



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde



Doutorado

**EXPRESSÃO DA TETRASPANINA (CD81) EM MIELOBLASTOS
E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS TH2 E
PROGNÓSTICO ADVERSO EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

ROSSY-ERIC PEREIRA SOARES

São Luís

2021

ROSSY-ERIC PEREIRA SOARES

**EXPRESSÃO DA TETRASPANINA (CD81) EM MIELOBLASTOS
E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS TH2 E
PROGNÓSTICO ADVERSO EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de *Doutor em Ciências da Saúde*.

Orientador (a): Profa. Dra. Silma Regina
Ferreira Pereira

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Pereira Soares, Rossy-Eric.

EXPRESSÃO DA TETRASPANINA CD81 EM MIELOBLASTOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PERFIL DE CITOCINAS TH2 E PROGNÓSTICO ADVERSO EM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA / Rossy-Eric Pereira Soares. - 2021.

129 f.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.

1. CD81. 2. Citocinas. 3. LMA. 4. Prognóstico. I. Ferreira Pereira, Silma Regina. II. Título.

ROSSY-ERIC PEREIRA SOARES

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Presidente da banca - UFMA

Prof. Dr. Alexander Birbrair
Titular - UFMG

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Titular - UFPA

Prof. Dr. Eduardo Martins de Sousa Pereira
Titular - UNICEUMA

Profa. Dra. Ana Paula Azevedo dos Santos
Titular - UFMA

Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira
Suplente - UFMA

Profa. Dra. Rosane Nassar G. M. Libério
Suplente - UFMA

Prof. Dr. André Salim Khayat
Suplente - UFPA

Prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto
Suplente - UNICEUMA

Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.

São Tomás de Aquino

*Dedico esta tese a todos os pacientes e a seus familiares.
Também a dedico à minha amada esposa, à minha avó
(in memoriam) e avô (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que é Senhor sobre a minha vida, que me trouxe à luz e me fez ver a ciência como um belo e harmonioso instrumento de suas mãos.

À minha família (avós, mãe, padrasto, tios e tias, irmãos e irmãs, primos e primas), que muito contribuiu para esta conquista.

À minha eterna namorada – hoje esposa – que suportou passar comigo por todas as aflições, que andou sob cacos de vidro enquanto nossos pés eram acutilados pelos estilhaços cortantes, que sentiu a mesma dor dos espinhos que me perfuraram a carne, mas que nunca esmoreceu ou deixou-se esmorecer e hoje chegamos juntos ao jardim das margaridas para contemplar a bem-aventurança.

À minha orientadora, Profa. Dra Silma Regina Pereira, que desde uma tarde de 2009, no terceiro dia de aula da graduação, me acolheu como aluno e me fez percorrer com ousadia todos os caminhos que me trouxeram até aqui. Por essa longa história, e por todos os momentos juntos vividos, conselhos grátis, sorrisos e vinhos bebidos, minha eterna gratidão.

À todos os meus amados colegas de laboratório. Ah, o que seria de uma rotina árdua de trabalho, de experimentos malsucedidos, das alegrias de quando tudo vai bem se não houvesse vocês como peregrinos, compartilhando a mesma jornada que eu, caminhando para o mesmo objetivo? Não cito nomes para não incorrer na injustiça de esquecer alguém. Mas sintam-se todos igualmente agradecidos por cada momento que compartilhamos.

Agradeço a UFMA, ao programa de pós-graduação em ciências da saúde e ao laboratório Cedro que, juntos, proporcionaram a execução de todo este projeto, resultando, agora, nesta tese de doutorado.

Por fim, agradeço a todos os grandes mestres, professoras e professores, amigos, conhecidos, pessoas visíveis e invisíveis, que costuraram a minha cortina de retalhos. Sim, sou uma cortina de retalhos e cada retalho representa um pouco do que ficou de cada um.

RESUMO

CD81, membro da família das tetraspaninas, é uma proteína de membrana relacionada à respostas imunossupressoras e está associada a prognósticos adversos em mieloma múltiplo e leucemia mieloide aguda (LMA). Embora estudos apoiem a ocorrência de desregulação na produção de citocinas nas neoplasias hematológicas, não é conhecida a relação entre a expressão de CD81 em mieloblastos e o perfil de citocinas em pacientes com LMA. Assim, avaliamos a associação entre a expressão de CD81 e os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17, e seu valor prognóstico em LMA. Para isso, foram estudados 121 pacientes diagnosticados com LMA e 40 indivíduos controle. Observamos a expressão de CD81 em 100/121 (82,6%) pacientes ($P < 0,05$). Os níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-10, TNF α e IFN γ foram significativamente mais elevados nos pacientes com LMA em relação ao grupo controle ($P < 0,05$). Observamos também que os níveis de IL-2 e IFN γ foram menores nos pacientes com maior percentual de blastos positivos para CD81, enquanto os níveis séricos de IL-4 e IL-10 foram superiores ($P < 0,05$). A expressão de CD81, associada aos baixos níveis de IL-2 e IFN γ e altos níveis de IL-4 e IL-10, afetou negativamente a sobrevida global, sobrevida livre de eventos e contribuiu para recidiva precoce. Além disso, demonstramos, através da análise do componente principal, que há segregação entre os grupos com menor e maior percentual de blastos que expressavam CD81 ($P < 0,05$) para IL-2, IL-10, IFN γ e sobrevida global. Em suma, ratificamos que CD81 é um marcador de mau prognóstico para LMA, e sugerimos que esse prognóstico adverso está associado a um perfil de resposta imunossupressora. Além disso, demonstramos que esta tetraspanina é capaz de separar grupos de risco não somente pela presença ou ausência de expressão, mas, principalmente, pela frequência com que os blastos apresentam expressão deste antígeno. Por fim, nossos achados contribuem para compreensão da relação da expressão de CD81 com a resposta imune nos pacientes com LMA e amplia o conhecimento sobre o papel desta tetraspanina na LMA, além, claro, de evidenciá-la como marcador útil para prever prognóstico e, possivelmente, candidato à terapia alvo.

Palavras chave: CD81, LMA, citocinas, prognóstico.

ABSTRACT

CD81, a member of the tetraspanin family, is a membrane protein involved in immunosuppressive responses and associated with adverse outcomes in multiple myeloma and acute myeloid leukemia (AML). Although studies support the occurrence of dysregulation in the production of cytokines in hematologic malignancies, the relationship between the expression of CD81 in myeloblasts and the cytokine profile in patients with AML is not known. Thus, we evaluated the association between CD81 expression and Th1, Th2 and Th17 cytokine levels, as well as its prognostic value in AML. For this, 121 patients diagnosed with AML and 40 control subjects were studied. We observed the expression of CD81 in 100/121 (82.6%) patients ($P < 0.05$). Serum levels of IL-2, IL-4, IL-10, TNF α and IFN γ were significantly higher in AML patients compared to the control group ($P < 0.05$). The expression of CD81, associated with low levels of IL-2 and IFN γ and high levels of IL-4 and IL-10, negatively affected overall survival, event-free survival and contributed to early relapse. Furthermore, we demonstrated, through principal component analysis, that there is a segregation between groups with the lowest and highest percentage of blasts expressing CD81 ($P < 0.05$) for IL-2, IL-10, IFN γ and overall survival. In summary, we confirm that CD81 is a poor prognostic marker for AML, possibly because its expression present in a higher frequency of blasts is associated with an immunosuppressive immune response profile. Furthermore, we demonstrated that this tetraspanin is capable of separating risk groups not only due to the presence or absence of expression, but mainly due to the frequency with which the blasts present expression of this antigen. Finally, our findings contribute to the understanding of the relationship of CD81 expression with the immune response in patients with AML and to expand investigations into the role of this tetraspanin in this neoplasm, in addition, of course, highlighting it as a useful marker to predict prognosis and possibly, candidate for target therapy.

Keywords: CD81, AML, cytokines, prognosis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AIDA:** *Ácido trans-retinóico + Idarrubicina*
- APC:** *Células apresentadores de antígeno*
- ASXL1:** *ASXL transcriptional regulator 1*
- ATRA:** *Ácido trans-retinóico*
- CBFB-MYH11:** *Core-binding factor subunit beta-myosin heavy chain 11*
- CD:** *Cluster differentiation*
- CEBPA:** *CCAAT enhancer binding protein alpha*
- CFM:** *Citometria de fluxo multiparamétrica*
- CHIP:** *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*
- c-Kit:** *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*
- CTH:** *Célula tronco hematopoética*
- CTLA-4:** *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*
- DNA:** *Deoxyribonucleic acid*
- DNMT3A:** *DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3^a*
- DRM:** *Doença residual mínima*
- EZH2:** *Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit*
- FAB:** *French-American-British*
- FLT3-ITD:** *Fms related tyrosine kinase 3 internal tandem duplication*
- GBCFLUX:** *Grupo Brasileiro de Citometria de Fluxo*
- G-CSF:** *Granulocyte-colony stimulating fator*
- GITR:** *TNF induzido por receptor de glicocorticoide*
- GM-CSF:** *Granulocyte and Monocyte-colony stimulating fator*
- HLA:** *Major Histocompatibility Complex*
- HPN:** *Hemoglobinúria paroxística noturna*
- ICUS:** *Idiopathic cytopenia of indeterminate significance*
- IDH1/2:** *Isocitrate dehydrogenase 1/2*
- IFN γ :** *Interferon gama*

IL-10: *Interleucina 10*

IL-12: *Interleucina 12*

IL-13: *Interleucina 13*

IL-15: *Interleucina 15*

IL-17: *Interleucina 17*

IL-17R: *Interleukin 17 receptor*

IL-18: *Interleucina 18*

IL-1 β : *Interleucina 1 beta*

IL-2: *Interleucina 2*

IL-21: *Interleucina 21*

IL-22: *Interleucina 22*

IL-23: *Interleucina 23*

IL-3: *Interleucina 3*

IL-35: *Interleucina 35*

IL-4: *Interleucina 4*

IL-5: *Interleucina 5*

IL-6: *Interleucina 6*

IL-7: *Interleucina 7*

IREM2: *Immune receptor expressed on myeloid cells 2 (CD300e)*

KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like receptor*

KMT2A: *Lysine methyltransferase 2A*

LAIP: *Leukemia-associated immunophenotype*

LLA: *Leucemia linfoide aguda*

LMA: *Leucemia mielóide aguda*

LPA: *Leucemia promielocítica aguda*

M-CSF: *Monocyte-colony stimulating factor*

MDSC: *Mieloid-derived suppressor cell*

MO: *Medula ósea*

MPO: Mieloperoxidase

MRT: *Morte relacionada ao tratamento*

NG2: *Neural/glial antigen 2*

NK: *Linfócitos natural killer*

NKT: *Linfócitos natural killer T*

NPM1: *nucleophosmin*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PCA: *Principial component analysis*

PML-RARA: *Promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha*

RC: *Remissão completa*

RNA: *Ribonucleic acid*

RT-qPCR: *Real Time-quantitative Polymerase Chain Reaction*

RUNX1: *Runt-related transcription fator 1*

SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*

OS: *Sobrevida global*

SMD: *Síndrome mielodisplásica*

SPADE: *Progression analysis of density-normalized events*

SRSF2: *Serine and arginine rich splicing factor 2*

STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*

SVM: *Support vector machines*

TAPA-1: *Target of na antiproliferative antibody*

TCTH: *Transplante de células tronco hematopoética*

TdT: *Terminal deoxynucleotidyl transferase*

TET2: *Tet methylcytosine dioxygenase 2*

TGFβ: *Fator transformador do crescimento beta*

Th: *Linfócitos T helper*

Th1: *Linfócitos Th1*

Th17: *Linfócitos Th17*

Th2: *Linfócitos Th2*

TNF α : *Fator de necrose tumoral*

TNF β : *Fator de necrose tumoral beta*

TP53: *Tumor protein p53*

Treg: *Linfócitos T reguladores*

U2AF1: *U2 small nuclear rna auxiliary factor 1*

WT1: *WT1 transcription factor*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemático da evolução do clone mielóide. Desenvolvimento gradual da hematopoese normal ou citopenia idiopática de significado indeterminado (CISI ou do inglês ICUS-idiopathic cytopenia of indeterminate significance), sem mutações, evoluindo para CHIP, síndrome mielodisplásica (SMD ou do inglês MDS-myelodisplastic syndrome) e leucemia mielóide aguda (LMA ou do inglês AML-acute myeloid leukemia). Os genes DNMT3A, ASXL1 e TP53) mutados são apresentados como exemplos, mas outros genes podem ser afetados seguindo uma ordem diferente (HEUSER et al., 2016).

Figura 2: Divisão das classes e seus respectivos genes que contribuem para o desenvolvimento de malignidades hematológicas. Adaptado de Morati et al (2012).

Figura 3: Representação gráfica do perfil de maturação mielóide. Diferenciação neutrófilica, monocítica e eritroide na medula óssea de um indivíduo saudável usando as combinações de marcadores do tubo 1 (maturação de neutrófilos), tubo 2 (células monocíticas) e tubo 3 (precursores eritróides) do painel de anticorpos proposto para LMA/SMD. As diferentes cores refletem estágios de diferenciação distintos dos precursores mais imaturos com CD34 positivo (cor verde) até a população madura (azul claro) de cada linhagem celular. (VAN DONGEN et al., 2012).

Figura 4: Representação gráfica da LMA com t (8;21)(q22;q22). Os blastos leucêmicos (cor vermelha; 36,3% dos leucócitos) na medula óssea mostram expressão de CD13 (heterogênea), CD19, CD33, CD34 (aumentada), CD45 (diminuída), CD56 (parcial), CD117 (aumentada), e HLA-DR. As células linfóides reativas de fundo são mostradas em azul e as células neutrofílicas são mostradas em verde (CHEN; CHERIAN, 2017).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Leucemia mielóide aguda	22
2.1.1 Aspectos fisiopatológicos	22
2.1.2 Diagnóstico, classificação e epidemiologia	26
2.1.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo multiparamétrica	28
2.1.4 Tratamento	33
2.1.5 Doença residual mínima	35
2.2 Implicações do sistema imunológico na LMA.....	37
2.2.1 Papel dos linfócitos T e células natural killer	38
2.2.2 Citocinas	43
3. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	46
3.1 Objetivo geral.....	47
3.2 Objetivos específicos cumpridos.....	47
4. RESULTADOS	48
Capítulo 1: Structure and function of the tetraspanin CD81 in hematologic neoplasms: a review	49
Capítulo 2 – Valor prognóstico de CD81 para leucemia mielóide aguda está correlacionado com o perfil de citocinas Th1/Th2.....	68
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
APÊNDICE	108
ANEXOS	119