luthman, E. Lofvenberg, H. Nilsson-Ehle, J. Samuelsson, J.M. Tangen, I. Winqvist, G. Oberg, A. Osterborg, A. Ost, Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients, *Blood* 92 (1998) 68-75.
- [32] J.A. Thompson, D.G. Gilliland, J.T. Prchal, J.M. Bennett, K. Larholt, R.A. Nelson, E.H. Rose, M.H. Dugan, Effect of recombinant human erythropoietin combined with granulocyte/ macrophage colony-stimulating factor in the treatment of patients with myelodysplastic syndrome. GM/EPO MDS Study Group, *Blood* 95 (2000) 1175-1179.
- [33] G. Mathe, L. Schwarzenberg, Treatment of bone marrow aplasia by mismatched bone marrow transplantation after conditioning with antilymphocyte globulin--long-term results, *Transplant Proc* 8 (1976) 595-602.
- [34] E. Gluckman, A. Devergie, A. Poros, P. Degoulet, Results of immunosuppression in 170 cases of severe aplastic anaemia. Report of the European Group of Bone Marrow Transplant (EGBMT), *Br J Haematol* 51 (1982) 541-550.
- [35] J.J. Molldrem, Y.Z. Jiang, M. Stetler-Stevenson, D. Mavroudis, N. Hensel, A.J. Barrett, Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles, *Br J Haematol* 102 (1998) 1314-1322.
- [36] D.E. Epperson, R. Nakamura, Y. Sauntharajah, J. Melenhorst, A.J. Barrett, Oligoclonal T cell expansion in myelodysplastic syndrome: evidence for an autoimmune process, *Leuk Res* 25 (2001) 1075-1083.
- [37] M. Jadersten, L. Malcovati, I. Dybedal, M.G. Della Porta, R. Invernizzi, S.M. Montgomery, C. Pascutto, A. Porwit, M. Cazzola, E. Hellstrom-Lindberg, Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome, *J Clin Oncol* 26 (2008) 3607-3613.
- [38] E.M. Sloand, C.O. Wu, P. Greenberg, N. Young, J. Barrett, Factors affecting response and survival in patients with myelodysplasia treated with immunosuppressive therapy, *J Clin Oncol* 26 (2008) 2505-2511.
- [39] E.M. Sloand, L. Mainwaring, M. Fuhrer, S. Ramkissoon, A.M. Risitano, K. Keyvanafar, J. Lu, A. Basu, A.J. Barrett, N.S. Young, Preferential suppression of trisomy 8 compared with normal hematopoietic cell growth by autologous lymphocytes in patients with trisomy 8 myelodysplastic syndrome, *Blood* 106 (2005) 841-851.
- [40] E.M. Sloand, A.J. Barrett, Immunosuppression for myelodysplastic syndrome: how bench to bedside to bench research led to success, *Hematol Oncol Clin North Am* 24 (2010) 331-341.
- [41] M. Castro, D.L. Conn, W.P. Su, J.P. Garton, Rheumatic manifestations in myelodysplastic syndromes, *J Rheumatol* 18 (1991) 721-727.
- [42] C. Fozza, S. Contini, A. Galleu, M.P. Simula, P. Viridis, S. Bonfigli, M. Longinotti, Patients with myelodysplastic syndromes display several T-cell expansions, which are mostly polyclonal in the CD4(+) subset and oligoclonal in the CD8(+) subset, *Exp Hematol* 37 (2009) 947-955.

- [43] M.T. Kasner, S.M. Luger, Update on the therapy for myelodysplastic syndrome, *Am J Hematol* 84 (2009) 177-186.
- [44] V. Gelsi-Boyer, N. Vey, [Recent advances in the treatment of myelodysplastic syndromes], *Rev Med Interne* 27 (2006) 600-609.
- [45] P.K. Epling-Burnette, J.S. Painter, D.E. Rollison, E. Ku, D. Vendron, R. Widen, D. Boulware, J.X. Zou, F. Bai, A.F. List, Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome, *Leukemia* 21 (2007) 659-667.
- [46] K. Allampallam, V. Shetty, S. Mundle, D. Dutt, H. Kravitz, P.L. Reddy, S. Alvi, N. Galili, G.S. Saberwal, S. Anthwal, M.W. Shaikh, A. York, A. Raza, Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome, *Int J Hematol* 75 (2002) 289-297.
- [47] M. Kitagawa, I. Saito, T. Kuwata, S. Yoshida, S. Yamaguchi, M. Takahashi, T. Tanizawa, R. Kamiyama, K. Hirokawa, Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 11 (1997) 2049-2054.
- [48] M. Koike, T. Ishiyama, S. Tomoyasu, N. Tsuruoka, Spontaneous cytokine overproduction by peripheral blood mononuclear cells from patients with myelodysplastic syndromes and aplastic anemia, *Leuk Res* 19 (1995) 639-644.
- [49] H.J. Deeg, J. Gotlib, C. Beckham, K. Dugan, L. Holmberg, M. Schubert, F. Appelbaum, P. Greenberg, Soluble TNF receptor fusion protein (etanercept) for the treatment of myelodysplastic syndrome: a pilot study, *Leukemia* 16 (2002) 162-164.
- [50] D. Bouscary, J. De Vos, M. Guesnu, K. Jondeau, F. Viguier, J. Melle, F. Picard, F. Dreyfus, M. Fontenay-Roupie, Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 11 (1997) 839-845.
- [51] P. Lepelley, N. Grardel, O. Erny, T. Iaru, V. Obein, A. Cosson, P. Fenaux, Fas/APO-1 (CD95) expression in myelodysplastic syndromes, *Leuk Lymphoma* 30 (1998) 307-312.
- [52] P.K. Epling-Burnette, F. Bai, J.S. Painter, D.E. Rollison, H.R. Salih, M. Krusch, J. Zou, E. Ku, B. Zhong, D. Boulware, L. Moscinski, S. Wei, J.Y. Djeu, A.F. List, Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors, *Blood* 109 (2007) 4816-4824.
- [53] S.Y. Kordasti, W. Ingram, J. Hayden, D. Darling, L. Barber, B. Afzali, G. Lombardi, M.W. Wlodarski, J.P. Maciejewski, F. Farzaneh, G.J. Mufti, CD4+CD25high Foxp3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndrome (MDS), *Blood* 110 (2007) 847-850.
- [54] J.X. Zou, D.E. Rollison, D. Boulware, D.T. Chen, E.M. Sloand, L.V. Pfannes, J.J. Goronzy, F. Bai, J.S. Painter, S. Wei, D. Cosgrove, A.F. List, P.K. Epling-Burnette, Altered naive and memory CD4+ T-cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome, *Leukemia* 23 (2009) 1288-1296.
- [55] S. Aggarwal, A.A. van de Loosdrecht, C. Alhan, G.J. Ossenkoppele, T.M. Westers, H.J. Bontkes, Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy, *Br J Haematol* 153 (2011) 568-581.
- [56] A. Pellagatti, M. Cazzola, A. Giagounidis, J. Perry, L. Malcovati, M.G. Della Porta, M. Jadersten, S. Killick, A. Verma, C.J. Norbury, E. Hellstrom-Lindberg,

- J.S. Wainscoat, J. Boulton, Deregulated gene expression pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem cells, *Leukemia* 24 (2010) 756-764.
- [57] H. Kook, W. Zeng, C. Guibin, M. Kirby, N.S. Young, J.P. Maciejewski, Increased cytotoxic T cells with effector phenotype in aplastic anemia and myelodysplasia, *Exp Hematol* 29 (2001) 1270-1277.
- [58] M.W. Wlodarski, L.P. Gondek, Z.P. Nearman, M. Plasilova, M. Kalaycio, E.D. Hsi, J.P. Maciejewski, Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 108 (2006) 2632-2641.
- [59] S. Meers, P. Vandenberghe, M. Boogaerts, G. Verhoef, M. Delforge, The clinical significance of activated lymphocytes in patients with myelodysplastic syndromes: a single centre study of 131 patients, *Leuk Res* 32 (2008) 1026-1035.
- [60] W. Hamdi, H. Ogawara, H. Handa, N. Tsukamoto, H. Murakami, Clinical significance of Th1/Th2 ratio in patients with myelodysplastic syndrome, *Int J Lab Hematol* 31 (2009) 630-638.
- [61] T.J. Hamblin, Immunological abnormalities in myelodysplastic syndromes, *Semin Hematol* 33 (1996) 150-162.
- [62] M.A. Baumann, T.J. Milson, C.W. Patrick, J.A. Libnoch, R.H. Keller, Immunoregulatory abnormalities in myelodysplastic disorders, *Am J Hematol* 22 (1986) 17-26.
- [63] F. Alfinito, M. Sica, L. Luciano, R.D. Pepa, C. Palladino, I. Ferrara, U. Giani, G. Ruggiero, G. Terrazzano, Immune dysregulation and dyserythropoiesis in the myelodysplastic syndromes, *Br J Haematol* 148 (2010) 90-98.
- [64] A.G. Bynoe, C.S. Scott, P. Ford, B.E. Roberts, Decreased T helper cells in the myelodysplastic syndromes, *Br J Haematol* 54 (1983) 97-102.
- [65] G. Carpani, A. Rosti, N. Vozzo, T lymphocyte subpopulations in myelodysplastic syndromes, *Acta Haematol* 81 (1989) 173-175.
- [66] S.J. Knox, B.R. Greenberg, R.W. Anderson, L.S. Rosenblatt, Studies of T-lymphocytes in preleukemic disorders and acute nonlymphocytic leukemia: in vitro radiosensitivity, mitogenic responsiveness, colony formation, and enumeration of lymphocytic subpopulations, *Blood* 61 (1983) 449-455.
- [67] A. Symeonidis, A. Kourakli, P. Katevas, M. Perraki, M. Tiniakou, P. Matsouka, V. Georgoulas, N. Zoumbos, Immune function parameters at diagnosis in patients with myelodysplastic syndromes: correlation with the FAB classification and prognosis, *Eur J Haematol* 47 (1991) 277-281.
- [68] L. Zhou, A.N. Nguyen, D. Sohal, J. Ying Ma, P. Pahanish, K. Gundabolu, J. Hayman, A. Chubak, Y. Mo, T.D. Bhagat, B. Das, A.M. Kapoun, T.A. Navas, S. Parmar, S. Kambhampati, A. Pellagatti, I. Braunschweig, Y. Zhang, A. Wickrema, S. Medicherla, J. Boulton, L.C. Plataniias, L.S. Higgins, A.F. List, M. Bitzer, A. Verma, Inhibition of the TGF-beta receptor I kinase promotes hematopoiesis in MDS, *Blood* 112 (2008) 3434-3443.
- [69] S.Y. Kordasti, B. Afzali, Z. Lim, W. Ingram, J. Hayden, L. Barber, K. Matthews, R. Chelliah, B. Guinn, G. Lombardi, F. Farzaneh, G.J. Mufti, IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome, *Br J Haematol* 145 (2009) 64-72.

- [70] E. Flores-Figueroa, G. Gutierrez-Espindola, J.J. Montesinos, R.M. Arana-Trejo, H. Mayani, In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndrome, *Leuk Res* 26 (2002) 677-686.
- [71] A.M. Marcondes, A.J. Mhyre, D.L. Stirewalt, S.H. Kim, C.A. Dinarello, H.J. Deeg, Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 2865-2870.
- [72] L. Molnar, T. Berki, A. Hussain, P. Nemeth, H. Losonczy, Detection of TNFalpha expression in the bone marrow and determination of TNFalpha production of peripheral blood mononuclear cells in myelodysplastic syndrome, *Pathol Oncol Res* 6 (2000) 18-23.
- [73] D.B. Kerbauy, H.J. Deeg, Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome, *Exp Hematol* 35 (2007) 1739-1746.
- [74] V. Shetty, S. Mundle, S. Alvi, M. Showel, L. Broady-Robinson, S. Dar, R. Borok, J. Showel, S. Gregory, S. Rifkin, S. Gezer, A. Parcharidou, P. Venugopal, R. Shah, B. Hernandez, M. Klein, D. Alston, E. Robin, C. Dominquez, A. Raza, Measurement of apoptosis, proliferation and three cytokines in 46 patients with myelodysplastic syndromes, *Leuk Res* 20 (1996) 891-900.
- [75] G. Stifter, S. Heiss, G. Gastl, A. Tzankov, R. Stauder, Over-expression of tumor necrosis factor-alpha in bone marrow biopsies from patients with myelodysplastic syndromes: relationship to anemia and prognosis, *Eur J Haematol* 75 (2005) 485-491.
- [76] G.E. Verhoef, P. De Schouwer, J.L. Ceuppens, J. Van Damme, W. Goossens, M.A. Boogaerts, Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 6 (1992) 1268-1272.
- [77] M. Kitagawa, M. Takahashi, S. Yamaguchi, M. Inoue, S. Ogawa, K. Hirokawa, R. Kamiyama, Expression of inducible nitric oxide synthase (NOS) in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes, *Leukemia* 13 (1999) 699-703.
- [78] T. Takahashi, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, S. Sakaguchi, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J Exp Med* 192 (2000) 303-310.
- [79] I.J. Fuss, M. Boirivant, B. Lacy, W. Strober, The interrelated roles of TGF-beta and IL-10 in the regulation of experimental colitis, *J Immunol* 168 (2002) 900-908.
- [80] H. Jonuleit, E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, A.H. Enk, Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells, *J Exp Med* 196 (2002) 255-260.
- [81] K.W. Moore, R. de Waal Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu Rev Immunol* 19 (2001) 683-765.
- [82] L. Schandene, C. Alonso-Vega, F. Willems, C. Gerard, A. Delvaux, T. Velu, R. Devos, M. de Boer, M. Goldman, B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10, *J Immunol* 152 (1994) 4368-4374.
- [83] M.T. Bejarano, R. de Waal Malefyt, J.S. Abrams, M. Bigler, R. Bacchetta, J.E. de Vries, M.G. Roncarolo, Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures, *Int Immunol* 4 (1992) 1389-1397.

- [84] P. Romagnoli, D. Hudrisier, J.P. van Meerwijk, Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells, *J Immunol* 168 (2002) 1644-1648.
- [85] S.S. Kang, P.M. Allen, Priming in the presence of IL-10 results in direct enhancement of CD8+ T cell primary responses and inhibition of secondary responses, *J Immunol* 174 (2005) 5382-5389.
- [86] W. Chen, S.M. Wahl, TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression, *Cytokine Growth Factor Rev* 14 (2003) 85-89.
- [87] F. Zorat, V. Shetty, D. Dutt, L. Lisak, F. Nascimben, K. Allampallam, S. Dar, A. York, S. Gezer, P. Venugopal, A. Raza, The clinical and biological effects of thalidomide in patients with myelodysplastic syndromes, *Br J Haematol* 115 (2001) 881-894.
- [88] K. Allampallam, V. Shetty, S. Hussaini, L. Mazzoran, F. Zorat, R. Huang, A. Raza, Measurement of mRNA expression for a variety of cytokines and its receptors in bone marrows of patients with myelodysplastic syndromes, *Anticancer Res* 19 (1999) 5323-5328.
- [89] M.P. Powers, H. Nishino, Y. Luo, A. Raza, A. Vanguri, L. Rice, Y. Zu, C.C. Chang, Polymorphisms in TGFbeta and TNFalpha are associated with the myelodysplastic syndrome phenotype, *Arch Pathol Lab Med* 131 (2007) 1789-1793.
- [90] T. Akiyama, T. Matsunaga, T. Terui, K. Miyanishi, I. Tanaka, T. Sato, H. Kuroda, R. Takimoto, T. Takayama, J. Kato, N. Yamauchi, K. Kogawa, S. Sakamaki, Y. Hirayama, K. Kohda, Y. Niitsu, Involvement of transforming growth factor-beta and thrombopoietin in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome with myelofibrosis, *Leukemia* 19 (2005) 1558-1566.
- [91] A. Verma, A.F. List, Cytokine targets in the treatment of myelodysplastic syndromes, *Curr Hematol Rep* 4 (2005) 429-435.
- [92] H.N. Higgs, Formin proteins: a domain-based approach, *Trends Biochem Sci* 30 (2005) 342-353.
- [93] J. Faix, R. Grosse, Staying in shape with formins, *Dev Cell* 10 (2006) 693-706.
- [94] B.L. Goode, M.J. Eck, Mechanism and function of formins in the control of actin assembly, *Annu Rev Biochem* 76 (2007) 593-627.
- [95] Y. Han, E. Eppinger, I.G. Schuster, L.U. Weigand, X. Liang, E. Kremmer, C. Peschel, A.M. Krackhardt, Formin-like 1 (FMNL1) is regulated by N-terminal myristoylation and induces polarized membrane blebbing, *J Biol Chem* 284 (2009) 33409-33417.
- [96] P.M. Favaro, S. de Souza Medina, F. Traina, D.S. Basseres, F.F. Costa, S.T. Saad, Human leukocyte formin: a novel protein expressed in lymphoid malignancies and associated with Akt, *Biochem Biophys Res Commun* 311 (2003) 365-371.
- [97] P.M. Favaro, F. Traina, J. Vassallo, P. Brousset, G. Delsol, F.F. Costa, S.T. Saad, High expression of FMNL1 protein in T non-Hodgkin's lymphomas, *Leuk Res* 30 (2006) 735-738.
- [98] I.G. Schuster, D.H. Busch, E. Eppinger, E. Kremmer, S. Milosevic, C. Hennard, C. Kuttler, J.W. Ellwart, B. Frankenberger, E. Nossner, C. Salat, C. Bogner, A. Borkhardt, H.J. Kolb, A.M. Krackhardt, Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies, *Blood* 110 (2007) 2931-2939.

- [99] T.S. Gomez, K. Kumar, R.B. Medeiros, Y. Shimizu, P.J. Leibson, D.D. Billadeau, Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse, *Immunity* 26 (2007) 177-190.
- [100] A.M. Krackhardt, M. Witzens, S. Harig, F.S. Hodi, A.J. Zauls, M. Chessia, P. Barrett, J.G. Gribben, Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX, *Blood* 100 (2002) 2123-2131.
- [101] E. Calpe, P. Favaro, M. Crespo, M. Baptista, A. Muntañola, E. Giné, STO Saad, E. Montserrat, FMNL-1 (formin Like 1) gene in chronic lymphocytic leukemia (CLL) is overexpressed in young patients with adverse prognostic factors and poor outcome, 48th Annual Meeting of the American Society of Hematology 108 (2006) 785-786.
- [102] M.E. Chamuleau, T.M. Westers, L. van Dreunen, J. Groenland, A. Zevenbergen, C.M. Eeltink, G.J. Ossenkoppele, A.A. van de Loosdrecht, Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome, *Haematologica* 94 (2009) 496-506.
- [103] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* 162 (1987) 156-159.
- [104] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [105] Y. Yoshida, J. Stephenson, G.J. Mufti, Myelodysplastic syndromes: from morphology to molecular biology. Part I. Classification, natural history and cell biology of myelodysplasia, *Int J Hematol* 57 (1993) 87-97.
- [106] A.D. Bogdanovic, D.P. Trpinac, G.M. Jankovic, V.Z. Bumbasirevic, M. Obradovic, M.D. Colovic, Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological and ultrastructural assessment, *Leukemia* 11 (1997) 656-659.
- [107] L. Nilsson, I. Astrand-Grundstrom, I. Arvidsson, B. Jacobsson, E. Hellstrom-Lindberg, R. Hast, S.E. Jacobsen, Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level, *Blood* 96 (2000) 2012-2021.
- [108] Y. Shioi, H. Tamura, N. Yokose, C. Satoh, K. Dan, K. Ogata, Increased apoptosis of circulating T cells in myelodysplastic syndromes, *Leuk Res* 31 (2007) 1641-1648.
- [109] S.D. Nimer, MDS: a stem cell disorder--but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease?, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2008) 43-51.
- [110] H.M. Amin, I. Jilani, E.H. Estey, M.J. Keating, A.L. Dey, T. Manshour, H.M. Kantarjian, Z. Estrov, J.E. Cortes, D.A. Thomas, F.J. Giles, M. Albitar, Increased apoptosis in bone marrow B lymphocytes but not T lymphocytes in myelodysplastic syndrome, *Blood* 102 (2003) 1866-1868.
- [111] N.L. Jacobs, S.G. Holtan, L.F. Porrata, S.N. Markovic, A. Tefferi, D.P. Steensma, Host immunity affects survival in myelodysplastic syndromes: Independent prognostic value of the absolute lymphocyte count, *Am J Hematol* 85 (2010) 160-163.

- [112] H. Pulhorn, M. Herrmann, H. Harms, A. Jung, I. Baumann, Apoptotic cells and clonally expanded cytotoxic T cells in bone marrow trephines of patients with myelodysplastic syndrome, *Histopathology* (2012).
- [113] P. Mewawalla, C.A. Dasanu, Immune alterations in untreated and treated myelodysplastic syndrome, *Expert Opin Drug Saf* 10 (2011) 351-361.
- [114] Z. Zheng, Z. Qianqiao, H. Qi, X. Feng, C. Chunkang, L. Xiao, In vitro deprivation of CD8(+)CD57(+)T cells promotes the malignant growth of bone marrow colony cells in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome, *Exp Hematol* 38 (2010) 677-684.
- [115] I. Kotsianidis, I. Bouchliou, E. Nakou, E. Spanoudakis, D. Margaritis, A.V. Christophoridou, A. Anastasiades, C. Tsigalou, G. Bourikas, A. Karadimitris, C. Tsatalas, Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS), *Leukemia* 23 (2009) 510-518.
- [116] H. Jonuleit, E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, A.H. Enk, Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood, *J Exp Med* 193 (2001) 1285-1294.
- [117] J. Ongradi, B. Stercz, V. Kovesdi, L. Vertes, Immunosenescence and vaccination of the elderly, I. Age-related immune impairment, *Acta Microbiol Immunol Hung* 56 (2009) 199-210.
- [118] M.R. Dowling, P.D. Hodgkin, Modelling naive T-cell homeostasis: consequences of heritable cellular lifespan during ageing, *Immunol Cell Biol* 87 (2009) 445-456.
- [119] Y.N. Naumov, E.N. Naumova, M.B. Yassai, J. Gorski, Selective T cell expansion during aging of CD8 memory repertoires to influenza revealed by modeling, *J Immunol* 186 (2011) 6617-6624.
- [120] L. Malcovati, M.G. Porta, C. Pascutto, R. Invernizzi, M. Boni, E. Travaglini, F. Passamonti, L. Arcaini, M. Maffioli, P. Bernasconi, M. Lazzarino, M. Cazzola, Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making, *J Clin Oncol* 23 (2005) 7594-7603.
- [121] J. Cermak, P. Kacirkova, D. Mikulenkova, K. Michalova, Impact of transfusion dependency on survival in patients with early myelodysplastic syndrome without excess of blasts, *Leuk Res* 33 (2009) 1469-1474.
- [122] E.P. Alessandrino, M.G. Della Porta, A. Bacigalupo, L. Malcovati, E. Angelucci, M.T. Van Lint, M. Falda, F. Onida, M. Bernardi, S. Guidi, B. Lucarelli, A. Rambaldi, R. Cerretti, P. Marengo, P. Pioltelli, C. Pascutto, R. Oneto, L. Pirolini, R. Fanin, A. Bosi, Prognostic impact of pre-transplantation transfusion history and secondary iron overload in patients with myelodysplastic syndrome undergoing allogeneic stem cell transplantation: a GITMO study, *Haematologica* 95 (2010) 476-484.
- [123] J.A. Bluestone, A.K. Abbas, Natural versus adaptive regulatory T cells, *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 253-257.
- [124] S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science* 299 (2003) 1057-1061.
- [125] J.D. Fontenot, M.A. Gavin, A.Y. Rudensky, Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells, *Nat Immunol* 4 (2003) 330-336.
- [126] R. Khattri, T. Cox, S.A. Yasayko, F. Ramsdell, An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat Immunol* 4 (2003) 337-342.

- [127] D. Dieckmann, C.H. Bruett, H. Ploettner, M.B. Lutz, G. Schuler, Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected], *J Exp Med* 196 (2002) 247-253.
- [128] I. Bouchliou, P. Miltiades, E. Nakou, E. Spanoudakis, A. Goutzouvelidis, S. Vakalopoulou, V. Garypidou, V. Kotoula, G. Bourikas, C. Tsatalas, I. Kotsianidis, Th17 and Foxp3(+) T regulatory cell dynamics and distribution in myelodysplastic syndromes, *Clin Immunol* 139 (2011) 350-359.
- [129] H. von Boehmer, Mechanisms of suppression by suppressor T cells, *Nat. Immunol* 6 (2005) 338–344.
- [130] T. Yamaguchi, J.B. Wing, S. Sakaguchi, Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions, *Semin Immunol* 23 (2011) 424-430.
- [131] J.P. Maciejewski, E.M. Sloand, O. Nunez, C. Boss, N.S. Young, Recombinant humanized anti-IL-2 receptor antibody (daclizumab) produces responses in patients with moderate aplastic anemia, *Blood* 102 (2003) 3584-3586.
- [132] S.H. Swerdlow, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W., World Health Organization classification of tumours. Pathology & genetics. Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, IARC Press (Lyon (2008)) 88–107.

Anexos I

 **FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
☒ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
☎ FAX (0_19) 3788-8925
☎ www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
☎ cep@fem.unicamp.br

CEP, 24/05/05.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 124/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperexpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHFGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isofarmas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com subgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendrítica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

- 1 -

III - SUMÁRIO

Para esse estudo participarão, no mínimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. O diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometria de fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); extração de DNA para investigação das mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro

Anexo II

Resumo Projeto Temático - processo nº 05/51681-1

Título: "Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo e novas terapêuticas nas síndromes mielodisplásicas e em linhagens leucêmicas"

As síndromes mielodisplásicas (SDMs) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoiéticas, que exibem hematopoiese ineficaz. Pouco se sabe a respeito da patogênese das SMDs e dos processos que medeiam a sua freqüente transformação em leucemias. Nos últimos anos tem se tomado evidente que alterações na composição e/ou função do microambiente celular podem ser implicadas na progressão de diversas desordens hematológicas, particularmente em SMDs. Novas terapias têm sido propostas a partir das características biológicas deste tipo de tumor, porém os eventos moleculares responsáveis pela manutenção ou propagação da população clonal anômala permanecem ainda desconhecidos, sendo que muitas vezes os agentes terapêuticos utilizados não são alvo-específico. Sendo assim, a caracterização de alvos moleculares importantes para os processos de diferenciação e progressão tumoral mielóide poderá fornecer informações que podem contribuir para a geração de novas drogas com maior e melhor especificidade de ação. A partir do Projeto Genoma Humano, diversos genes novos têm sido identificados, muitos deles apresentando grande potencial para alvos terapêuticos. A proposta deste projeto é a caracterização da regulação da expressão de novos genes, especificamente: ARHGAP21, MASK e Formina, assim como de outras proteínas, nas mielodisplasias, frente a diferentes tratamentos, visando investigar mecanismos moleculares deste tipo de tumor e o desenvolvimento de novas estratégias para terapia anti-tumoral. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasia, para cumprimento de alguns objetivos utilizaremos linhagens leucêmicas como modelos. Além disso mutações serão pesquisadas em genes que podem se associar com evolução para leucemia como PTPN11, FLT3, AML-1, GATA-1 .

PALAVRAS- CHAVES: mielodisplasia, MASK, ARHGAP 21, Formina, estroma , APAF-1