



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Modulação da função e do repertório das células T por linfócitos B: caracterização imunológica de doentes com linfoma não Hodgkin tratados com quimioterapia, com ou sem o anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab

Ana Filipa Barahona Afonso

Orientação: Cristina João (MD, MsC, PhD)

M^a do Rosário Martins (MsC, PhD)

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2017

UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Modulação da função e do repertório das células T por linfócitos B: caracterização imunológica de doentes com linfoma não Hodgkin tratados com quimioterapia, com ou sem o anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab

Ana Filipa Barahona Afonso

Orientação: Cristina João (MD, MsC, PhD)

M^a do Rosário Martins (MsC, Ph.D)

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2017

Agradecimentos

Gostaria de deixar umas palavras de agradecimento aos que me ajudaram neste desafio:

- Quero agradecer muito à minha família pela motivação e compreensão demonstradas;
- Ao R. e ao A. pela inspiração e positividade;
- À L. pela generosidade incondicional;
- À minha orientadora, Professora Cristina João pela disponibilidade e sábio aconselhamento;
- À minha orientadora, Professora Rosário Martins, pelo apoio sempre demonstrado;
- Ao Constantin Fesel pelo companheirismo e ajuda na análise de *western blotting*;

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABELAS	VII
ABREVIATURAS E CONVENÇÕES	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1. FUNDAMENTO TEÓRICO	1
1.1. LINFOMAS NÃO HODGKIN.....	1
1.2. EPIDEMIOLOGIA	2
1.3. ETIOLOGIA DOS LNH	4
1.4. PATOGÊNESE DOS LNH	6
1.5. DESCRIÇÃO CLÍNICA.....	9
1.6. DIAGNÓSTICO E ESTADIAMENTO	10
1.7. OPÇÕES DE TRATAMENTO EM LINFOMAS NÃO HODGKIN B	15
1.7.1. Quimioterapia	15
1.7.1.1. Agentes alquilantes – <i>Crosslinking</i> do DNA	16
1.7.1.1.1. Efeitos secundários dos agentes alquilantes.....	17
1.7.1.2. Glucocorticoides – Indução da apoptose	17
1.7.1.2.1. Efeitos secundários dos glucocorticoides.....	19
1.7.1.3. Análogos da platina – <i>Crosslinking</i> do DNA.....	19
1.7.1.3.1. Efeitos secundários dos análogos da platina	20
1.7.1.4. Antimetabólitos – Interferência na fase S.....	21
1.7.1.4.1. Efeitos secundários dos antimetabólitos	22
1.7.1.5. Análogos da purina – Interferência na síntese de DNA.....	23
1.7.1.5.1. Efeitos secundários dos análogos da purina	25
1.7.1.6. Antraciclinas – Intercalação e inibição do DNA, perturbação das topoisomerasas e formação de ROS	25
1.7.1.6.1. Efeitos secundários das antraciclinas.....	27
1.7.1.7. Inibidores das topoisomerasas – Inibição das TOP I e TOP II	28
1.7.1.7.1. Efeitos secundários dos inibidores das topoisomerasas	29
1.7.1.8. Alcalóides da vinca – Inibidores mitóticos	29
1.7.1.8.1. Efeitos secundários dos alcalóides da vinca	31
1.7.2. Imunoterapia	32
1.7.2.1. Rituximab	35
1.7.2.1.1. Efeitos secundários do rituximab.....	39
1.7.3. Quimioterapia de combinação	40

2. PROBLEMÁTICA E IMPORTÂNCIA DA RECUPERAÇÃO DAS POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS B E T E DA COOPERAÇÃO ENTRE AMBAS EM DOENTES IMUNOSSUPRIMIDOS	41
3. OBJETIVOS	43
3.1. OBJETIVO GERAL	43
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4. METODOLOGIA	45
4.1. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL.....	45
4.1.1. Locais de realização.....	45
4.1.2. População em estudo	45
4.1.3. Calendarização de colheitas	46
4.1.4. Técnicas e parâmetros analisados.....	46
4.1.5. Análise estatística de resultados.....	47
4.3.1. Colheita de sangue periférico	51
4.3.2. Separação das células mononucleadas do sangue periférico por centrifugação em gradiente de densidade	51
4.3.2.1. Descrição da técnica de centrifugação.....	51
4.3.2.2. Procedimento experimental – Separação de células nonucleadas do sangue periférico	52
4.3.3. Determinação de populações linfocitárias por citometria de fluxo	53
4.3.3.1. Descrição da técnica de citometria de fluxo	53
4.3.3.2. Procedimento experimental – Marcação linfocitária de antígenos de superfície	54
4.3.4. Separação de soro e quantificação de proteína total.....	55
4.3.4.1. Descrição da técnica de separação de soro	55
4.3.4.2. Procedimento experimental – Separação do soro.....	55
4.3.4.3. Método do ácido bicinconínico	56
4.3.4.4. Protocolo da quantificação de proteína total pelo método do ácido bicinconínico	56
4.3.5. Quantificação de IgM e IgG séricas pelo método de imunoturbidimetria ...	57
4.3.5.1. Descrição da técnica de imunoturbidimetria.....	57
4.3.5.2. Procedimento experimental - Imunoturbidimetria para deteção de IgG e IgM	57
4.3.6. avaliação da funcionalidade e diversidade das imunoglobulinas por western blotting.....	58
4.3.6.1. Descrição da técnica de <i>western blotting</i>	58
4.3.6.2. Procedimento experimental de <i>western blotting</i>	59
5. RESULTADOS.....	63
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE DOENTES COM LNH B	63
5.2. ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA.....	64
5.3. ESTUDO DAS POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS	66
5.3.1. <i>Leucócitos</i>	66
5.3.2. <i>Linfócitos totais</i>	69

5.3.3.	<i>Linfócitos B</i>	71
5.3.4.	<i>Linfócitos T</i>	73
5.3.4.1.	<i>Linfócitos T auxiliares</i>	74
5.3.4.2.	<i>Linfócitos T citotóxicos</i>	74
5.4.	ESTUDO DA PRODUÇÃO E REATIVIDADE DE IGM E IGG	75
5.4.1.	<i>IgM</i>	76
5.4.2.	<i>IgG</i>	77
5.5.	EVENTOS INFECCIOSOS.....	79
6.	DISCUSSÃO	82
7.	CONCLUSÕES	85
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
9.	ANEXOS	101
9.1.	IMAGENS COMPLEMENTARES	101
9.2.	RESULTADOS ADICIONAIS	102
9.2.1.	<i>Análise comparativa entre grupos de tratamento</i>	102
9.3.	REAGENTES	105
9.4.	EQUIPAMENTO.....	107
9.5.	MATERIAL.....	108

Índice de Figuras

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO DOS ÓRGÃOS E VASOS LINFÁTICOS.....	1
FIGURA 2. REGISTO EPIDEMIOLÓGICO DO NÚMERO DE NOVOS CASOS E NÚMERO DE MORTES DOS CARCINOMAS MAIS FREQUENTES NO MUNDO EM HOMENS E MULHERES NO ANO DE 2012	2
FIGURA 3. ILUSTRAÇÃO DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE LNH NO MUNDO RELATIVA AO ANO DE 2012.	3
FIGURA 4. GRÁFICOS DA INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DE LNH EM HOMENS E MULHERES NO ANO DE 2012.....	4
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS DE DIFERENCIAÇÃO CELULARES DOS LNH B E T/NK MAIS COMUNS	6
FIGURA 6. MECANISMOS DE LIGAÇÃO DOS AGENTES ALQUILANTES ENTRE E INTRA CADEIAS DE DNA..	16
FIGURA 7. VIA DE SINALIZAÇÃO DOS GLUCOCORTICOIDES	18
FIGURA 8. ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS ANÁLOGOS DA PLATINA	19
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REATIVIDADE DA CISPLATINA E DOS OBSTÁCULOS ENCONTRADOS ANTES DE ATINGIR A MOLÉCULA DE DNA.....	20
FIGURA 10. ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO FÓLICO E DO ANTIMETABÓLITO CORRESPONDENTE, METOTREXATO.....	21
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO METOTREXATO.....	22
FIGURA 12. ESTRUTURA DA DESOXIADENOSINA E DOS RESPETIVOS ANÁLOGOS USADOS NO TRATAMENTO DE NHL B.....	24
FIGURA 13. MECANISMO QUIMIOTERAPÊUTICO DOS ANÁLOGOS DA DESOXIADENOSINA EM CÉLULAS LINFOCITÁRIAS QUIESCENTES.	24
FIGURA 14. ESTRUTURA QUÍMICA DA DAUNORRUBICINA E DOXORRUBICINA	25
FIGURA 15. REPRESENTAÇÃO DOS DOIS PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO DA DOXORRUBICINA NUMA CÉLULA NEOPLÁSICA	26
FIGURA 16. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DOS INIBIDORES DAS TOPOISOMERASES I E II NAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS	28
FIGURA 17. ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS FÁRMACOS INIBIDORES DAS TOPOISOMERASES II USADOS NO TRATAMENTO DE LNH	29
FIGURA 18. ESTRUTURA QUÍMICA DOS ALCALÓIDES DA VINCA.....	30
FIGURA 19. ESQUEMA REPRESENTATIVO DO MECANISMO DE AÇÃO DOS ALCALÓIDES DA VINCA	31
FIGURA 20. ESTRUTURA QUIMÉRICA DO RITUXIMAB.	35
FIGURA 21. LIGAÇÃO DO RITUXIMAB À PROTEÍNA INTRAMEMBRANAR DE LINFÓCITOS B, CD20.....	36
FIGURA 22. ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS MECANISMOS DE MORTE CELULAR PROPOSTOS PARA A AÇÃO DO RITUXIMAB NO TRATAMENTO DE LNH B (ADAPTADO (JAGLOWSKI, 2010)).....	36
FIGURA 23. FIGURA ESQUEMÁTICA DAS FASES DA SEPARAÇÃO DE PBMCs POR GRADIENTE DE DENSIDADE.....	52
FIGURA 24. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE FUNCIONAMENTO DE UM CITÓMETRO DE FLUXO.	54

FIGURA 25. CURVAS DE <i>KAPLAN-MEIER</i> REPRESENTATIVAS DA SOBREVIVÊNCIA DOS DOENTES COM LNH B PARA OS GRUPOS DE TRATAMENTO COM R, QT E RQT UTILIZANDO A FUNÇÃO SURV.FIT DA BIBLIOTECA R <i>SURVIVAL</i>	66
FIGURA 26. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LEUCÓCITOS POR MICROLITRO ($10^3/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.....	67
FIGURA 27. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS TAXAS DE PRIMEIROS EVENTOS DE LEUCOPÉNIA NOS DOENTES COM LNH B NOS GRUPOS DE TRATAMENTO COM QT, R E RQT NO DIAGNÓSTICO (T0) E NOS PERÍODOS DE TRATAMENTO (T0') E DE SEGUIMENTO (T1-T5).....	69
FIGURA 28. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS POR MICROLITRO ($10^3/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.....	70
FIGURA 29. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS TAXAS DE PRIMEIROS EVENTOS DE LINFOPÉNIA DOS DOENTES COM LNH B NOS GRUPOS DE TRATAMENTO COM QT, R E RQT NO DIAGNÓSTICO (T0) E NO PERÍODO DE SEGUIMENTO (T1-T5).	71
FIGURA 30. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS B POR MICROLITRO ($\text{N}/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.....	72
FIGURA 31. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS T POR MICROLITRO ($\text{U}/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.....	73
FIGURA 32. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS T CD4 ($\text{U}/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.	74
FIGURA 33. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE LINFÓCITOS T CD8 ($\text{N}/\mu\text{L}$) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E AO LONGO DO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS DOENTES TRATADOS COM R, QT E RQT.	75
FIGURA 34. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IGM SÉRICA (MG/DL) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E DURANTE O PERÍODO DE SEGUIMENTO DOS DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	76
FIGURA 35. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES MÉDIOS DE PCA (FATOR 1) DA DIFERENÇA DAS REATIVIDADES DE IGM EM T-T0 AO LONGO TO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS GRUPOS DE DOENTES COM LNH B DE TRATADOS COM QT, R E RQT.	77
FIGURA 36. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA ALTERAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IGG SÉRICA (MG/DL) NO MOMENTO DO DIAGNÓSTICO E DURANTE O PERÍODO DE SEGUIMENTO DOS DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	78
FIGURA 37. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS VALORES MÉDIOS DE PCA (FATOR 1) DA DIFERENÇA DAS REATIVIDADES DE IGG EM T-T0 AO LONGO TO TEMPO DE SEGUIMENTO NOS GRUPOS DE DOENTES COM LNH B DE TRATADOS COM QT, R E RQT.	78

FIGURA 38. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE EVENTOS DE INFEÇÕES BACTERIANAS OBSERVADAS DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTO E ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO ESTUDADOS NOS DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	79
FIGURA 39. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE EVENTOS DE INFEÇÕES VIRAIS BACTERIANAS OBSERVADAS DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTO E ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO ESTUDADOS NOS DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	80
FIGURA 40. REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO NÚMERO DE EVENTOS DE INFEÇÕES FÚNGICAS OBSERVADAS DURANTE O PERÍODO DE TRATAMENTO E ENTRE OS PERÍODOS DE TEMPO ESTUDADOS NOS DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	80

Índice de Tabelas

TABELA 1. FATORES EPIDEMIOLÓGICOS ASSOCIADOS AO AUMENTO DO RISCO DE APARECIMENTO DE LNH EM HUMANOS.....	5
TABELA 2. SINTOMAS DE REFERÊNCIA ASSOCIADOS A LNH.....	10
TABELA 3. LISTAGEM DE EXAMES DISPONÍVEIS REALIZADOS NO DECURSO DOS PROCEDIMENTOS ESSENCIAIS E OPCIONAIS PARA O DIAGNÓSTICO EXATO DE LNH B.....	11
TABELA 4. CLASSIFICAÇÃO DA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE DE LNH.....	12
TABELA 5. ESTADIAMENTO DOS LINFOMAS NÃO-HODGKIN: CLASSIFICAÇÃO DE ANN ARBOR.....	13
TABELA 6. ÍNDICE DE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL (IPI) APLICADO A LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B.....	14
TABELA 7. ÍNDICE DE PROGNÓSTICO INTERNACIONAL PARA LINFOMA FOLICULAR (FLIPI).....	14
TABELA 8. FÁRMACOS DE QUIMIOTERAPIA AGRUPADOS POR AÇÃO TERAPÊUTICA, USADOS NO TRATAMENTO DE LNH B.....	15
TABELA 9. MECANISMOS PROPOSTOS DE AÇÃO DAS ANTRACICLINAS EM CÉLULAS TUMORAIS.....	26
TABELA 10. MODALIDADES TERAPÊUTICAS DE REGULAÇÃO IMUNITÁRIA APLICADAS NO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS.....	34
TABELA 11. VOLUMES ADICIONADOS DE ANTICORPOS DE MARCAÇÃO LINFOCITÁRIA DE SUPERFÍCIE....	54
TABELA 12. CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E DEMOGRÁFICA DOS DOENTES COM LNHB PARTICIPANTES NO ESTUDO.....	64
TABELA 13. INSTANTES E PERÍODOS DE TEMPO ESTUDADOS E ABREVIATURAS CORRESPONDENTES, USADAS AO LONGO DO TEXTO.....	65
TABELA 14. TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL DO TOTAL DE DOENTES COM LNH B E POR GRUPO TERAPÊUTICO.....	65
TABELA 15. TAXAS DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE PRIMEIROS EVENTOS DE LEUCOPÊNIA EM CADA GRUPO TERAPÊUTICO DOS DOENTES COM LNH B EM CADA PERÍODO DE ESTUDO. Σ – DESVIO PADRÃO. .	68
TABELA 16. TAXA SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE PRIMEIROS EVENTOS DE LINFÓPÊNIA EM CADA GRUPO TERAPÊUTICO DE DOENTES COM LNH B ASSINALADOS EM CADA PERÍODO.....	70
TABELA 17. NÚMERO DE INFEÇÕES BACTERIANAS, VIRAIS E FÚNGICAS ASSINALADAS AOS LONGO DO PERÍODO T0'-T5' NOS DOENTES PERTENCENTES AOS GRUPOS DE TRATAMENTO COM R, QT E RQT.....	81
TABELA A 1. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LEUCÓCITOS ($N \times 10^3/\mu\text{L}$) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.....	102
TABELA A 2. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS TOTAIS ($N \times 10^3/\mu\text{L}$) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.....	102
TABELA A 3. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS B CD19 ($N/\mu\text{L}$) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.....	102
TABELA A 4. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD3 ($N/\mu\text{L}$) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.....	103

TABELA A 5. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 (N/μL) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	103
TABELA A 6. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 (N/μL) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	103
TABELA A 7. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IGM (MG/DL) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	104
TABELA A 8. TESTE DE KRUSKAL WALLIS PARA A COMPARAÇÃO DA RECUPERAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IGG (MG/DL) EM DOENTES COM LNH B TRATADOS COM R, QT E RQT.	104

Abreviaturas e convenções

5'-NT – 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5)

ACT – terapia celular adotiva (do inglês, *Adoptive Cell Therapy*)

ADA – adenosina desaminase (E.C. 3.5.4.4)

ADCC – Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (do inglês, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*)

AID – ativação induzida pela desaminase da citidina (do inglês, *Activation-Induced Cytidine Deaminase* (E.C. 3.5.4.5))

AMPS – persulfato de amônio (do inglês *amonium persulphate*)

AP-1 – proteína de ativação 1 (do inglês, *Activating Protein -1*)

APC – Aloficocianina

APC-H7 – Aloficocianina conjugada com fluorocromo H7

ATP – adenosina trifosfato

BCA – método do ácido bicinconínico (do inglês *Bicinchoninic Acid*)

BCIP – fostato dissódico 5-bromo-4-cloro-3-indolil (do inglês *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate disodium salt*)

BCL2 – linfoma de linfócitos B tipo 2 (do inglês, *B cell lymphoma 2*).

BCR – recetor de linfócitos B (do inglês, *B cell receptor*)

BTK - tirosina cinase de Bruton (do inglês, *Bruton's tyrosine kinase*)

BTK – tirosina cinase de Bruton (do inglês, *Bruton's tyrosine kinase*) (EC 2.7.10.2)

cAMP - adenosina monofosfato cíclico (do inglês, *cyclic Adenosin Monophosphate*)

CAR – receptor quimérico de antigénio (do inglês, *Chimeric Antigen Receptor*)

CAR – receptor quimérico de antigénios (do inglês, *Chimeric Antigen Receptor*);

CD – Grupamento de diferenciação (do inglês, *Cluster of Differentiation*)

CDC – citotoxicidade dependente do complemento (do inglês, *Complement-Dependent Cytotoxicity*).

CH₂FH₄ – metileno tetrahidrofolato

CHOP – ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina (adriamicina), oncovin (vincristina), e prednisona/prednisolona)

CNOP – ciclofosfamida, mitoxantrona, oncovina (vincristina), prednisona

CSR – recombinação de mudança de classe (do inglês, *Class Switch Recombination*)

CR – recetor do complemento (do inglês, *Complement Receptor*)

CTLA4 – antigénios associados a linfócitos T citotóxicos 4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4*)

CTLA4 – antígenos associados a linfócitos T citotóxicos tipo 4 (do inglês, *Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4*);

CVP – ciclofosfamida, vincristina, prednisona

dAdo – desoxiadenosina

dADP – desoxiadenosina difosfato

dAMP – desoxiadenosina monofosfato

dATP – desoxiadenosina trifosfato

dCK – desoxicitidina cinase (E.C. 2.7.1.74)

dCyt – desoxicitidina

DHFR – dihidrofolato redutase (E.C. 1.5.1.3)

dIno – desoxi-inosina

DLBCL – Linfoma B difusos de grandes células (do inglês, *Diffuse Large B Cell Lymphoma*)

DISC – Complexo de sinalização indutor de morte (do inglês, *Death-Inducing Signaling Complex*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTPs – desoxirribonucleótidos fosfatados (do inglês, *Deoxynucleoside Triphosphate*)

DOX – doxorubicina

dTMP – desoxitimidina fosfato

dUMP – desoxiuridina monofosfato

EBV – vírus Epstein-Barr

Fab – fração da imunoglobulina (ou anticorpo) de ligação ao antígeno (do inglês, *Fragment antigen binding*)

FADD – Proteína de domínio de morte associada a Fas (do inglês, *Fas-Associated protein with Death Domain*)

FC – fludarabina, ciclofosfamida

Fc – fração constante/cristalizável da imunoglobulina (ou anticorpo) (do inglês, *Fragment crystallizable*)

FcR – recetor Fc

FH2 – dihidrofolato

FH₄ – tetrahidrofolato

FITC – Fluoresceína-5-isotiocianato

FLIPI – Índice de prognóstico internacional para linfoma folicular (do inglês *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*)

FMC – fludarabina, mitoxantrona, ciclofosfamida

FSC – dispersão frontal (do inglês *Forward Scatter*)

GM-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos - macrófagos (do inglês, *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*)

GR – recetor de glucocorticoide (do inglês, *Glucocorticoid Receptor*)

HACA – anticorpos anti-quiméricos (do inglês, *Human Anti-Chimeric Antibodies*)

HAMA – anticorpos indesejados anti-murino (do inglês, *Human Anti-Mouse Antibodies*)

HSP – proteínas de acompanhamento de choque térmico (do inglês *Heat Shock Proteins*)

HTLV-1 – vírus da leucemia humana de células T do tipo I (do inglês, *Human T-Cell Leukemia Virus-1*)

IFN γ – Interferão gama (do inglês, *Interferon gamma*)

IARC – Agência Internacional para a Investigação do Cancro (do inglês, *International agency for research on cancer*)

Ig – imunoglobulina (ou anticorpo)

IgA – imunoglobulina A

IgD – imunoglobulina D

IgE – imunoglobulina E

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IPI – índice de prognóstico internacional (do inglês *International Prognostic Index*).

IPOFG – Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E.

Linfócitos NK – linfócitos *natural killer*

LNH – linfoma não Hodgkin

LNH B – linfoma não Hodgkin de linfócitos B

MAC – complexo de ataque à membrana (do inglês, *Membrane Attack Complex*)

MALT – tecido linfático associado à mucosa (do inglês, *Mucosa Associated Lymphoid Tissue*)

MBL – lectina de ligação a manose (do inglês, *Mannose-binding Lectin*)

MgCl₂·6H₂O – cloreto de magnésio hexahidratado

MTX – metotrexato

MTX_{Glu} – metotrexato poliglutamado

NAD⁺ – dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma oxidada)

NADH – dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

NADPH – fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (forma reduzida)

NBT – cloreto de nitrotetrazolio azul (do inglês *Nitrotetrazolium Blue Chloride*)

NF-kB – fator nuclear kB (do inglês, *Nuclear Factor-kB*)

NOS3 – óxido nítrico sintetase endotelial (E.C. 1.14.13.39)

PARP – poli ADP-ribose polimerase (E.C. 2.4.2.30)

PBMCs – células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*):

PBS – tampão fosfato salino (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PE – ficoeritrina

PerCP Cy5.5 – proteína de peridina clorofila conjugada com cianina Cy5.5,

PET – tomografia por emissão de positrões (do inglês, *Positron Emission Tomography*)

QT – quimioterapia

R – rituximab

RAG – genes ativadores da recombinação (do inglês, *Recombination Activating Gene*)

RBCL – tampão de lise de eritrócitos (do inglês *Red Blood Cell Lysis*)

RNA – ácido ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

RQT – rituximab + quimioterapia

SBP – proteína de ligação esteróide (do inglês, *Steroid-Binding Protein*)

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS -PAGE – eletroforese em gel de poli(acrilamida com dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecil Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SHM – hipermutação somática (do inglês, *Somatic Hypermutation*)

SSC – dispersão ortogonal ou lateral (do inglês *Side Scatter*)

TBS – tampão salino-tris (do inglês *Tris-buffered saline*)

TCR – receptor de linfócito T (do inglês, *T Cell Receptor*).

TEMED – N, N, N', N' - Tetrametiletilenodiamina

TLCK – N_α-Tosil-L-lisina clorometil cetona (do inglês *N_α-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride*)

TOPI – topoisomerase I (E.C. 5.99.1.2)

TOPII – topoisomerase II (E.C. 5.99.1.3)

TS – timidilato sintetase (E.C. 2.1.1.45)

WHO – Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*)

XDH – xantina oxidase (E.C.1.2.3.2)

Resumo

Modulação da função e do repertório das células T por linfócitos B: caracterização imunológica de doentes com linfoma não Hodgkin tratados com quimioterapia, com ou sem o anticorpo monoclonal anti-CD20, Rituximab

Linfoma não-Hodgkin B é um termo não-específico, que inclui várias doenças malignas linfoproliferativas com aparências clínica e histológica diferentes. Os doentes com LNH B apresentam períodos prolongados de mielo-imunossupressão após a quimioterapia, provocando um aumento do risco de infeções e possivelmente recorrência tumoral. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de rituximab, quimioterapia e rituximab+quimioterapia na reconstituição imunológica de 53 doentes com LNH B tratados no IPOLFG. A caracterização imunológica (leucócitos, subpopulações linfocitárias, níveis e reatividade de imunoglobulina) e clínica foram feitas no diagnóstico e periodicamente, até 13 meses após tratamento.

Os resultados mostraram significativa depleção de linfócitos B nos grupos tratados com rituximab e rituximab+quimioterapia até 7 meses de seguimento. Não foram observadas alterações estatísticas nas concentrações e reatividade das imunoglobulinas nem nos números de linfócitos T, ao longo dos 13 meses.

Este estudo não mostrou influência dos tratamentos com rituximab, quimioterapia e ambos no compartimento T.

Palavras-chave: Reconstituição imunitária; Linfócitos T, Linfoma não Hodgkin B

Abstract

B cell modulation of T cells function and repertoire: immune characterization of non Hodgkin lymphoma patients receiving chemotherapy, with or without the CD20 monoclonal antibody, Rituximab

Non-Hodgkin's lymphoma B is a non-specific term that includes various lymphoproliferative malignancies with different clinical and histological appearances. Patients with NHL B exhibit prolonged periods of myelo-immunosuppression after chemotherapy, causing an increased risk of infection and possibly tumor recurrence. The aim of this study was to evaluate the effect of rituximab, chemotherapy and rituximab+chemotherapy on immune reconstitution of 53 NHL B patients treated in IPOLFG. The immunological characterization (leukocyte, lymphocyte subpopulations and reactivity of immunoglobulin levels) and clinical were made at diagnosis and periodically, up to 13 months after treatment.

The results showed significant depletion of B lymphocytes in the groups treated with rituximab and rituximab+chemotherapy up to 7 months of follow-up. No statistical changes were observed in the concentrations and reactivity of immunoglobulins nor in numbers of T lymphocytes, over the 13 months.

This study showed no effect of treatment with rituximab, chemotherapy, or both on T compartment.

Key words: Immune reconstitution; T lymphocytes, B cell Non-Hodgkin lymphoma

1. Fundamento teórico

1.1. Linfomas não Hodgkin

Os linfomas não Hodgkin (LNH) ou linfomas de não Hodgkin representam um grupo heterogêneo de doenças linfoproliferativas malignas com diversas características biológicas e clínicas. Os LNH diferenciam-se dos linfomas de Hodgkin pela ausência de células de Reed-Sternberg e correspondem a 90% de todos linfomas (Küppers, 1998).

Os LNH apresentam distintas origens celulares, morfologia, imunofenótipo e alterações citogenéticas e moleculares. Os relatos de padrões de comportamento clínico e a resposta ao tratamento são também diversos (Evans, 2003).

Este grupo de doenças é originado nos tecidos linfáticos durante os diferentes estádios da diferenciação celular dos linfócitos B, T e NK. Estas células infiltram tipicamente os tecidos linfáticos e hematopoiéticos, podendo também estender-se a outros órgãos no processo denominado metastização (Hennessy, 2004; Shankland, 2012).

As fases do desenvolvimento linfocitário têm início nos órgãos linfáticos primários (medula óssea e timo) e posterior diferenciação nos tecidos linfáticos secundários (nódulos linfáticos, baço, tecidos linfáticos associados à mucosa (MALT), p.e. placas de Peyer) (Figura 1) (Cardoso, 2007).

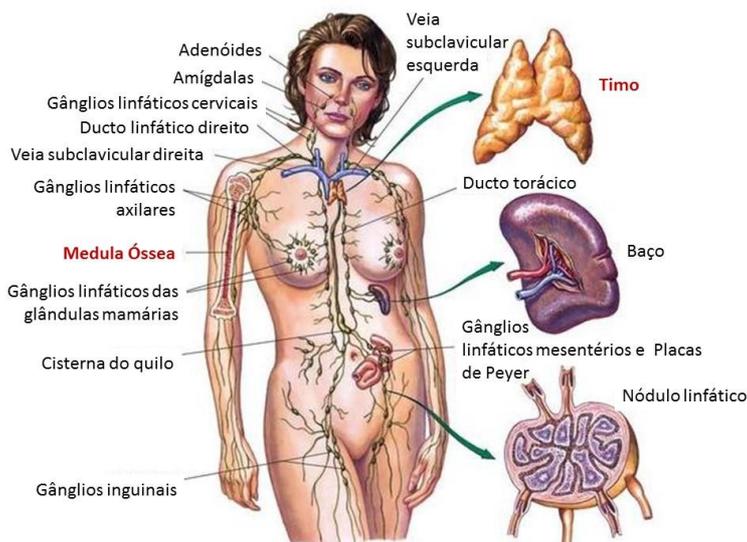


Figura 1. Distribuição dos órgãos e vasos linfáticos (Adaptado de <http://healthlifemedia.com> - último acesso: 01/08/2016).

O desenvolvimento dos linfócitos B e T inicia-se na medula óssea a partir das células estaminais hematopoiéticas. Ambas as populações linfocitárias completam o seu processo evolutivo através da passagem por diversos estágios e movimentações celulares correlacionados com eventos genéticos e alterações fenotípicas (Nogai, 2011; Shankland, 2012). Os múltiplos padrões de recombinação genética que têm lugar durante a maturação linfocitária B e o rearranjo dos genes do recetor de linfócitos T (TCR) constituem os processos suscetíveis a distúrbios que geram os distintos tipos de linfoma (Nogai, 2011; Shankland, 2012).

1.2. Epidemiologia

O relatório Globocan 2012 da Agência para a Investigação do Cancro (IARC) da Organização Mundial de Saúde (WHO) revelou que os LNH apresentaram uma incidência de 5,5 % e mortalidade de 2,8 % a nível mundial nesse ano (Ferlay, 2015). Estas percentagens traduzem os valores anuais de 14,0 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes resultantes desta patologia (Ferlay, 2013). As projeções feitas para 2035 revelam um aumento do número de novos casos anuais para cerca de 24,0 milhões e do número de vítimas mortais para 14,6 milhões (Ferlay, 2013). Este estudo divulgou que os LNH se situaram na 8ª posição das neoplasias mais diagnosticadas em homens (2,9%) e em 10º lugar nas neoplasias mais diagnosticadas em mulheres (2,4%) em todo o mundo no ano de 2012 (Figura 2) (Ferlay, 2015).

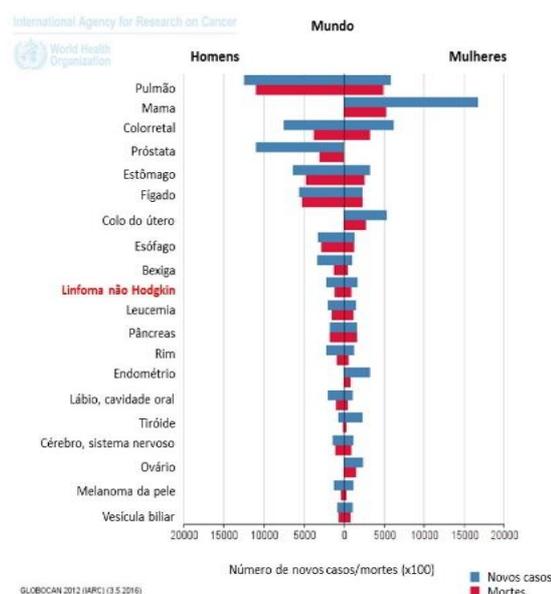


Figura 2. Registo epidemiológico do número de novos casos e número de mortes dos carcinomas mais frequentes no mundo em homens e mulheres no ano de 2012 (Ferlay, 2015).

As áreas com maior incidência de LNH incluem a América do Norte, a Europa, a Oceânia, e ainda vários países africanos (Figura 3), mostrando uma relação com os países mais desenvolvidos (Ferlay, 2015).

A ocorrência de LNH é superior em indivíduos do sexo masculino, cuja taxa mundial ajustada para a idade é de 6,0 novos casos para cada 100 000 habitantes em oposição à taxa mundial ajustada para a idade 4,1 novos casos para cada 100 000 habitantes registada em mulheres (Ferlay, 2015).

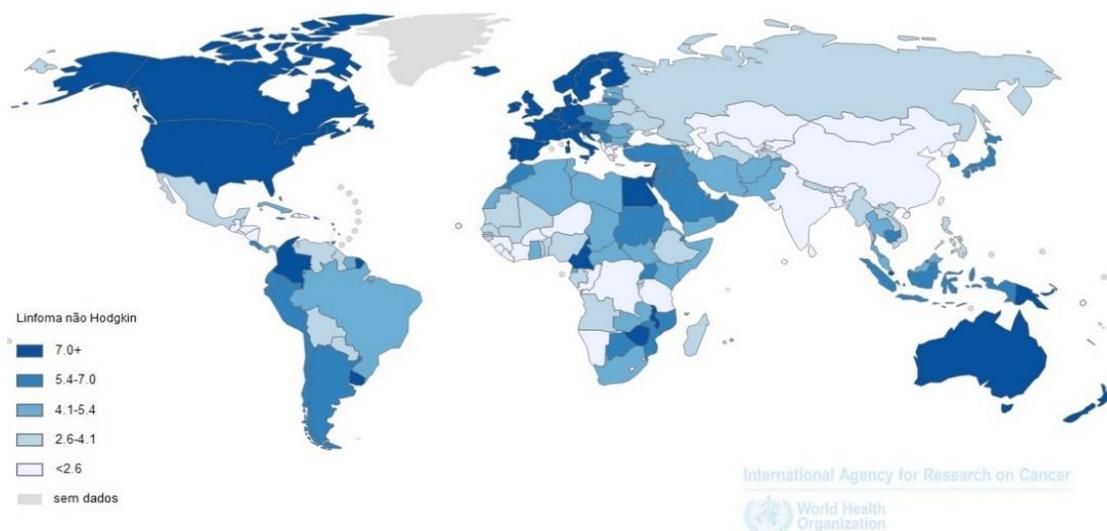


Figura 3. Ilustração da incidência e mortalidade de LNH no mundo relativa ao ano de 2012. Taxa padronizada para a idade/ 100 000 habitantes) (Ferlay, 2015).

Na Europa, Portugal foi o 6º país com maior número de mortes (685 eventos) e de novos casos de LNH (1842) no ano de 2012 (Figura 4 A). A mortalidade causada por LNH em Portugal coloca esta doença na 7ª posição dos cancros mais mortais (3% dos óbitos) e a incidência na 7ª posição, correspondendo a 4% dos novos caso de cancro diagnosticados em Portugal (Figura 4 B) (Ferlay, 2015). Os LNH ocupam também a 7ª posição no que respeita às neoplasias mais mortais a partir dos 60 anos de idade (Ferlay, 2015).

As estimativas calculadas para o ano de 2035 em Portugal correspondem a um aumento de 22,7% do número de novos casos diagnosticados e aumento de 35,8% do número de mortes causadas por LNH (Ferlay, 2015). Apesar destes resultados, a tendência no aumento de mortes por LNH observada durante a segunda metade do século XX, abrandou na Europa e em outras áreas desenvolvidas no início do presente século como consequência dos avanços no tratamento de alguns tipos de linfomas e nos avanços na terapia de suporte destes doentes (Bosetti, 2008).

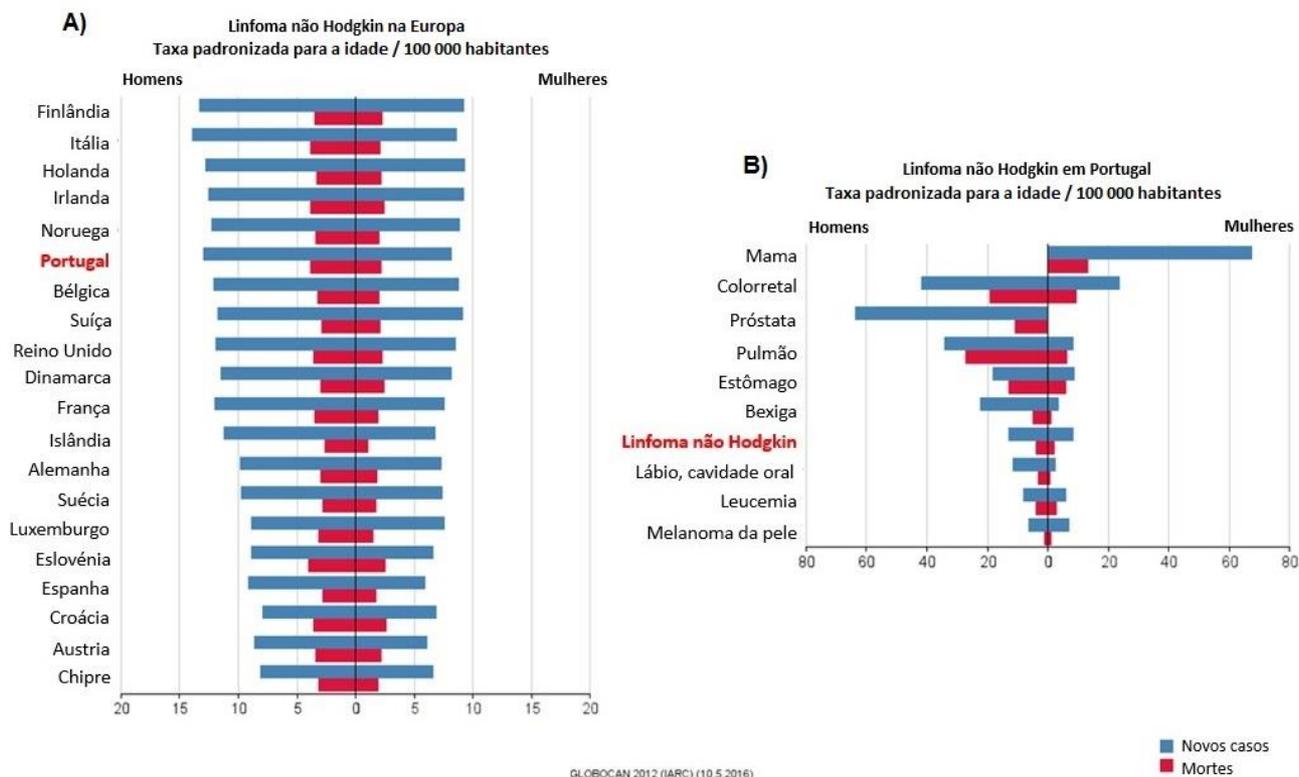


Figura 4. Gráficos da incidência e mortalidade de LNH em homens e mulheres no ano de 2012. A) Europa; B) Portugal. Taxas padronizada para a idade por 100 000 habitantes (Ferlay, 2015).

1.3. Etiologia dos LNH

As causas exatas dos LNH são desconhecidas, no entanto foram descritos alguns fatores de risco e foram encontradas associações relacionados a este tipo de doenças (Greer, 2013). A história familiar (Altieri, 2005; Wang, 2007), o sexo masculino (Fisher, 2004; Shankland, 2012) e idade superior a 60 anos são fatores de risco bem conhecidos (Ferlay, 2015). As principais associações de alguns tipos de LNH foram feitas com as infeções com o vírus Epstein-Barr, causador da mononucleose (Vockerodt, 2015); com o vírus do HIV, que está na origem da síndrome da imunodeficiência adquirida (Carbone, 2009), com a bactéria *H. pylori*, causadora de gastrite e úlceras gástricas (Hussell, 1993) e com o vírus da hepatite B, responsável pela infeção aguda ou crónica do fígado (Yood, 2007). A exposição a alguns compostos (Hoar, 1986; Morrison, 1994; Vineis, 2007) e o desempenho de determinadas profissões foram também correlacionadas com LNH (Blair, 1998; Mao, 2000; Wang, 2009). Na Tabela 1 estão reunidos alguns dos fatores epidemiológicos associados à ocorrência de LNH encontrados na literatura.

Tabela 1. Fatores epidemiológicos associados ao aumento do risco de aparecimento de LNH em humanos.

Imunodeficiência congênita	Imunodeficiência adquirida
Doenças autoimunes (artrite reumatoide, doença celíaca, lúpus eritematoso sistêmico e síndrome de Sjögren) (Boffetta, 2011);	Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Beral, 1991; Carbone, 2009);
Síndrome de Klinefelter (Humphreys, 1997);	Vírus linfotrópico da célula T humana (HTLV1) (Smith, 1991);
Imunodeficiência combinada severa (SCID) (Boffetta, 2011);	Vírus Epstein-Barr (EBV) (Vockerodt, 2015);
	Vírus do Herpes 8 (HHV8) (Cesarman, 1995);
	Vírus da hepatite B (HBV) (Yood, 2007);
	Vírus da hepatite C (HCV) (Saadoun, 2005);
	Bactéria <i>Chlamydia psittaci</i> (Husain, 2007);
	Bactéria <i>Borrelia burgdorferi</i> (Goodlad, 2000);
	Bactéria <i>Helicobacter pylori</i> (Hussell, 1993).
Género masculino (Fisher, 2004; Shankland, 2012)	
Idade (> 60 anos) (Ferlay, 2015)	
História familiar de LNH (Altieri, 2005; Wang, 2007)	
Anterior ocorrência de cancro (Boffetta, 2011)	
Transplante de órgãos (medula óssea, rim, coração, ...) (Opelz, 1993)	
Exposição a fármacos:	
Agentes imunossupressores, (Alexander, 2007)	
Antiácidos e antiulcerosos (Cimetidina) (Boffetta, 2011)	
Ansiolíticos (Benzodiazepina) (Boffetta, 2011)	
Medicação antiepiléptica (Boffetta, 2011)	
Medicação (Metotrexato) no tratamento de artrite reumatoide (Mariette, 2002)	
Vários antibióticos (Boffetta, 2011)	
Anterior terapia combinada em doentes com Linfoma de Hodgkin (List, 1986)	
História ocupacional	
<i>Exposição</i>	<i>Trabalho:</i>
Herbicidas (Hoar, 1986; Morrison, 1994)	Agricultura (Blair, 1998)
Pesticidas (Blair, 1998; Morrison, 1994)	Silvicultura (Blair, 1998)
Cola Epóxi (Mao, 2000)	Pintura (Wang, 2009)
Pó de madeira (Mao, 2000)	Carpintaria (Mao, 2000)
Solventes industriais (Vineis, 2007)	Bronzeamento (Wang, 2009)
Tintas para o cabelo (Fisher, 2004)	

1.4. Patogénese dos LNH

Os LNH resultam de uma proliferação progressiva de linfócitos B, T ou NK, causada pela acumulação de lesões que afetam proto-oncogenes ou genes supressores de tumores, com consequente imortalização das células (Greer, 2013). Cerca de 85% dos LNH são provenientes dos linfócitos B, sendo que os restantes 15% são derivados de linfócitos T e NK (Greer, 2013).

O desenvolvimento dos linfócitos B é iniciado na medula óssea com subsequente diferenciação nos órgãos linfáticos secundários. Durante estes estádios de maturação, ocorrem várias modificações no DNA que são essenciais para uma resposta imunitária adequada. Contudo, estas modificações podem predispor o aparecimento anomalias genéticas que conduzem à evolução do tumor (Nogai, 2011).

Na Figura 5 estão representados os LNH mais comuns durante as diferentes etapas do desenvolvimento e maturação linfocitária B e T.

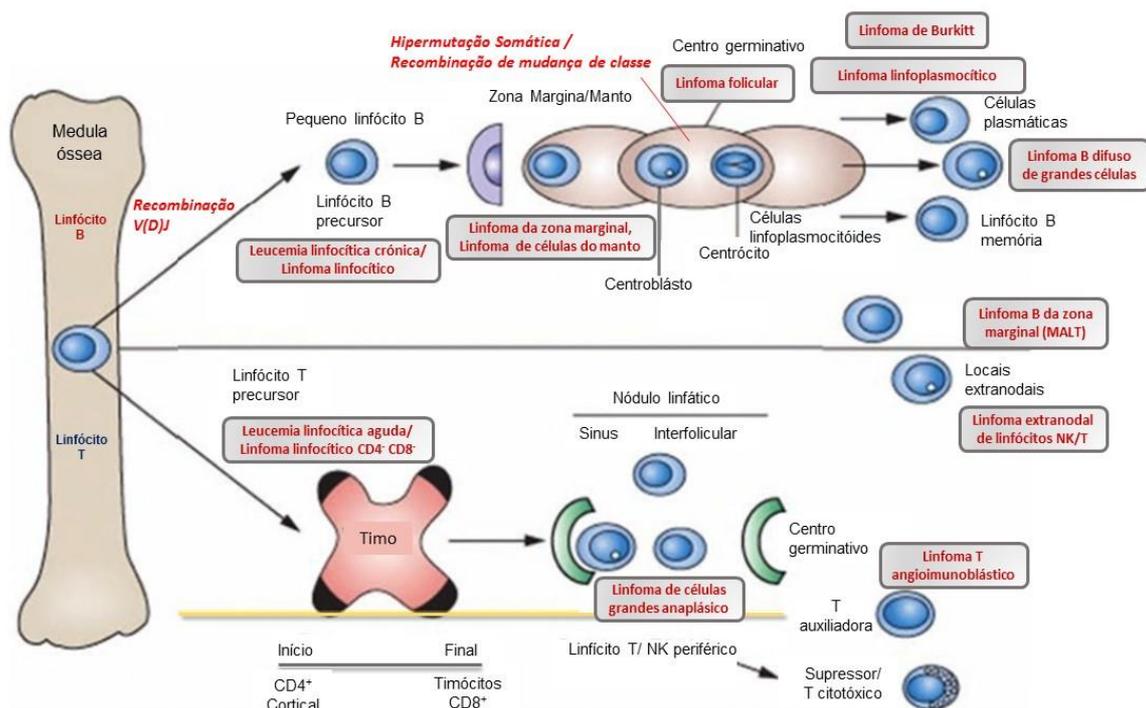


Figura 5. Representação esquemática das vias de diferenciação celular dos LNH B e T/NK mais comuns (Adaptado (Greer, 2013)).

A génese linfocitária B é iniciada na medula óssea pela recombinação aleatória dos genes que codificam as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves da IgM de

superfície para constituir um recetor de linfócitos B (BCR) funcionalmente ativo (Lenz, 2010). Durante este processo, apenas sobrevivem e sofrem diferenciação os linfócitos B cuja tradução das regiões variáveis das cadeias leves e pesadas constituem proteínas funcionais - linfócitos pré-B. Os linfócitos que não cumprem esta condição são eliminados por apoptose (Brack, 1978; Lam, 1997). Este processo é designado por recombinação V(D)J e envolve quebras da cadeia dupla de DNA através de enzimas ativadores da recombinação - RAG 1 e RAG 2 (Oettinger, 1990; Schatz, 1989). Os genes da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina (Ig) são formados a partir da recombinação genética dos segmentos V (variável), D (diversidade) e J (junção), enquanto a cadeia leve da Ig é formada a partir de segmentos genéticos V e J (Brack, 1978). Uma vez expresso o BCR sob a forma de IgM de superfície, os linfócitos B *naïve* abandonam a medula óssea migrando para os tecidos linfáticos secundários onde encontram antígenos que reconhecem e onde recebem um conjunto de sinais atribuídos pelos linfócitos T (Allen, 2007; Lenz, 2010) desencadeando a diferenciação dos linfócitos B maduros. Este processo denominado de expansão clonal ocorre no centro germinativo (Allen, 2007; Lenz, 2010), e está associado à expressão de IgM e IgD de superfície (Cardoso, 2007a).

O centro germinativo é a fonte de muitos tipos de linfoma (Allen, 2007; Lenz, 2010), sendo motivados pela modificação na cadeia de DNA que aí ocorrem: a hipermutação somática (SHM) e a mudança de classe (CSR). Ambas as reações são mediadas pela enzima citidina-desaminase (AID), específico de linfócitos B (Muramatsu, 2000). Estas reações ocorrem em linfócitos B em rápida proliferação (centroblastos) (LeBien, 2008) em resposta aos linfócitos T específicos de antígenos e às células dendríticas foliculares produtoras de antígenos (Lenz, 2010).

A SHM modifica a porção V das Ig por mutações que introduzem pequenas deleções, inserções ou pela substituição de um único nucleótido, produzindo anticorpos com maior ou menor afinidade para o antígeno constituindo os linfócitos B maduros (Goossens, 1998). Posteriormente, os linfócitos B maduros convertem-se em linfócitos B de memória (possibilitando uma resposta rápida em caso de exposição ao mesmo antígeno) ou em células plasmáticas (produtoras de anticorpos) (Conley, 2009; Janeway, 2001d).

A CSR ocorre por recombinação de DNA nas regiões de mudança altamente repetitivas localizadas na região 5' de cada região constante da imunoglobulina (Manis, 2002) estimulada no decurso de uma resposta imunitária por sinais externos tais como citocinas libertadas por linfócitos T ou sinais mitogénicos transmitidos por agentes patogénicos (LeBien, 2008). As porções do locus constante da cadeia pesada de anticorpo são removidas do cromossoma e os segmentos genéticos que circundam a

porção eliminada são reunidos para preservar um gene de anticorpo funcional que produz um anticorpo de isotipo diferente, mudando de classe de IgM para IgG, IgA, ou IgE (Janeway, 2001a). Neste processo a especificidade para o antígeno não é afetada, uma vez que a região variável permanece inalterada. Em vez disso, é mantida a afinidade para os mesmos antígenos, mas podendo interagir com diversas moléculas efetoras permitindo que células provenientes do mesmo linfócito B ativado produzam anticorpos de diferentes isotipos (Janeway, 2001a).

A recombinação V(D)J, a SHM e a CSR representam processos especialmente críticos que podem predispor a doenças malignas. Durante a recombinação V(D)J, podem ocorrer as translocações mediadas pelas proteínas RAG: t(14; 18) e t(11; 14) (Raghavan, 2004). A translocação t(14; 18) é detetada em 80-90% dos casos de linfoma folicular e numa fração dos casos de linfoma B difuso de grandes células (DLBCL). No caso de linfoma folicular, esta translocação causa a justaposição do gene BCL2 no cromossoma 18 à região de cadeia pesada de Ig transcricionalmente ativa no cromossoma 14 aumentando a produção da proteína BCL2 que previne apoptose (Bakhshi, 1985; Godon, 2003). De forma semelhante, a t(11; 14) justapõe o gene CCND1 ao locus V da cadeia pesada de Ig, conduzindo à sobre-expressão da ciclina D1 alterando a progressão do ciclo celular detetado no linfoma de células do manto (Nogai, 2011).

A contribuição da SHM na linfomagenese prende-se com a ação da AID na mutação de genes para além dos da cadeia pesada de Ig; sendo que BCL6 frequentemente afetado em DLBCL (Migliazza, 1995). Algumas mutações de BCL6 ocorrem num sítio de autorregulação negativo, aumentando a expressão de BCL6 e aliviando a autorrepressão da transcrição (Wang, 2002) O DLBCL pode também acumular mutações dependentes de AID em muitos outros genes, incluindo oncogenes tais como MYC e PIM1 (Pasqualucci, 2001). Estas mutações localizam-se entre 1 a 2 kb do início da transcrição e podem alterar a função da proteína. No entanto, a importância destas mutações é atualmente pouco clara, uma vez que também foram detetadas em células B do centro germinal normais (Liu, 2008).

Muitos doentes portadores de leucemia linfocítica crónica mantêm os genes da cadeia pesada da imunoglobulina mutados, enquanto cerca de 35% possuem genes IgV não mutados são associados com um pior prognóstico. A deleção do cromossoma 13q14, corresponde à mutação genética mais comum no diagnóstico, é considerada a lesão de iniciação que frequentemente resulta na disrupção dos locus supressores de tumores DIAU2, MIR15A, MIR16A (Gaidano, 2012)

Como a CSR também envolve a quebra das cadeias de DNA, os erros na regulação deste processo podem conduzir a translocações cromossómicas que são

frequentemente detetadas no linfoma de Burkitt, caracterizada pela desregulação do MYC no cromossoma 8, na maioria das vezes pela justaposição de MYC com o locus pesado de Ig no cromossoma 14 via translocação (8; 14). (Bergsagel, 1996; Nardini, 2000). Os casos de DLBCL são também caracterizados pela elevada expressão de AID e pela elevada frequência de translocações de mudança de classe (Lenz, 2007)

Os linfomas provenientes de linfócitos T e de linfócitos natural killer (NK) (p.e. linfoma extranodal de linfócitos NK/T tipo nasal) constituem neoplasias agressivas (Vose, 2008): Estes linfomas apresentam características morfológicas e imunofenotípicas complexas e muitas vezes sobrepostas, com ainda relativamente pouco conhecimento da sua patogénese molecular (Swerdlow et al., 2008). À semelhança dos linfomas B, os mecanismos que desencadeiam os linfomas T/NK ocorrem durante a normal maturação linfocitária (Figura 5). Os linfócitos neoplásicos partilham muitas características com as células homólogas normais, como o rearranjo de recetores de antigénios dos linfócitos T (TCR) (Korsmeyer et al., 1983) que se processa de forma semelhante à recombinação V(D)J que tem lugar nos linfócitos B (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001b). Também os genes dos TCR são locais onde frequentemente ocorrem translocações e em associação à exposição a fatores patogénicos como o vírus do linfoma de linfócitos T do adulto (HTLV-1) e o vírus Epstein-Barr (EBV) poderão estar entre as causas do surgimento destas neoplasias (Bajor-Dattilo, Pittaluga, & Jaffe, 2013).

1.5. Descrição clínica

Os sintomas descritos na maioria dos doentes com LNH variam de acordo com a localização e comprometimento funcional do órgão afetado e com a taxa de crescimento do tumor, no entanto, não são verificados quaisquer sintomas até que o órgão afetado cresça o suficiente (Ansell, 2015). Deve salientar-se que os sintomas associados aos LNH (listados na Tabela 2) podem frequentemente ser atribuídos a outras patologias pelo que os exames de diagnóstico são essenciais à correta identificação da doença (Ansell, 2015).

Tabela 2. Sintomas de referência associados a LNH.

- Linfadenopatia (> 1 cm e persistência > 6 semanas) (Evans & Hancock, 2003; Shankland et al., 2012);
- Hepatoesplenomegália (aumento do tamanho do fígado e do baço); (Evans & Hancock, 2003; Shankland et al., 2012);
- Sintomas atribuíveis à diminuição do número de células sanguíneas (citopenia) (Hauswirth et al., 2008);
- Envolvimento extranodal (Evans, 2003; Shankland, 2012);
- Sintomas B (Evans, 2003; Shankland, 2012):
 - Febre > 38 °C;
 - Sudorese noturna;
 - Perda de peso > 10 % nos 6 meses anteriores ao diagnóstico;
- Fadiga (Gould, 2011);
- Prurido (Gould, 2011);
- Falta de ar ou tosse (Gould, 2011);
- Hematomas (Gould, 2011);
- Infecções recorrentes (Gould, 2011);
- Dores ósseas (Gould, 2011);
- Dor abdominal (Gould, 2011);
- Pressão no peito (Gould, 2011);
- Indigestão (Gould, 2011);
- Sangramento excessivo (nasal ou menorragia) (Gould, 2011).

Nos linfomas de baixo grau, a apresentação clínica mais comum corresponde a adenopatias periféricas indolores e lentamente progressivas, esplenomegalia e hepatomegalia, podendo também apresentar sintomas constitucionais, também conhecidos como sintomas B (perda de peso > 10%, sudorese noturna e temperatura corporal > a 38 °C) - Tabela 2 (Evans, 2012).

A maioria dos doentes com linfomas de alto grau apresentam linfadenopatia volumosa e de rápido crescimento e mais de 1/3 dos doentes apresentam também envolvimento extranodal sendo comumente descritos sintomas B, fadiga e fraqueza (Evans, 2003; Gould, 2011; Shankland, 2012).

1.6. Diagnóstico e estadiamento

A análise detalhada do doente aliada aos exames complementares de diagnóstico são essenciais para escolha da terapêutica mais adequada a cada patologia. Esta análise tem em conta o estágio, o tipo da doença, a presença ou ausência de indicadores de prognóstico como o estadiamento da doença e os estudos laboratoriais

como análises/exames opcionais em caso de necessária clarificação adicional (Ansell, 2015).

Tabela 3. Listagem de exames disponíveis realizados no decurso dos procedimentos essenciais e opcionais para o diagnóstico exato de LNH B (Adaptado (Cheson, 2014)).

Procedimentos essenciais
<ul style="list-style-type: none">• Historial completo do doente, registo da taxa de crescimento, registo de sintomas, estado de atividade;• Exame físico detalhado, com especial atenção às áreas nodais incluindo o anel de Waldeyer;• Biópsia cirúrgica, permitindo a imunofenotipagem;• Procedimentos laboratoriais:<ul style="list-style-type: none">• Contagem total de células sanguíneas, incluindo a taxa de sedimentação de eritrócitos;• Concentrações séricas de lactato desidrogenase (LDH), cálcio, ácido úrico, fosfatase alcalina e proteínas; eletroforese de proteínas;• Avaliação das funções renal e hepática;• Aspirado de medula óssea para análise genética.• Estudos radiológicos:<ul style="list-style-type: none">• Radiografia torácica;• Tomografia computadorizada (TC) torácica e pélvico-abdominal.
Procedimentos opcionais (dependem do quadro clínico)
<ul style="list-style-type: none">• β_2 microglobulina;• Endoscopia, p.e. Linfoma MALT gástrico;• Radiografias panorâmicas, cintigrafia óssea ou ressonância magnética (RM);• Tomografia por emissão de positrões (PET);• RM da cabeça ou da espinal medula (sintomas neurológicos);• Análise de fluido cerebrospinal em doentes de risco.

O diagnóstico patológico dos LNH é atualmente baseado na classificação da organização mundial da saúde (WHO) de neoplasias linfáticas (Tabela 4) (Swerdlow, 2008). Esta classificação agrupa os linfomas em 4 principais categorias - neoplasias de linfócitos B e T precursores, neoplasias de linfócitos B maduros, neoplasias de linfócitos T / NK maduros e neoplasias associadas à imunodeficiência linfoproliferativa (Campo, 2011; Swerdlow, 2008). Os LNH são agrupados de acordo com o tipo de célula linfática que o originou (linfócitos B, T ou NK), o tamanho das células atingidas (pequenas, grandes ou mistas), o estágio da doença (inicial, intermediário, avançado ou terminal), extensão dos locais envolvidos (nodular ou difuso) e padrão imunofenotípico (Swerdlow, 2008). O modo simplificado de classificação divide os linfomas em dois grandes grupos:

indolentes e agressivos (Shankland, 2012). A cura de doentes com linfomas indolentes é menos provável do que nos doentes com formas agressivas em que o crescimento do tumor ocorre rapidamente. Esses últimos podem levar rapidamente ao óbito se não tratados, mas, em geral, são mais curáveis (Campo, 2011).

Tabela 4. Classificação da Organização Mundial da Saúde de LNH (Adaptado (Campo, 2011)) (Continua).

Origem celular do tumor	Tumor
Precusores de linfócitos B	Precursor leucemia/linfoma B-linfoblásticos* Leucemia linfocítica crónica de linfócitos B/ linfoma de pequenos linfócitos [†] Leucemia pró-linfocítica de células B [†] Linfoma linfoplasmocítico [†] Linfoma B da zona marginal (MALT)(± linfócitos vilosos) [†] Leucemia de células pilosas [†] Mieloma de células plasmáticas/plasmacitoma [†]
Linfócitos B maduros	Linfoma B da zona extranodal tipo MALT [†] Linfoma B da zona nodal marginal (± linfócitos B monocitoides) [†] Linfoma folicular [†] Linfoma de células do Manto [‡] Linfoma B difuso de grandes células* (incluindo Linfoma de Grandes Células B mediastínico (tímico) and Linfoma de efusão primária) Linfoma de Burkitt*
Precusores de linfócitos T	Precursor leucemia/linfoma T-linfoblásticos* Leucemia pró-linfocítica de células T [†] Leucemia linfocítica granular de células T* Leucemia agressiva de linfócitos NK* Leucemia/Linfoma de linfócitos T dos adultos* (HTLV 1-positivo) Linfoma extra-ganglionar de células NK/T, tipo nasal* Linfoma T tipo enteropático*
Linfócitos T e NK maduros	Linfoma Hepatosplenico de células T γ - δ * Linfoma subcutaneo de células T tipo paniculite* Micose fungóide/ Síndrome de Sézary [†] Linfoma Anaplásico de Grandes Celulas, T/null ou tipo primário cutaneo* Linfoma Anaplásico de Grandes Celulas, T/null ou tipo primário sistémico * Linfomas T periféricos, ainda não caracterizados* Linfoma de células T angioimunoblástico*

*Agressivos;

[†]Indolentes;

[‡]Indolente com progressão rápida;

± = com ou sem;

HTLV = vírus linfotrópico de células T humanas; MALT = tecido linfóide associado à mucosa; NK = natural killer.

Tabela 4. Classificação da Organização Mundial da Saúde de LNH (Adaptado (Campo, 2011)) (Conclusão).

Origem celular do tumor	Tumor
Doença linfoproliferativa associada a imunodeficiência	Doenças linfoproliferativas associadas a doenças imunes primárias Doenças linfoproliferativas associadas ao vírus da imunodeficiência humana Doenças linfoproliferativas pós-transplante

*Agressivos;

†Indolentes;

‡Indolente com progressão rápida;

± = com ou sem;

HTLV = vírus linfotrópico de células T humanas; MALT = tecido linfóide associado à mucosa; NK = natural killer.

Para identificar os doentes que mais provavelmente responderão ao tratamento, é usado o sistema de estadiamento de Ann Arbor (Rosenberg, 1977). Este sistema foi desenvolvido em 1971 predominantemente para os linfomas de Hodgkin, mas foi adaptada para definir a extensão do tipo de LNH em adultos (Tabela 5) (Rosenberg, 1977). Este estadiamento tem em conta o número de locais afetados, o envolvimento nodal ou extranodal, o local da doença, e a presença ou ausência de sintomas constitucionais. A recente incorporação da tomografia por emissão de positrões (PET) para o estadiamento do linfoma, tornou os sintomas constitucionais menos importantes, sendo sugerido recentemente a omissão dos sufixos A ou B para o linfoma não-Hodgkin (Cheson, 2014).

Tabela 5. Estadiamento dos Linfomas não-Hodgkin: classificação de Ann Arbor (Adaptado (Rosenberg, 1977)).

Estádio	Descrição
I	Envolvimento de uma única região nodal (IN) ou extranodal (IE)
II	Envolvimento de 2 ou mais regiões nodais ou estruturas linfáticas do mesmo lado do diafragma ou, ou com envolvimento de tecido ou órgão extralinfático limitado e contíguo (IIE)
III	Envolvimento de regiões nodais (> 2) em ambos os lados do diafragma (IIIN), ou extraganglionares: envolvendo o baço (IIIS), órgão ou tecido extralinfático limitado e contíguo (IIIE), ou ambos (IIIES ou IIINE)
IV	Focos de envolvimento disseminados em um ou mais órgãos ou tecidos extralinfáticos, com ou sem envolvimento linfático (IVNE)
A	Sem sintomas sistêmicos
B	Com sintomas sistêmicos: Febre > 38°C; sudorese noturna e perda de peso > 10% nos 6 meses que antecedem o diagnóstico
N	Envolvimento nodal/ganglionar
E	Envolvimento de tecido extranodal excluindo o fígado e medula óssea
S	Envolvimento do Baço

A determinação de fatores de prognóstico foi desenvolvida para os subtipos de linfoma mais comuns para estratificar e prever a sobrevivência em resposta ao tratamento (Solal-Celigny, 2006). Na Tabela 6 apresenta-se o índice de prognóstico internacional (IPI) atualmente usado para classificar linfomas difusos de grandes células B. A Tabela 7 representa o índice de prognóstico internacional para linfoma folicular (FLIPI) (Rosenberg, 1977).

Tabela 6. Índice de prognóstico internacional (IPI) aplicado a linfoma difuso de grandes células B (Adaptado (Rosenberg, 1977)).

Fatores

Idade > 60 anos
 Nível de LDH maior do que o limite superior do normal
 ECOG performance status ≥ 2
 Estádio de Ann Harbour III or IV
 Número de áreas nodais envolvidas > 1

Nº de fatores	Grupo de Risco	SG a 3 anos (%)
0-1	Baixo	91
2	Baixo - Intermédio	81
3	Alto - Intermédio	65
4-5	Alto	59

ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; LDH = lactato desidrogenase; SG= sobrevivência global

Tabela 7. Índice de prognóstico internacional para linfoma folicular (FLIPI) (Adaptado (Rosenberg, 1977)).

Fatores

Idade > 60 anos
 Nível de LDH maior do que o limite superior do normal
 Nível de hemoglobina < 12 g/dL *
 Estádio de Ann Harbour III or IV
 Número de áreas nodais envolvidas > 4

Nº de fatores	Grupo de Risco	SG a 5 anos (%)
0-1	Baixo	91
2	Intermédio	78
3-5	Alto	52

LDH = lactato desidrogenase; SG= sobrevivência global;

* Fator de conversão SI: Conversão de concentração de hemoglobina para g/L, multiplicar por 100.

1.7. Opções de tratamento em linfomas não Hodgkin B

1.7.1. QUIMIOTERAPIA

A quimioterapia utiliza fármacos antineoplásicos geralmente administrados por via oral ou via intravenosa que interferem com alguns passos essenciais do crescimento ou divisão celular. Os fármacos disponíveis não são específicos para as células neoplásicas pelo que, com frequência lesam os tecidos normais atuando como citostáticos – inibindo ou prevenindo a divisão celular - ou como citotóxicos – interferindo por vários mecanismos de ação com os ácidos nucleicos levando à destruição celular (Greer, 2013).

A quimioterapia é administrada em ciclos periódicos e alternados entre tratamento e repouso para permitir a recuperação das toxicidades frequentemente apresentadas. Cada ciclo de quimioterapia geralmente dura várias semanas (Priestman, 2012). A maioria dos tratamentos de quimioterapia é realizada em regime de ambulatório (no consultório médico, clínica ou hospital de dia), mas alguns podem exigir um internamento hospitalar, quer pela toxicidade inerente a esses regimes quer pelo fato de implicarem terapêutica contínua por diversos dias seguidos (Priestman, 2012). No tratamento de LNH é comum a combinação de vários fármacos, o número de fármacos, as doses, e a duração do tratamento dependerá do tipo e estágio do linfoma (Greer, 2013). Na Tabela 8 estão representados os fármacos de cada grupo terapêutico mais comumente usados para tratar LNH B estão resumidos na Tabela 8. A classificação dos fármacos apresentada neste trabalho baseia-se na ação principal de cada princípio ativo, já que alguns destes medicamentos podem apresentar propriedades de outras classes de medicamentos.

Tabela 8. Fármacos de quimioterapia agrupados por ação terapêutica, usados no tratamento de LNH B (Continua).

Ação terapêutica	Fármaco
Agente alquilantes	Ciclofosfamida (Hendry, 2004; Jaksic, 1997)
	Clorambucil (Jaksic et al., 1997; Summerfield, Taylor, Mounter, & Proctor, 2002)
	Bendamustina (Hagemeister & Manoukian, 2009; Visco et al., 2013)
	Ifosfamida (Moskowitz et al., 1999; Pohlman, 1996)
Glucocorticoides	Prednisona (Jaksic et al., 1997)
	Dexametasona (Moccia et al., 2010)
Análogos da platina	Cisplatina (Moccia et al., 2010)
	Carboplatina (Moskowitz et al., 1999)
	Oxaliplatina (Oki et al., 2005)

Tabela 8. Fármacos de quimioterapia agrupados por ação terapêutica, usados no tratamento de LNH B (Conclusão).

Ação terapêutica	Fármaco
Antimetabólitos	Citarabina (Visco, 2013)
	Gemcitabina (Moccia, 2010)
	Metotrexato (Jacomet, 1997)
Análogos da purina	Fludarabina (Hendry, 2004; Hochster, 1992) Cladribina (Saven, 1996)
Antraciclina	Doxorrubicina (Jaksic, 1997) Daunorrubicina (Tulpule, 2001)
Inibidores da Topoisomerase	Etopósido (Moskowitz, 1999) Mitoxantrona (Hendry, 2004; Saven, 1996)
Alcalóides da vinca	Vincristina (Jaksic, 1997)
	Vindesina (Gokbuget, 1997)

1.7.1.1. Agentes alquilantes – Crosslinking do DNA

Os agentes alquilantes foram uma das primeiras classes de medicamentos usados no combate ao cancro, no início na década de 40 (Greer, 2013)

Os agentes alquilantes ligam-se covalentemente aos grupos amino, carboxilo, sulfidriilo, e grupos de fosfato em moléculas celulares incluindo DNA, RNA e proteínas (Malhotra, 2003). Os efeitos citotóxicos e quimioterapêuticos estão diretamente relacionados com a alquilação do azoto na posição 7 da guanina. Os agentes alquilantes bifuncionais podem-se ligar a duas moléculas de guanina, originando a reticulação intra e entre cadeias de DNA impossibilitando a replicação e conduzindo à morte celular (Figura 6) (Lawley, 1967).

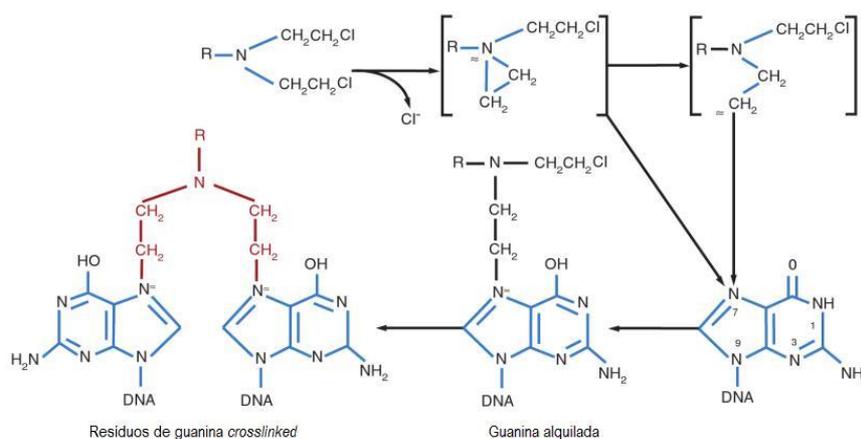


Figura 6. Mecanismos de ligação dos agentes alquilantes entre e intra cadeias de DNA (Adaptado (Greer, 2013)).

Os agentes alquilantes dependem da proliferação celular para a sua atividade mas não são específicos de uma fase do ciclo celular (Greer, 2013).

1.7.1.1.1. Efeitos secundários dos agentes alquilantes

Apesar dos agentes alquilantes partilharem de um mecanismo de ação comum, a toxicidade de cada agente varia significativamente devido a diferenças na farmacocinética, na solubilidade lipídica, nas propriedades do transporte membranar e na presença de mecanismos específicos de reparação do DNA (Colvin, 2003). Contudo, as toxicidades predominantes são a supressão medular e gastrointestinal (Colvin, 2003). A maioria dos doentes apresenta um aumento transiente da concentração de aminotransferases no soro, implicando estes agentes na causa de lesões idiossincráticas agudas no fígado (Colvin, 2003). Mais importante, os agentes de alquilação podem também causar síndrome de obstrução sinusoidal hepática (doença veno-oclusiva hepática) caracterizada pela hiperbilirrubinémia, hepatomegália e aumento de peso quando administrado em doses elevadas, e hiperplasia nodular focal do fígado (tumor benigno do fígado) regenerativa quando administrado por períodos prolongados (Greer, 2013).

1.7.1.2. Glucocorticoides – Indução da apoptose

Muitos cancros necessitam de hormonas específicas para o seu crescimento e manutenção da integridade celular. A alteração do balanço hormonal pode contribuir para a regressão tumoral nos doentes (Greer, 2013). O mecanismo de toxicidade dos glucocorticoides nos linfócitos é mediada via ligação aos recetores dos glucocorticoides (GR) que induzem a apoptose nas células sensíveis a estas hormonas (Inaba, 2012).

As vias de sinalização dos glucocorticoides atualmente descritas estão representadas na Figura 7.

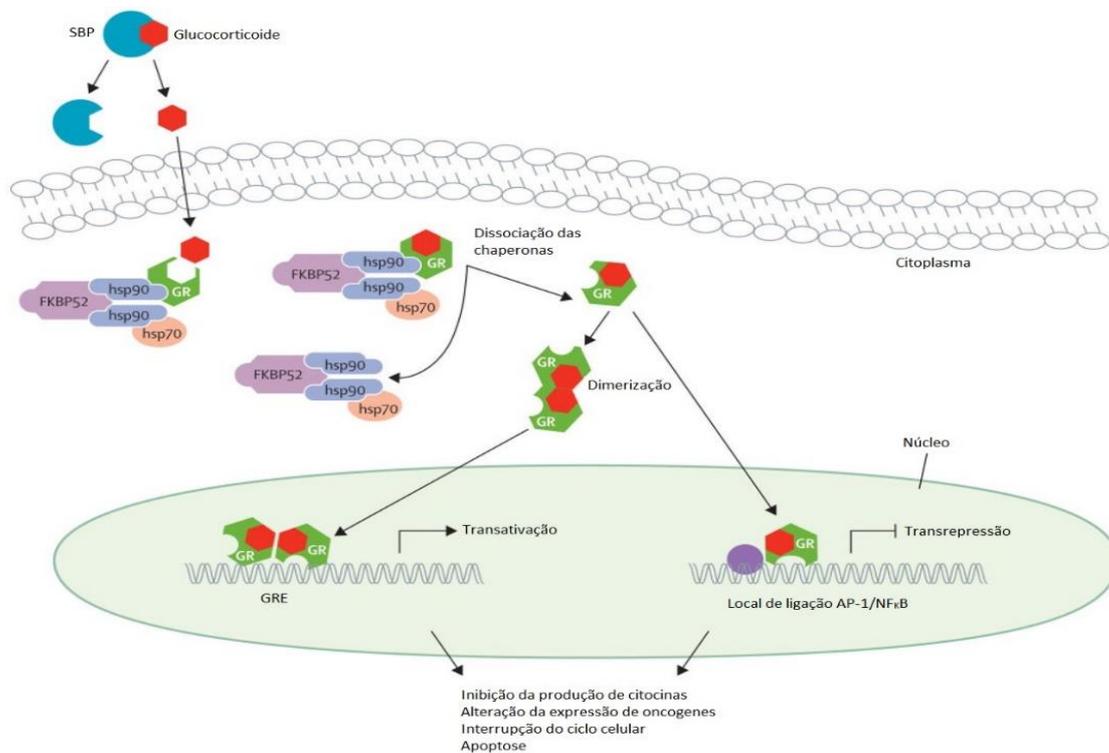


Figura 7. Via de sinalização dos glucocorticoides (Adaptado (Inaba, 2012)). AP-1/NFκB – proteína de ativação 1 /fator nuclear κB; FKBP52 – proteína de ligação à imunofilina FK52; GR – recetor de glucocorticoide; GRE – Elementos de resposta ao glucocorticoide; hsp – proteína de choque térmico.

O glucocorticoide libertado da proteína de ligação esteroide (SBP) no espaço extracelular entra na célula por difusão passiva devido ao seu tamanho, relativamente pequeno, e lipofilicidade. O GR não ligado forma heterocomplexos com proteínas de acompanhamento de choque térmico (HSP) 90 e 70 e com a co-proteína de acompanhamento imunofilina FK506 (família de ligação a que pertence a imunofilina FKBP52) ligadas às proteínas de ligação FKBP52 - necessárias a uma ligação ótima aos glucocorticoides. Após a ligação, o GR dissocia-se das suas co-proteínas de acompanhamento (chaperonas). O GR pode dimerizar e interagir com elementos de resposta ao glucocorticoide para induzir a transativação de genes (p.e. RNA polimerase II) (van der Velden, 1998) ou podem permanecer monómeros e interagir com fatores de transcrição tais como a ativação de proteína-1 (AP-1) ou o fator nuclear-κB (NF-κB) (transrepressão) (Figura 7) (Ray, 1994; Tissing, 2003).

Ambos os processos inibem a produção de citocinas, alteram a expressão de vários oncogenes, e induzem a interrupção do ciclo celular, induzindo a apoptose (McKay, 2003).

1.7.1.2.1. Efeitos secundários dos glucocorticoides

Os doentes tratados com glucocorticoides apresentam, frequentemente aumento do apetite, obesidade centrípeta (gordura localizada na região do tronco e do abdómen), imunossupressão, miopatia, osteoporose, necrose assética do osso, úlceras pépticas, pancreatite, desordens psiquiátricas, cataratas, hipertensão, desenvolvimento de diabetes, diminuição da taxa de crescimento em crianças, amenorreia, deficiente cicatrização e atrofia dos tecidos subcutâneos (Greer, 2013; Schäcke, 2002). No entanto, muitos destes efeitos tóxicos são somente observadas durante terapia de longo prazo (Schäcke, 2002).

1.7.1.3. Análogos da platina – *Crosslinking* do DNA

Os análogos da platina (Figura 8), são complexos de metais pesados que induzem a morte das células tumorais por ligação às cadeias de DNA de uma forma análoga aos agentes alquilantes. Os intermediários da platina causam *crosslinking* intra e inter cadeias de DNA formando adutos de DNA, causando a inibição da síntese de DNA, RNA e proteínas (Malhotra, 2003) .

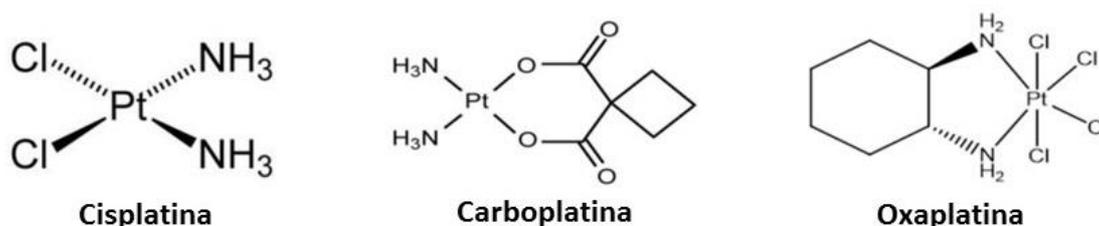


Figura 8. Estrutura química de alguns análogos da platina (Adaptado (Dasari, 2014)).

A título de exemplo é apresentado na Figura 9 o mecanismo de ação da cisplatina. A cisplatina ao atingir a célula, encontra diversos obstáculos antes da ligação ao DNA nuclear (Fuentes, 2003). A cisplatina é ativada uma vez que entra na célula: após a administração intravenosa no paciente, a cisplatina difunde-se rapidamente para os tecidos e liga-se às proteínas do plasma. Para que ocorram interações com o DNA, a cisplatina neutra é ativada através de uma série de reações espontâneas, que envolvem a substituição sequencial dos ligandos cloro da cisplatina por moléculas de água (Dasari, 2014). Este produto hidrolisado é um eletrófilo potente que reage com qualquer

nucleófilo, incluindo os grupos sulfidrilo em proteínas ou os átomos doadores de azoto em ácidos nucleicos. A cisplatina liga-se ao centro reativo N7 dos resíduos de purina e, como tal, pode causar danos no DNA das células, bloqueando a divisão celular e resultando na morte celular por apoptose (Dasari, 2014).

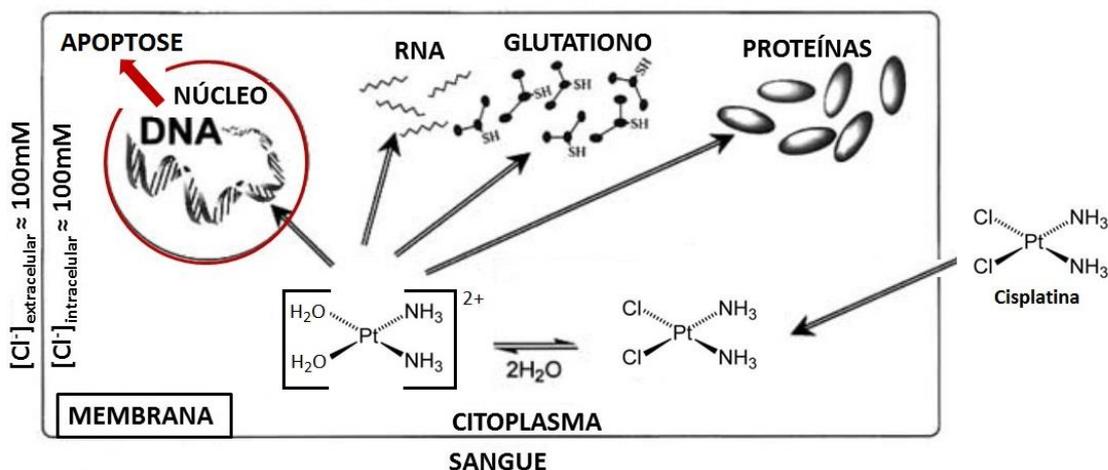


Figura 9. Representação esquemática da reatividade da cisplatina e dos obstáculos encontrados antes de atingir a molécula de DNA (Adaptado (Fuentes, 2003)).

1.7.1.3.1. Efeitos secundários dos análogos da platina

As toxicidades mais comuns observadas no tratamento de doentes com análogos da platina são: náuseas e vômitos, sendo que a mielossupressão (leucopénia ou neutropénia) é raramente observada. No entanto, o tratamento com cisplatina tem sido associado a casos de nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade (Greer, 2013).

Os perfis de toxicidade da carboplatina diferem da cisplatina, apresentando mielossupressão limitante da dose. As toxicidades renais verificadas com a cisplatina, não são frequentes após a administração de carboplatina, no entanto a neuropatia periférica ainda é verificada. As náuseas e vômitos após a carboplatina são usualmente fracas a moderados (Priestman, 2012).

A oxaliplatina resulta em neurotoxicidade aguda e crónica. A neuropatia sensorial periférica reversível e cumulativa é o principal fator limitante da dose de oxaliplatina. As toxicidades hematológicas e gastrointestinais ocorrem, mas são fracas a moderadas (Dasari, 2014; Greer, 2013).

1.7.1.4. Antimetabólitos – Interferência na fase S

Os antimetabólitos são compostos estruturalmente semelhantes a substâncias que ocorrem naturalmente, tais como vitaminas, purinas ou pirimidinas, nucleósidos ou aminoácidos (Malhotra, 2003). Em geral, os antimetabólitos interagem com enzimas celulares numa das seguintes maneiras: (i) substituição de um metabolito que é normalmente incorporado uma molécula-chave, tal como DNA ou RNA; (ii) competição com um metabolito normal para a ocupação de um sítio catalítico num enzima chave; (iii) competição com um metabolito, que atua num enzima importante ou num recetor regulador (Malhotra, 2003).

A maioria dos antimetabólitos têm sua maior atividade durante a fase S (fase de replicação de DNA), e sua atividade antineoplásica é mais eficaz em tumores que têm uma elevada taxa de crescimento (Grem, 2005). Os antimetabólitos têm uma curva de dose-resposta não-linear. Deste modo, depois de uma certa dose, não são mortas mais células, apesar de doses crescentes (fluorouracilo [5-FU] é uma exceção) (Grem, 2005). Os antimetabólitos podem ser divididos em análogos do ácido fólico, análogos da purina, pirimidina, adenosina e ureias substituídas. O metotrexato - análogo do ácido fólico (Figura 10), é uma molécula necessária à produção de nucleótidos, comumente usado como tratamento de LNH em associação com outros fármacos (Malhotra, 2003).

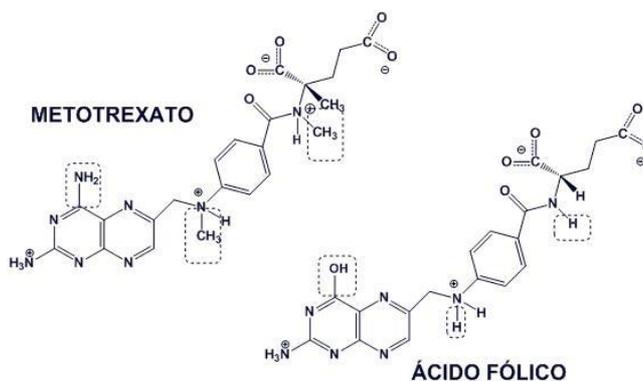


Figura 10. Estrutura química do ácido fólico e do antimetabólito correspondente, metotrexato (Adaptado de <http://www.info-farmacia.com> - último acesso: 06/08/2016).

O metotrexato atravessa a membrana celular por transporte passivo, com onde é poliglutamado (MTX_{Glu}) causando a inibição competitiva do enzima dihidrofolato redutase interrompendo a transformação de dihidrofolato (FH_2) em tetrahydrofolato (FH_4), um co-fator necessário à transferência de carbono em muitas reações metabólicas envolvido na biossíntese de purinas constituintes de DNA e RNA. O metileno tetrahydrofolato (CH_2FH_4) é formado a partir de FH_4 pela adição de uma ponte

de metileno de um dador de carbono. A inibição da produção do cofator FH_4 , também envolvido na síntese de TTP timidina trifosfato a partir de dTMP (desoxitimidina fosfato) a partir de dUMP (desoxiuridina fosfato) pelo enzima timidilato sintetase (TS), inibe a síntese do DNA necessária a todas as células em divisão conduzindo à morte celular (Cronstein, 1997) (Figura 11).

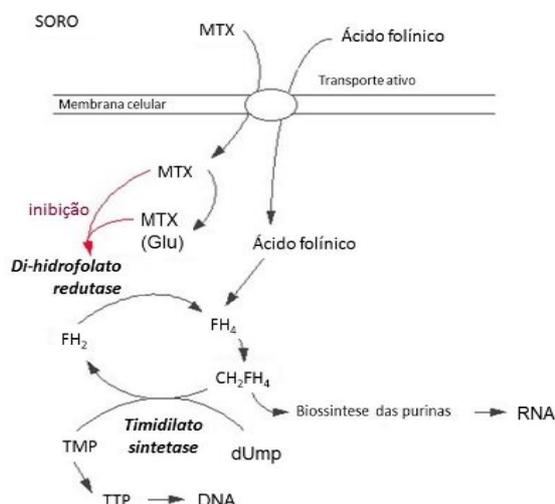


Figura 11. Representação do mecanismo de ação do metotrexato (MTX) (Adaptado de <https://dereflection.wordpress.com/2014/11/14/artritis-reumatoide-acercamiento-farmacologico/> - último acesso: 05/08/2016). DHFR - dihidrofolato reductase; dTMP – desoxitimidina fosfato; dUMP – desoxiuridina monofosfato; FH_2 – dihidrofolato; FH_4 – tetra-hidrofolato; TS - timidilato sintetase; TTP - timidina trifosfato.

1.7.1.4.1. Efeitos secundários dos antimetabólitos

Os antimetabólitos apresentam de forma característica, uma concentração-limiar abaixo da qual produzem baixa citotoxicidade e a concentração necessária para a citotoxicidade diminui com o aumento da duração da exposição (Grem, 2005).

As toxicidades primárias associadas ao metotrexato são a mielossupressão e mucosite (Grem, 2005). A toxicidade associada a altas doses pode resultar em falência renal. A administração crónica de metotrexato está associada a doenças hepáticas manifestada por fibrose portal e casos ocasionais de cirrose (Greer, 2013). O metotrexato está também associado ao desenvolvimento de toxicidade pulmonar e à toxicidade do sistema nervoso central (Greer, 2013).

1.7.1.5. Análogos da purina – Interferência na síntese de DNA

Os análogos da purina são moléculas que mimetizam a estrutura metabólica das purinas, sendo considerada uma subclasse dos antimetabólitos (Figura 12). Para compreender a ação citotóxica dos análogos de purina, é primeiro necessário considerar certos aspectos do metabolismo dos nucleósidos. De forma resumida, todas as células mantêm um *pool* de desoxinucleótidos (dNTPs) para a síntese de DNA. Os dNTPs existem em estado de equilíbrio dinâmico com os desoxinucleótidos não-fosforilados correspondentes. Por exemplo, os análogos da desoxiadenosina (dAdo) estão continuamente a ser fosforilados para desoxiadenosina trifosfato (dATP) via desoxiadenosina-monofosfato (dAMP) e desoxiadenosina difosfato (dADP). Por outro lado, a dATP é desfosforilada para dAdo através dos mesmos intermediários (Figura 13 A). O enzima adenosina desaminase (ADA) desempenha um papel crítico para limitar a acumulação intracelular de dATP, que é citotóxica em concentrações elevadas e potente inibidor da síntese de DNA (Pettitt, 2003). Os passos limitantes deste processo são catalisados pelo desoxicitidina-cinase (dCK) e pelo 5'-nucleotidase (5'-NT). Em células linfáticas, as atividades relativas de dCK e 5'-NT favorecem fortemente a fosforilação de desoxiadenosina (dAdo) para dATP. A dAdo pode também ser convertida em desoxi-inosina (dIno) pela ação do adenosina-desaminase (ADA). A desoxi-inosina (dIno) é então convertida sequencialmente para hipoxantina, xantina e finalmente ácido úrico. O ADA desempenha um papel crítico para limitar a acumulação intracelular de dATP (Plunkett, 1997).

A desoxicitidina (dCyt) compete com análogos da dAdo (p.e. cladribina) (Figura 12 C) ou pentostatina (Figura 12 D) pela fosforilação por dCK (desoxicitidina cinase), na tentativa de prevenir a citotoxicidade. A acumulação de dATP e seus análogos inibem a reparação das quebras de DNA, resultando assim na acumulação destes compostos. As quebras no DNA ativam o poli ADP-ribose polimerase (PARP), que liga covalentemente resíduos de ADP-ribose a uma variedade de proteínas, incluindo em si própria, e histonas utilizando NAD⁺ como um substrato causando a depleção de NAD⁺ e exaustão do consumo de ATP e conduzindo à apoptose (Seto, 1985) (Figura 13 B).

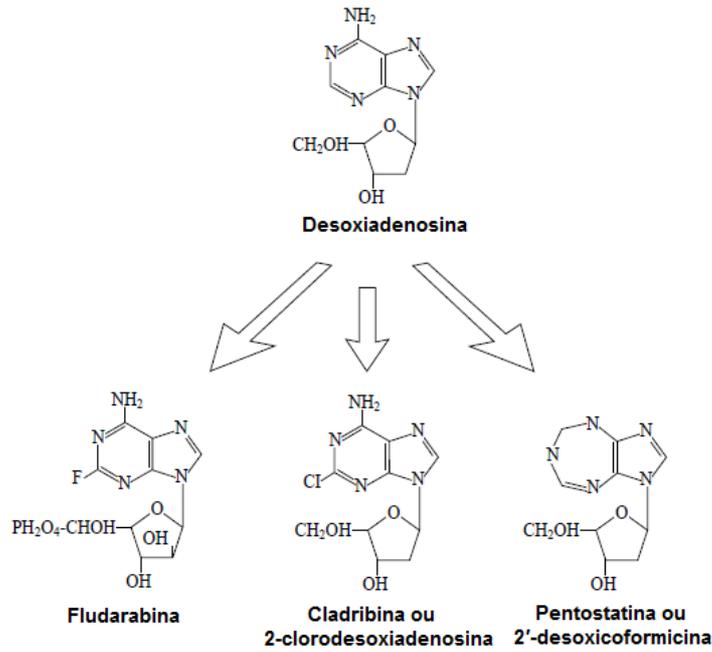


Figura 12. Estrutura da desoxiadenosina e dos respectivos análogos usados no tratamento de NHL B (Adaptado (Greer, 2013)).

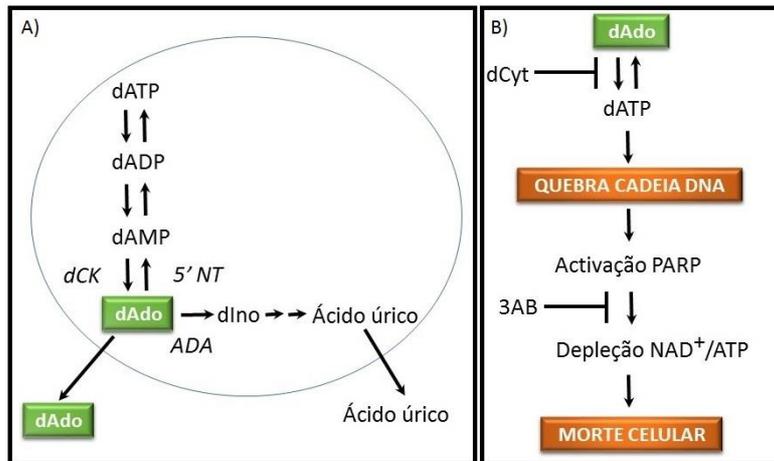


Figura 13. Mecanismo quimioterapêutico dos análogos da desoxiadenosina em células linfocitárias quiescentes. A) Equilíbrio dinâmico entre os desoxinucleotídeos e desoxinucleotídeos fosforilados correspondentes da desoxiadenosina (dAdo); B) Modelo proposto de citotoxicidade dos análogos da purina (Adaptado (Seto, 1985)). 5' NT - 5'-nucleotidase; ADA - adenosina-desaminase; dAdo – desoxiadenosina; dADP – desoxiadenosina difosfato; dAMP - desoxiadenosina-monofosfato; dATP - desoxiadenosina-trifosfato; dCK - desoxicidina-cinase; dCyt – desoxicidina; dIno - desoxi-inosina; PARP - poli ADP-ribose polymerase.

1.7.1.5.1. Efeitos secundários dos análogos da purina

A administração de análogos da purina promove com frequência a ocorrência de náuseas, vômitos e diarreias, especialmente após administração em regimes de alta dose (Pettitt, 2003). A mielossupressão também é comum e a sua reversão da é rapidamente obtida com a descontinuação do agente (Pettitt, 2003). De forma menos comum podem ser observadas fibroses pulmonares, hepatotoxicidade, febre e ulceração das pernas. A mucosite gastrointestinal e estomatite são mais comuns em adultos (Greer, 2013).

1.7.1.6. Antraciclinas – Intercalação e inibição do DNA, perturbação das topoisomerases e formação de ROS

As antraciclinas são compostos anticancerígenos que foram originalmente derivados da espécie bacteriana *Streptomyces peucetius*. As atividades antitumorais das antraciclinas foram estabelecidos na década de 60' e são uns dos fármacos antineoplásicos mais eficazes e cruciais no tratamento de alguns LNH (Weiss, 1992).

As antraciclinas apresentam uma estrutura comum constituídas por um anel tetracíclico unido por uma ligação glicosídica ao amino-açúcar (Figura 14) (Raj, 2014).



Figura 14. Estrutura química da daunorrubicina e doxorubicina (Adaptado de <http://www.scielo.br> - último acesso: 17/08/2016).

O mecanismo pelo qual as antraciclinas combatem o cancro ainda não é completamente claro e múltiplos caminhos são propostos. A Tabela 9 apresenta os diversos mecanismos pelos quais as antraciclinas poderão exercer a sua ação antineoplásica.

Tabela 9. Mecanismos propostos de ação das antraciclinas em células tumorais.

Mecanismos de ação
Intercalação entre bases de DNA (Chaires, 1996)
Inibição da síntese de macromoléculas (Jannazzo, 2008)
Formação de ROS (Doroshov, 1983)
Formação de danos no DNA e peroxidação lipídica (Minotti, 1996)
Ligação ao DNA e alquilação (Spencer, 2008)
Efeitos diretos na membrana (Swift, 2007)
Danos no DNA via inibição da topoisomerase II (Zunino, 1990)
Indução da apoptose (Palmer, 1994)

A doxorubicina (nome comercial: adriamicina) é utilizado no tratamento de vários cancros, incluindo o LNH B e apresenta dois mecanismos propostos pelos quais doxorubicina atua na célula cancerosa (i) intercalação no DNA e perturbação das topoisomerases (ii) formação de radicais livres e consequente ação nas membranas celulares, DNA e proteínas (Thorn, 2012). A Figura 15 representa estes estes dois mecanismos de ação na célula neoplásica.

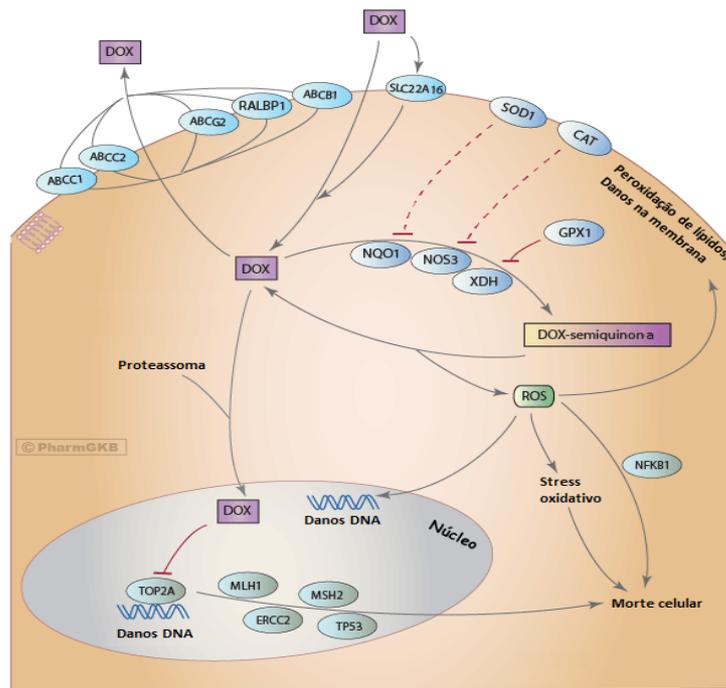


Figura 15. Representação dos dois principais mecanismos de ação da doxorubicina numa célula neoplásica (Adaptado (Thorn, 2012)). DOX- doxorubicina; a azul estão representados os genes possivelmente envolvidos na farmacodinâmica da DOX.

Ao entrar no citoplasma por difusão passiva, a doxorubicina liga-se aos proteassomas no citoplasma para os quais tem uma afinidade elevada, atingindo

concentrações intracelulares que excedem o compartimento extracelular em 10-500 vezes (Tacar, 2013). O complexo fármaco-proteassoma é posteriormente translocado para o núcleo onde apresenta uma afinidade 50 vezes superior ao do citoplasma. A doxorrubicina liga-se a enzimas associados à síntese de DNA como as TOPI e TOPII e pode intercalar com os pares de bases de dupla hélice de DNA (Tacar, 2013) provocando danos citotóxicos e antiproliferativos resultando na não correção do superespiralamento do DNA, impedindo os enzimas de se ligarem novamente às cadeias de DNA previamente cortadas e não reparadas (Tewey, 1984). A via da apoptose é desencadeada quando, a tentativa de reparar as quebras no DNA é falhada e o crescimento celular é inibido nas fases G1 e G2. Ao intercalar com o DNA, dá-se a inibição dos DNA e RNA polimerases cessando a replicação do DNA e transcrição do RNA (Tacar, 2013).

A doxorrubicina pode sofrer uma redução de um elétron por várias oxidoredutases para formar um radical doxorrubicina-semiquinona. Estas enzimas presentes no retículo sarcoplasmático e mitocôndrias incluem NADH desidrogenases bem com enzimas citosólicas: NADPH-desidrogenase (NQO1), xantina oxidase (XDH) e óxido nítrico sintetase endotelial (NOS3). A reoxidação do radical doxorrubicina-semiquinona de volta a DOX pode levar à formação de ROS e peróxido de hidrogénio. As espécies reativas de oxigénio (ROS) causam stresse oxidativo levando também à morte celular por indução de danos no DNA na membrana celular (Tewey, 1984).

1.7.1.6.1. Efeitos secundários das antraciclinas

As antraciclinas desempenham um papel indiscutível no tratamento de muitas doenças neoplásicas, no entanto a administração crónica de antraciclinas induz cardiomiopatia e insuficiência cardíaca congestiva dependente da dose (Minotti, 1996). A mielossupressão é descrita com frequência em doentes submetidos a este tratamento. Outras toxicidades sistémicas agudas incluem náuseas vómitos, alopecia e mucosite. As antraciclinas causam reações severas nos tecidos se houver extravasamento durante a infusão (Greer, 2013).

1.7.1.7. Inibidores das topoisomerases – Inibição das TOP I e TOP II

As topoisomerases constituem uma família de enzimas nucleares essenciais para todas as células vivas. A estrutura em dupla hélice do DNA é periodicamente desenrolada no processo de replicação durante a divisão celular, durante a produção de proteínas ou reparação de danos ocorridos. A topoisomerase I promove a quebra de uma das cadeias de DNA e permite a rotação da cadeia cortada sobre a cadeia intacta, de forma a reduzir a tensão torcional da molécula, causada pela replicação, transcrição e remodelagem da cromatina (Staker, 2002).

A topoisomerase II induz a quebra das duas cadeias do DNA, reduzindo a tensão torcional no DNA durante a replicação e condensação dos cromossomas no núcleo durante a divisão da célula. A quebra é momentânea e a reparação do DNA é feita pela mesma topoisomerase. A função de religação da topoisomerase II pode ser bloqueada por inibidores dessa enzima e, como consequência, a topoisomerase II é convertida numa toxina que conduz ao aumento dos níveis de quebras associadas a proteínas transitórias no genoma de células tratadas. O período em que as duas cadeias permanecem quebradas é mais longo e geralmente leva as células a ativarem a via apoptótica especialmente nas células neoplásicas, uma vez que estão em divisão acelerada (Figura 16) (Thakur, 2011).

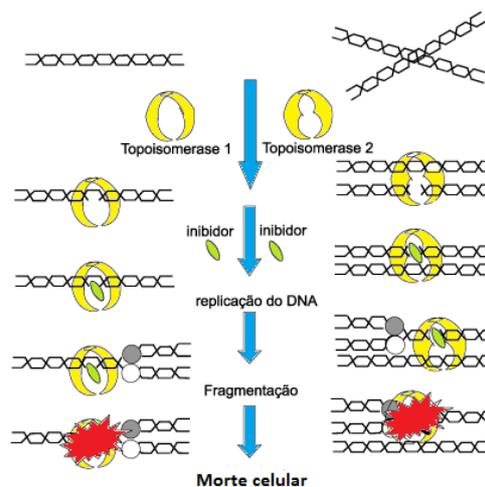


Figura 16. Esquema representativo do mecanismo dos inibidores das topoisomerases I e II nas células neoplásicas (Adaptado de <http://www.scielo.br> - último acesso: 01/08/2016).

Dois exemplos de inibidores da topoisomerase II usados na terapêutica de LNH são etopósido e a mitoxantrona (Figura 17).

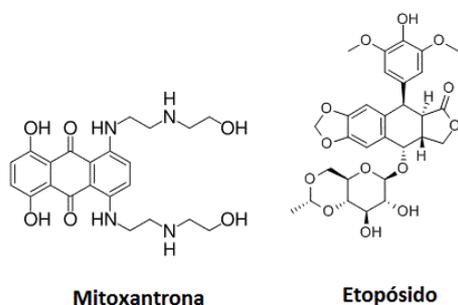


Figura 17. Estruturas químicas dos fármacos inibidores das topoisomerases II usados no tratamento de LNH (Adaptado de <http://www.chemicalbook.com> - último acesso: 11/08/2016)

1.7.1.7.1. Efeitos secundários dos inibidores das topoisomerases

Os inibidores das topoisomerases apresentam alguns efeitos secundários, sendo que o mais severo é a mielossupressão. Esta ocorrência é limitada pela dose, bem como a eficácia do fármaco. Outros potenciais efeitos tóxicos incluem náuseas, vômitos, alopecia e cardiotoxicidade (Greer, 2013).

1.7.1.8. Alcalóides da vinca – Inibidores mitóticos

Os alcalóides da vinca são fármacos de ocorrência natural ou semi-sintéticos com bases azotadas extraídos da planta *Catharanthus roseus* mais conhecida como vinca de Madagascar (Gidding, 1999). Atualmente, existem quatro principais alcalóides de vinca, em utilização clínica no tratamento de LNH: vinblastina, vinorelbina, vincristina, vindesina (Figura 18).

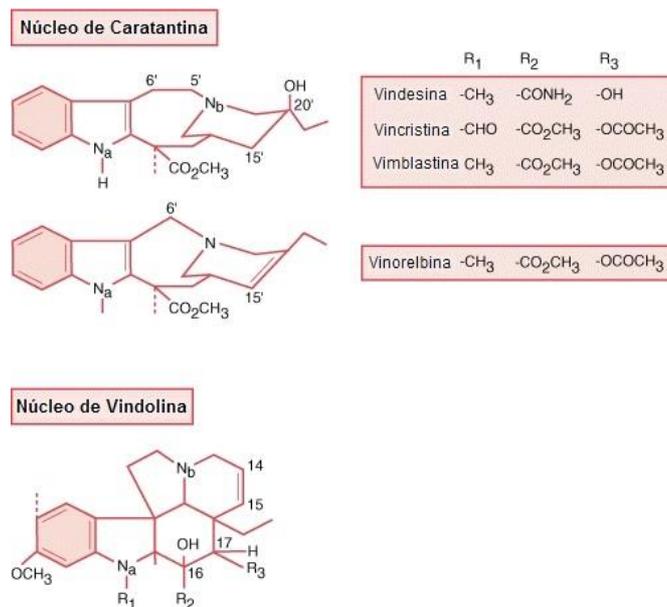


Figura 18. Estrutura química dos alcalóides da vinca (Adaptado (Rowinsky, 2003)).

Embora os alcalóides da vinca produzam uma ampla gama de efeitos bioquímicos em células e tecidos, os principais mecanismos de citotoxicidade dizem respeito às suas interações com a tubulina e a interrupção da função dos microtúbulos (Himes, 1991). Durante a divisão celular, os alcalóides da vinca ligam-se à tubulina (em particular às extremidades do fuso mitótico), conduzindo à paragem da metáfase, pela inibição da formação de microtubulina - a proteína essencial à manutenção da forma celular e para a formação do fuso mitótico. A microtubulina confere às células a estrutura e flexibilidade que necessitam para se dividir e replicar. A disrupção na formação microtubular conduz à iniciação da apoptose (Figura 19) (Rowinsky, 2003). As diferenças na atividade e na toxicidade dos alcalóides da vinca resultam de variações na farmacocinética e nos seus diferentes efeitos nas várias isoformas da tubulina e diferenças na entrada nos tecidos e na retenção na célula (Himes, 1991).

Para além deste mecanismo, estes compostos também são capazes de muitas outras atividades bioquímicas que podem ou não estar relacionados com os seus efeitos sobre os microtúbulos, incluindo inibição da síntese de proteínas e ácidos nucleicos, aumento da concentração de glutatión oxidado, alteração do metabolismo dos lípidos e dos lípidos membranares, aumento da concentração de adenosina monofosfato cíclico (cAMP), e inibição do cAMP fosfodiesterase (Rowinsky, 2003).

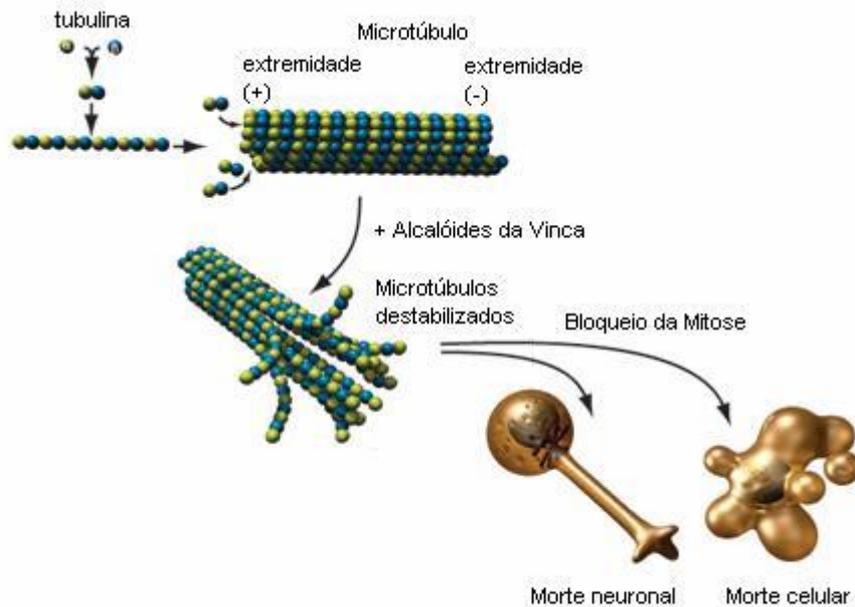


Figura 19. Esquema representativo do mecanismo de ação dos alcalóides da vinca (Adaptado de <http://www.ff.up.pt> - último acesso: 11/08/2016)

1.7.1.8.1. Efeitos secundários dos alcalóides da vinca

A toxicidade mais frequente na terapêutica com alcaloide da vinca é a neurotoxicidade manifestada por uma neuropatia sensorial-motora simétrica (Rowinsky, 2003). No início é detetada uma perda de profunda dos reflexos nos tendões das extremidades e parestesias dos dedos das mãos e dos pés. O uso continuado do fármaco pode resultar em neuropatias motoras mais acentuadas, que podem ser parcialmente reversíveis quando a toma é interrompida. Foram também documentadas neuropatias como obstipação, câibras e íleo paralisado (Rowinsky, 2003). Outros efeitos secundários descritos são a alopecia assinalada comumente após a administração de vincristina (Gidding, 1999), a hipotensão ortoestática ou paralisção do íleo e mialgias originadas pela vimblastina e a toxicidade hematopoiética com trombocitopenia e leucopénia dependentes da dose também associados a vimblastina e vinorelbina (Greer, 2013).

Todas as vincas são potentes vesicantes, com severos danos tecidulares associados à extravasão dos fármacos para os tecidos moles (Greer, 2013).

1.7.2. IMUNOTERAPIA

A imunoterapia antitumoral tem como princípio a utilização de componentes ou mecanismos do sistema imunitário para eliminar ou neutralizar células neoplásicas e/ou fatores que facilitem a sobrevivência e proliferação do tumor. O interesse no desenvolvimento de estratégias de imunoterapia antitumoral deriva do seu elevado potencial terapêutico, no qual assentam as seguintes características imunológicas: (i) a especificidade da resposta antitumoral; (ii) a possibilidade do estabelecimento de uma memória imunológica antitumoral, potencialmente capaz de prevenir o reaparecimento do tumor ou, pelo menos, mantendo-o num estado de latência; (iii) a intensidade e eficácia da resposta imunitária (Maia, 2007).

O desenvolvimento de múltiplas estratégias de imunoterapia tumoral é o resultado de progressos no conhecimento de substâncias e de mecanismos celulares e moleculares envolvidos no reconhecimento das células tumorais pelo sistema imunitário e na compreensão das interações complexas e multifatoriais entre o tumor e o sistema imunitário. Por outro lado, os avanços tecnológicos possibilitam a purificação e manipulação de células, moléculas e genes, contribuindo decisivamente para a “explosão” de estudos pré-clínicos e de ensaios clínicos de imunoterapia para o tratamento do cancro (Cohen, 2015; Sehn, 2015; Sikder, 2008). Atualmente são usadas diferentes modalidades de imunoterapia no tratamento de LNH (Greer, 2013). Na Tabela 10 podem-se consultar exemplos das imunoterapias mais comuns bem como os seus usos e limitações. Uma breve descrição de cada modalidade é apresentada a seguir:

i) Anticorpos monoclonais – são imunoglobulinas produzidas laboratorialmente projetadas para se ligarem a alvos específicos, causando uma resposta imunitária que destrói as células neoplásicas de forma direcionada; estes anticorpos podem ativar ou exercer uma reação imunológica no tumor ou desempenhar a sua função de uma forma que não envolva a ação direta do sistema imunitário (Bakhtiar, 2012; Smith, 2003).

ii) Terapia celular adotiva (ACT) – terapêutica altamente personalizada que envolve a administração no hospedeiro de células imunitárias com atividade anticancerígena direta, que foram estimuladas e expandidas *ex vivo* para discriminar e lisar células tumorais (Rosenberg, 2015)

iii) Vacinas tumorais – têm como objetivo mobilizar células do sistema imunitário e estimular e/ ou amplificar respostas imunitárias que reconheçam especificamente o tumor, mediando a sua eliminação. Idealmente, este tipo de estratégia deve resultar na

ativação de linfócitos auxiliares CD4⁺ que facilitem a resposta antitumoral, e células T citotóxicas CD8⁺, que eliminem as células malignas (Rosenberg, 2004).

iv) Citocinas recombinantes – a sua ação direta no desenvolvimento e execução de respostas imunitárias e a sua ação reguladora da imunidade, tornam as citocinas agentes ideais para a imunoterapia. Os dois principais tipos de citocinas usados no tratamento de neoplasias são interferões e interleucinas (Lee, 2011). No entanto, a falta de eficácia destes fatores *in vivo*, a falta de especificidade das respostas e a toxicidade associada a algumas citocinas reservam apenas para algumas o uso na clínica (Wajant, 2009; Waldmann, 2006).

v) *Pequenas moléculas* – são compostos orgânicos de baixo peso molecular (< 900 Dalton) que ajudam na regulação de processos biológicos nomeadamente nas interações proteína-proteína (Arkin, 2004). Estes fármacos podem penetrar na membrana celular para interagir com alvos dentro de uma célula e inibirem a atividade enzimática de uma proteína alvo (Hoelder, 2012). As *pequenas moléculas* oferecem as seguintes vantagens: (i) alta viabilidade devido a uma compreensão detalhada e precedente histórico da sua aplicação clínica e desenvolvimento; (ii) biodisponibilidade oral; (iii) uma maior exposição dentro do microambiente do tumor, ou através das barreiras fisiológicas (por exemplo, a barreira sangue-cérebro); (iv) o acesso aos alvos intracelulares de doenças não tratáveis por agentes terapêuticos proteicos; e (v) opções de formulação e dosagem diversificadas e bem compreendidas para aliviar os desafios farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, e permitindo a titulação da exposição ao fármaco. Outra vantagem convincente das *pequenas moléculas* é que os doentes podem mais facilmente aceder a estes tipos de medicamentos em comparação com imunoterapias biológicas (Adams, 2015).

Tabela 10. Modalidades terapêuticas de regulação imunitária aplicadas no tratamento de neoplasias (Adaptado (Adams, 2015). CTLA4 – molécula 4 associada a linfócitos T citotóxicos ; CAR -receptor quimérico de antígeno; TCR - receptor de linfócitos T; MUC1 - mucina 1 associada à superfície celular; MAGEA3 - antígeno 3 associado a melanoma; GM-CSF - fator estimulador de colónias de granulócitos - macrófagos; BCL2 – linfócitos B do linfoma 2; BTK - tirosina cinase de Bruton.

Modalidade	Uso geral e utilidade	Limitações	Exemplos	Referências
Anticorpos monoclonais (mAbs)	Agonistas altamente seletivos ou bloqueio das vias imunológica extracelulares proteína-proteína; tempo de meia-vida longa; não imunogénico (humana vs humanizado).	Custos caros e demorados de fabricação e desenvolvimento; desafios para alcançar exposições tumorais elevadas.	mAbs contra CTLA4, CD20 e (Rituximab)	(Pardoll, 2012)
Terapia celular adotiva (ATC)	Citotoxicidade focada no tumor de antígenos específicos de tumores intracelulares e extracelulares.	Composição e expressão de antígenos tumorais heterogéneos; toxicidade em células não tumorais.	Linfócitos T - CAR, linfócitos T - TCR	(Restifo, 2012)
Vacinas tumorais	Resposta imunitária primária do doente aos antígenos específicos do tumor.	Composição e expressão heterogéneas de antígenos do tumor; Ações propensas a serem dificultada por mecanismos de imunossupressão.	Vacinas contra alvos como: MUC1, MAGEA3	(Melero, 2014)
Citocinas recombinantes	O agonismo ou bloqueio das vias de sinalização proteína-proteína.	Antigenicidade; farmacocinética pobre; elevada toxicidade.	GM-CSF, Interleucinas: IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21	(Lee, 2011)
Pequenas moléculas	Especialmente adequadas para alvos intracelulares, mas também igualmente aplicáveis alvos extracelulares ou de superfície.	Atividades fora das células alvo; toxicidade limitada pela dose; ineficaz no bloqueio de interações proteína-proteína; requer dosagem diária.	Inibidores da via anti-apoptótica BCL2; da via de linfócitos B - BTK	(Muller, 2006)

1.7.2.1. Rituximab

O rituximab é um anticorpo quimérico monoclonal humano IgG1/murino que reconhece o antígeno CD20 humano (Reff, 1994), expresso exclusivamente em linfócitos B em diferenciação, em linfócitos B maduros e na maioria dos LNH B (Nadler, 1981), não sendo encontrado em progenitores de linfócitos B (pró-linfócitos) e em células plasmáticas maduras (plasmócitos) ou noutros tecidos (Dalakas, 2008; Maloney, 2012). A molécula CD20, uma fosfoproteína transmembranar com 35-kDa não glicosilada (Nadler, 1981), funciona como um canal de iões Ca^{2+} (Figura 21) (Léveillé, 1999).

As porções variáveis leve e pesada são originárias do anticorpo anti-CD20 de murino unidas à região constante IgG-k de humano (Figura 20). O resultado é uma proteína 95% de origem humana (Amoroso, 2011; Reff, 1994), permitindo desencadear mecanismos de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, tais como ADCC e citotoxicidade dependente do complemento (CDC) (Reff, 1994). Em adição a estes dois mecanismos, o rituximab exibe também atividade antitumoral pela indução da apoptose (Amoroso, 2011). Este anticorpo quimérico não exibe o desenvolvimento de anticorpos indesejados anti-murino (HAMA), um evento comum quando se utiliza um anticorpo de ratinho. O desenvolvimento de anticorpos anti-quiméricos (HACA) está presente em apenas 1% dos doentes tratados com Rituximab (Amoroso, 2011).

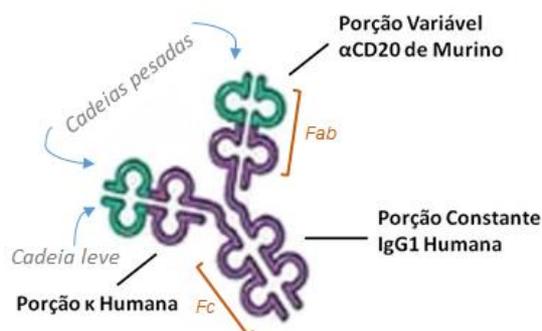


Figura 20. Estrutura quimérica do rituximab. Porções variáveis leves e pesadas originárias da imunoglobulina anti-CD20 de murino são fundidas com as porções constantes da cadeia pesada de IgG1 humana e com as regiões leves k. Fab – fração de ligação do anticorpo. Fc – fração constante do anticorpo (Adaptado (Pescovitz, 2006)).

O sucesso terapêutico de Rituximab deve-se às propriedades ideais da sua molécula alvo - a proteína CD20: não é libertada da membrana, não se encontra livre em circulação nem é internalizada aquando da ligação ao anticorpo (Weiner, 2010).

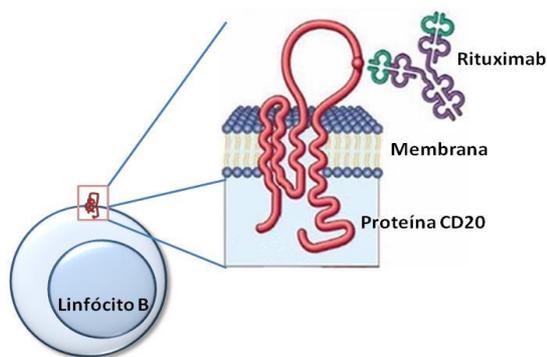


Figura 21. Ligação do rituximab à proteína intramembranar de linfócitos B, CD20 (Adaptado(Pescovitz, 2006)).

Os três mecanismos propostos para a eliminação de linfócitos B pela ligação do Rituximab à molécula CD20 são a ativação do complemento (CDC) (Maloney, 1996; Reff, 1994), a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) (Reff, 1994), e a direta sinalização da apoptose (Maloney, 1996) - Figura 22. No entanto, dependendo da sua origem, as células de linfoma apresentam sensibilidade distintas aos mecanismos (Jazirehi, 2005; Smith, 2003).

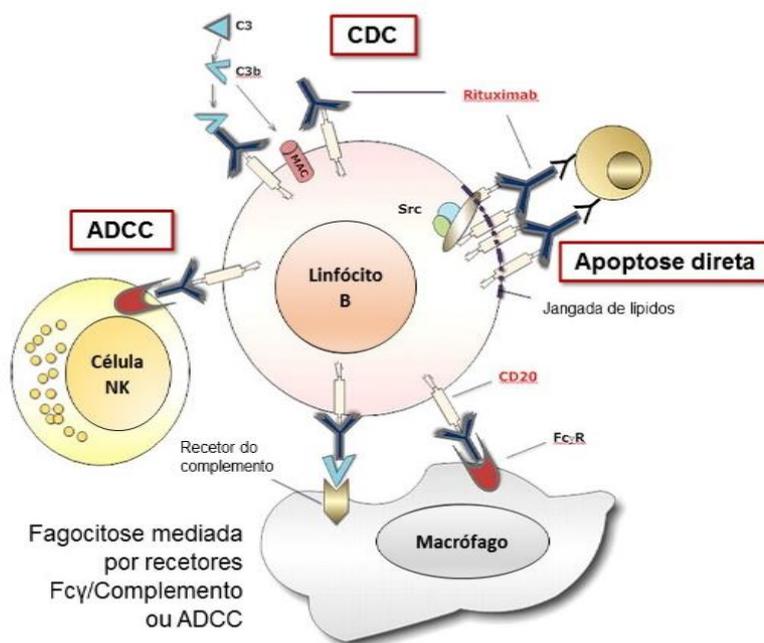


Figura 22. Esquema representativo dos mecanismos de morte celular propostos para a ação do rituximab no tratamento de LNH B (Adaptado (Jagłowski, 2010)).

Citotoxicidade dependente do complemento

O complemento é uma das primeiras linhas de defesa na imunidade inata e é importante para a integridade celular, homeostasia dos tecidos e modificação da resposta imunitária adaptativa (Walport, 2001a, 2001b) ativando mediadores pró-inflamatórios, gerando péptidos anafiláticos, compostos citolíticos e compostos antimicrobianos, recrutando células efetoras e induzindo respostas efetoras (Carroll, 2004; Gros, 2008). A ação do sistema do complemento é efetuada por diversas proteínas solúveis do plasma e proteínas de membrana que podem desencadear três cascatas de proteases distintas conhecidas como a via clássica, a via da lectina de ligação a manose (MBL) (Smith, 2003) e a via alternativa (Zhou, 2008).

Os anticorpos, incluindo os anticorpos monoclonais (mAb) ligados a uma molécula de superfície celular (p.e. Rituximab - CD20) ativam a via clássica do complemento (Reff, 1994). O reconhecimento de duas frações Fc do anticorpo pelo componente C1, ativa o complemento resultando na clivagem de C4 em C4a e C4b (Ricklin, 2010). O componente C1 ativado também cliva C2 em C2a e C2b (Ricklin, 2010) que em conjunto (C4b2a) constituem o C3 convertase responsável pela clivagem enzimática do componente C3 em C3a e C3b (Smith, 2003). O C3a é uma anafilotoxina fraca, que pode recrutar células efetoras imunitárias para o local de ativação do complemento através da interação com recetores C3a expressos em diversos tipos de células. O C3b é depositado na superfície da célula alvo (opsonização) estimulando a fagocitose e a morte citotóxica (Rogers, 2014). Além de funcionar como opsonina, o C3b também é incorporado no convertase C3 clássico para formar C5 convertase (C4b2a3b), que cliva C5 em C5a e C5b. De forma semelhante ao C3a, C5a atua como uma forte anafilotoxina e liga-se células que expressam o recetor C5a (C5aR), induzindo inflamação e fagocitose (Rogers, 2014). Tal como C3b, C5b também é depositado na superfície da célula alvo ligando-se a proteínas subsequentes do complemento C6-C9 conduzindo à formação do complexo terminal, também designado de complexo de ataque da membrana (MAC) (Morgan, 1999; Müller-Eberhard, 1986). O MAC gera um poro na superfície membranar permitindo o influxo de iões e água que conduzindo à pressão osmótica coloidal, num processo denominado citotoxicidade dependente do complemento (CDC) (Rogers, 2014).

Para além disso, a opsonização de C3b na superfície membranar torna os linfócitos B alvos fáceis para a fagocitose através dos recetores Fc das IgG (Fc γ R) ou dos recetores do complemento (CR) C3b CR1 presentes nas células efetoras (Smith, 2003).

Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

Os anticorpos e os anticorpos monoclonais podem induzir a ADCC mediada por uma variedade de células efetoras - linfócitos NK, granulócitos e macrófagos (Dall'Ozzo, 2004; Lefebvre, 2006). Neste processo é essencial que as frações Fc dos anticorpos que revestem o linfócito B se liguem aos recetores das porções Fc das IgG (FcγRs) presentes nas células efetoras desencadeando a sua ativação ou inibição (Bowles, 2006). Foram estudados três tipos de FcγRs na sua competência para modular ADCC pela indução de Rituximab que tem origem humana, permitindo-lhe interagir com os recetores Fc para IgG: o FcγRIIB (CD32) que tem função inibitória e interrompe a atividade das células efetoras e o FcγRIIa e FcγRIIIA (CD16) que têm função ativadora, permitindo a ativação das células efetoras na proximidade da célula alvo (Figura 22) (Clynes, 2000; Ravetch, 2000). Os linfócitos NK constituem uma população de células efetoras potentes e capazes de induzir a lise das células tumorais com com uma forte associação à eficácia do rituximab (Boross, 2012). A maioria das células NK do sangue periférico humano são células NK portadoras do recetor CD16 - FcγRIIIA que medeia a atividade citotóxica (Nimmerjahn, 2008). A atividade citotóxica leva à eliminação das células alvo usando mecanismos semelhantes aos utilizados por linfócitos T citotóxicos – através da produção de grânulos citotóxicos/líticos contendo dois tipos de enzimas líticos perforina (originado poros na membrana) e granzima (entra na célula através dos poros de perforina ou através de endocitose induzindo a apoptose) (Cardoso, 2007b).

No entanto, existem explicações alternativas. Por exemplo, as células NK são ativadas e produzem interferão gama (IFN γ) quando entram em contacto com células alvo revestidas com rituximab. O IFN γ poderá ter efeitos anti-tumorais directos sobre as células malignas, ou poderá estar a ativar outras células efetoras imunitárias como os macrófagos contribuindo para ADCC, aumentando a capacidade citotóxica (Weiner, 2010).

Indução da apoptose

O rituximab pode induzir morte celular direta e / ou sensibilizar células tumorais para drogas citotóxicas em vários linfomas de células B (Abulayha, 2014). As principais vias pro-apoptóticas desencadeadas pelo Rituximab envolvem mecanismos dependentes de caspases (Amoroso, 2011), embora já tenham sido definidas vias independentes de caspases (Jak, 2011):

Ativação de tirosina cinases da família Src - Após a ligação de duas moléculas de rituximab à molécula de CD20, ocorre a redistribuição das jangadas de lípidos, transativando subsequentemente as tirosinas cinases (Src) e iniciando as vias de sinalização resultando na apoptose (Deans, 2002; Shan, 1998).

Ativação das vias apoptóticas Fas - A ativação da caspase-8 sucede após a agregação de moléculas de Fas na membrana levando à formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Após a reticulação com CD20, a proteína do domínio de morte associada a Fas (FADD) e caspase-8 são recrutadas para o DISC. O agrupamento de moléculas de Fas parece ser dependente da translocação de Fas para as jangadas lipídicas, juntamente com o CD20, induzido pela ligação ao Rituximab (Stel, 2007).

Inibição da sobrevivência e vias de sinalização antiapoptóticas - O Rituximab induz modificações das vias de sinalização molecular (constitutivamente ativadas em células de linfoma) que regulam os produtos génicos antiapoptóticos: p38 proteína cinase (MAPK), nuclear factor NF- κ B, extracelular sinal regulado cinase- 1/2 (ERK-1/2), e vias de sobrevivência Akt. A inibição destes fatores sensibilizam as vias antiapoptóticas das células NHL B à quimioterapia promovendo a apoptose (Bonavida, 2007).

Vias independentes de caspases - rituximab aumenta do influxo de cálcio extracelular, o que aumenta a concentração intracelular de cálcio $[Ca^{2+}]_i$; (Daniels, 2006; Jak, 2011; Marcus, 2005) resultando no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, que são necessárias para o estimular a morte celular sem a necessidade de caspases (Jak, 2011).

1.7.2.1.1. Efeitos secundários do rituximab

Os efeitos secundários comuns no tratamento com rituximab são geralmente leves, mas podem incluir calafrios, febre, náuseas, erupções cutâneas, fadiga e dores de cabeça. Raramente, os efeitos secundários mais graves ocorrem durante infusões, tais como dificuldade para respirar e pressão arterial baixa. Este anticorpo também pode aumentar o risco de infeções até 6 meses após a interrupção do tratamento (Hansel, 2010).

O rituximab pode desencadear infeções de hepatite B que estavam inativas (Byrd, 1999).

1.7.3. QUIMIOTERAPIA DE COMBINAÇÃO

De forma genérica existem evidências indirectas, mas convincentes, que se estendem desde análises *in vitro* até estudos correlativos de ensaios clínicos, que os efeitos de sinalização de rituximab sobre os linfócitos B associados a mecanismos efetores imunitários adicionais podem contribuir para a atividade antitumoral de rituximab. A evidência mais forte é a clara demonstração de que a combinação de rituximab e quimioterapia citotóxica é eficaz numa variedade de LNH B (Weiner, 2010).

O racional para a quimioterapia de combinação é a utilização com sucesso de fármacos que utilizam mecanismos diferentes, diminuindo assim a probabilidade de que as células cancerígenas desenvolverem mecanismos de resistência (Frei, 2003). A associação de terapias antineoplásicas permite a morte celular dentro da gama de toxicidade tolerada pelo hospedeiro para cada fármaco e oferece uma gama de cobertura mais ampla das linhas celulares resistentes de uma população heterogénea tumoral e previne ou retarda o desenvolvimento de novas linhas de células resistentes aos medicamentos. Os fármacos com diferentes mecanismos de ação e toxicidades limitadas pela dose devem ser combinados de modo a permitir efeitos aditivos ou sinérgicos sobre o tumor com toxicidade mínima (Malhotra, 2003).

Vários agentes quimioterapêuticos são ativos contra o LNH e podem ser usados sozinho ou em combinação, dependendo da histologia e estágio da doença bem como a tolerância do doente à quimioterapia. Em alguns tipos de cancro, a melhor abordagem é a combinação de radioterapia, quimioterapia (Miller, 1998). A radioterapia trata o tumor maligno localizadamente, enquanto a quimioterapia atinge as células neoplásicas que migraram para outros locais.

Por vezes, a quimioterapia de combinação é usada não para curar, mas para reduzir os sintomas e prolongar a vida. A quimioterapia de combinação pode ser útil para pessoas com cancros avançados não elegíveis para terapia de radiação ou tratamento cirúrgico (doentes com cancro do pulmão de não-pequenas células, cancro do esófago, cancro da bexiga, ou que não podem ser completamente removidos por cirurgia) (Miller, 1998).

Uma das combinações de fármacos mais comum é CHOP (ciclofosfamida, hidroxildaunorubicina (adriamicina), oncovin® (vincristina) e prednisona/prednisolona) e outra combinação comum (deixa de fora a doxorubicina) e é chamado CVP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona). Estes regimes combinados de quimioterapia são muitas vezes associados a imunoterapia, em especial com o anticorpo monoclonal rituximab (anticorpo anti -CD20): Rituximab - em casos de LNH B melhorando as taxas de resposta e sobrevivência livre de progressão (Schulz, 2007).

2. Problemática e importância da recuperação das populações linfocitárias B e T e da cooperação entre ambas em doentes imunossuprimidos

O sistema imunitário caracteriza-se pela sua capacidade de resposta a uma vasta gama de agentes patogénicos, cujas especificidades antigénicas se modificam constantemente. Tal torna-se possível pelo desenvolvimento de um repertório extremamente diverso de recetores antigénicos à superfície dos linfócitos, os quais são potencialmente capazes de reconhecer todo e qualquer determinante antigénico estranho ao organismo. Já que o LNH de células B é uma neoplasia do sistema imunitário, a competência imunológica encontra-se frequentemente alterada nos doentes afetados. Além disso, a maioria das estratégias terapêuticas alteram por si só a dinâmica dos compartimentos imunológicos. De fato, os doentes com LNH demonstram frequentemente sinais clínicos e biológicos de imunossupressão antes de iniciar o tratamento. A quimioterapia contribui significativamente para a linfocitopenia, depletando profundamente o compartimento celular linfocitário B e T em circulação; a recuperação deste compartimento depende de múltiplos fatores, incluindo a intensidade dos regimes usados. (Kim, 2011a)

A combinação da quimioterapia com Rituximab tem sido utilizada muito frequentemente nos últimos anos, já que aumenta as taxas e a duração das respostas clínicas e mesmo a sobrevivência global, quando comparada com a quimioterapia isolada. (Rummel, 2013; Van Oers, 2006) A contribuição do Rituximab para a imunossupressão celular não se encontra ainda totalmente estudada. Apesar de não se ter demonstrado um aumento da incidência de infeções em doentes tratados com Rituximab (com ou sem quimioterapia), não é ainda claro qual o impacto de uma supressão intensa e prolongada do compartimento imunitário humoral e celular em adição ao da quimioterapia. (Coiffier, 2002; Marcus, 2005)

Dados experimentais obtidos pelo nosso grupo de trabalho em modelos animais sugerem que o compartimento imunitário B (células B e imunoglobulinas, Ig) pode ter um papel importante na modulação da maturação das células T, da sua função e do seu repertório. Recentemente, observámos que os linfócitos B e as Ig contribuem para o desenvolvimento e para a génese da diversidade das células T no timo (João, 2004; Pires, 2010), e podem tornar-se um instrumento biológico importante em situações em

que seja vantajoso acelerar a recuperação imune. É o caso do período que se segue ao uso de terapêuticas mieloablativas, no contexto da transplantação hematopoiética (João, 2006a; João, 2006b). Por outro lado, demonstrámos também que a infusão de linfócitos B e/ou de imunoglobulinas permite expandir o repertório T em ratinhos, melhorando ainda a sua função (João, 2004). A depleção de linfócitos B e a consequente hipogamaglobulinémia levam, neste modelo murino, a uma supressão da imunidade celular. O Rituximab depleta globalmente os linfócitos B e origina um estado de profunda imunodeficiência neste compartimento. Alguns grupos de investigadores demonstraram mesmo a presença de hipogamaglobulinémia em doentes sob tratamento com Rituximab (Casulo, 2013; Roberts, 2015). Tais alterações podem, conceptualmente, ser responsáveis por um importante desequilíbrio da imunidade celular T. Desta forma, é colocada a hipótese de que os doentes com LNH-B tratados com um agente que depleta as células B possam desenvolver uma alteração da função celular T. O objetivo deste trabalho é comparar o número e a função das células T entre doentes tratados com quimioterapia apenas, com Rituximab, e com quimioterapia associada a Rituximab, para definir o impacto do anticorpo anti CD20 sobre a imunidade celular T em doentes com LNH-B. Também é importante investigar se a imunidade celular T regenera completamente após tratamento com quimioterapia, Rituximab ou a combinação dos dois, o que exige a caracterização das populações linfocitárias antes e após terapêutica. Estas observações poderão contribuir para melhor compreender as consequências dos tratamentos utilizados em doentes com LNH-B e para antever o possível impacto sobre a incidência de infeções e tumores secundários, levando ao desenho de estratégias terapêuticas otimizadas naquela patologia.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Examinar o impacto da depleção das células B induzido pelo tratamento com Rituximab, Quimioterapia ou ambos sobre a imunidade celular T em doentes com LNH B.*

3.2. Objetivos específicos

Conhecer:

- A etiologia, origem mecanística, a incidência e os exames de diagnóstico disponíveis dos LNH;
- O impacto dos LNH-B no sistema imunitário dos doentes;
- Os mecanismos de ação das terapêuticas aplicadas no tratamento de LNH-B;
- Os efeitos secundários causados pelas diferentes terapêuticas.

Compreender:

- As alterações causadas pelas terapêuticas no sistema imunitário dos doentes com LNH B;
- As atividades biológicas das terapêuticas aplicadas no tratamento de cada neoplasia de LNH;
- O funcionamento das técnicas e equipamentos envolvidos no estudo bem como as suas aplicações.

Valorizar

- A aplicação de uma terapêutica adequada no tratamento de cada tipo de LNH B;
- A importância da recuperação funcional linfocitária B e T nos doentes sujeitos às terapêuticas estudadas;

* Projeto com o apoio financeiro da Associação Portuguesa Contra a Leucemia (APCL) (<http://www.apcl.pt/>)

- As normas gerais de controlo de qualidade no laboratório de diagnóstico hematológico;
- As regras de segurança no laboratório hospitalar e no manuseamento de amostras de sangue humano;
- A importância de uma análise estatística apropriada dos resultados obtidos.

Aplicar

- As normas dos laboratórios envolvidos no estudo;
- Os conhecimentos sobre o correto manuseamento dos aparelhos;
- A estratégia e metodologia aplicadas na determinação dos parâmetros estudados;
- O tratamento e *software* estatísticos mais adequados a cada tipo de dados coletados neste estudo.

Analisar

- Os efeitos da depleção linfocitária induzida pelo Rituximab, induzida pela quimioterapia ou induzida pela combinação de ambos na(s):
 - a) Populações de leucócitos, linfócitos e linfócitos B após a finalização do tratamento;
 - b) Subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 após a finalização do tratamento;
 - c) Alteração dos níveis séricos de IgG e IgM nos três grupos de doentes ao longo do tempo de estudo;
 - d) Diversidade de repertório de imunoglobulinas IgM, IgG dos três grupos de doentes ao longo do tempo de estudo;
- A informação clínica da população de doentes com LNH B relativa a:
 - a) Dados demográficos;
 - b) Tipo de LNH B diagnosticado;
 - c) Terapêutica(s) aplicada(s);
 - d) Resposta ao tratamento;
 - e) Sobrevivência global;
 - f) Episódios de infeção.
- Os resultados de forma a correlacionar as variáveis acima descritas.

4. Metodologia

4.1. Estratégia experimental

A realização dos objetivos delineados para este trabalho obedeceu ao plano:

4.1.1. LOCAIS DE REALIZAÇÃO

Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG) – recrutamento de doentes; colheita de amostras de sangue periférico e recolha de informações demográficas;

Unidade de Investigação em Patobiologia Molecular - Instituto Português de Oncologia de Lisboa, Francisco Gentil, E.P.E. (IPOLFG) – separação de soro e de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs);

Laboratório de Hemato-Oncologia do Departamento de Hematologia do IPOLFG – Realização da técnica de citometria de fluxo;

Laboratório de Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do IPOLFG – Realização da técnica de Imunoturbidimetria;

Grupo *Lupus and autoimmune repertoires*, Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras – cultura celular e extração de proteínas de *E. coli*, quantificação da proteína total nos soros pelo método do ácido bicinconínico e realização da técnica de *Western blotting*.

4.1.2. POPULAÇÃO EM ESTUDO

Os doentes com LNH-B foram recrutados aquando do diagnóstico, durante as consultas de Hematologia no IPOLFG na presença do médico especialista. A dose e duração dos tratamentos foram da total responsabilidade dos médicos especialistas e selecionadas da forma mais adequada para cada tipo e grau de linfoma diagnosticado. Os critérios aplicados foram:

Critérios de inclusão:

- Os Doentes com LNH B com indicação para tratamento com quimioterapia, rituximab ou ambos, de qualquer idade, raça ou género;
- Doentes que tenham assinado o consentimento informado referente ao presente estudo, aprovado pela Comissão de Ética do IPOLFG.

Critérios de exclusão:

- Doentes com LNH B previamente sujeitos a tratamento com quimioterapia, rituximab ou ambos há menos de 2 anos;
- Doentes inclusos que manifestem vontade de abandonar o estudo.

4.1.3. CALENDARIZAÇÃO DE COLHEITAS

Os instantes de estudo escolhidos para análise foram:

- 1) Antes do início da terapêutica;
- 2) 1 Mês após o fim da terapêutica;
- 3) Em intervalos de 3 meses, posteriormente, durante 1 ano.

As colheitas das amostras de sangue dos doentes nos vários momentos do estudo coincidiram com as alturas habituais da avaliação clínico-laboratorial de forma a não exigir deslocações adicionais ao hospital.

4.1.4. TÉCNICAS E PARÂMETROS ANALISADOS

Dados clínicos

No momento da inclusão no estudo, foram registadas as informações relativamente a:

- Dados pessoais (idade no momento de diagnóstico, género, raça);
- Diagnóstico e estadiamento do LNH B;
- Linha de terapêutica do doente;
- Terapêutica(s) selecionada(s) para o tratamento do LNH B diagnosticado.

Após o fim do período de terapêutica e durante o período de seguimento foram recolhidas informações relativamente a:

- Número de ciclos das terapêutica(s) aplicada(s);
- Resposta à terapêutica;
- Contagem do número de infeções (bacterianas, fúngicas e virais);
- Progressão da doença;
- Sobrevivência global.

Dados laboratoriais

No momento do diagnóstico e durante o período de seguimento foram executadas técnicas com vista à:

- Quantificação de leucócitos e linfócitos totais – As contagens do número de leucócitos e linfócitos totais foram facultadas pelo laboratório de patologia clínica do IPOLFG. Estas células fazem parte dos parâmetros analisados rotineiramente durante o seguimento médico. A quantificação foi feita pelo analisador hematológico automático Sysmex Xe-5000;
- Avaliação de populações de linfócitos B (CD19) e T (CD3) e subpopulações linfocitárias T CD4 e CD8 por citometria de fluxo;
- Quantificação de imunoglobulinas IgG e IgM séricas por imunoturbidimetria;
- Determinação dos perfis de reatividade das imunoglobulinas IgM, IgG por *western blotting* semi quantitativo;

Toda e qualquer informação relativamente aos dados clínicos e laboratoriais dos doentes foi tratada de forma a proteger a confidencialidade dos mesmos.

4.1.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DE RESULTADOS

O *software* estatístico R (versão 3.3.1. para Windows®) (R Development Core Team, 2016) foi utilizado para a análise de resultados das contagens das populações leucocitárias, linfocitárias e suas subpopulações bem como no estudo das alterações dos níveis séricos de imunoglobulinas. O R foi também usado na análise de

intercorrências infecciosas, de sobrevivência global e sobrevivência livre de eventos da amostra de doentes e na correlação entre parâmetros.

Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência recorreu ao cálculo de curvas de sobrevivência segundo o método de Kaplan-Meier (Kaplan, 1958). O evento morte foi considerado para o cálculo da curva de sobrevivência para cada um dos três grupos de tratamento. De forma análoga efetuaram-se os cálculos para a sobrevivência livre de eventos de leucopénia e de linfopenia considerando a 1ª ocorrência de leucopénia ou linfopenia como evento de interesse.

As diferenças na sobrevivência entre grupos de tratamento foram testadas pelo teste de Log-Rank (Mantel, 1966), comparando o número de eventos observados em cada grupo com o número de eventos esperado, tendo em conta o número total de indivíduos da amostra. Os cálculos efetuaram-se utilizando o R com recurso à biblioteca *survival* Therneau (Therneau, 2015; Therneau, 2000).

Testes de normalidade

A normalidade dos dados foi testada com teste de Shapiro-Wilk (Shapiro, 1965) (nível de confiança de 95%).

Testes estatísticos para a diferença de distribuições

Para comparar as distribuições dos valores de cada parâmetro entre grupos de tratamento foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis (Kruskal, 1952) e Wilcoxon (Wilcoxon, 1945). A escolha destes testes em particular deveu-se à não normalidade dos dados e à dimensão reduzida da amostra. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado para cada parâmetro em cada instante de tempo entre os três grupos. Os testes de Wilcoxon foram feitos entre pares de grupos, para cada instante de tempo significaram três testes de Wilcoxon para os três pares existentes: R vs QT, R vs R-QT e QT vs R-QT. Os dois tipos de testes foram realizados fazendo uso da totalidade dos dados obtidos (sem remoção de *outliers*).

Visualização dos parâmetros ao longo do tempo

Os *outliers* não foram removidos da análise visto terem sido usados testes analíticos resistentes a estes valores. No entanto, para melhor perceção dos resultados graficamente, foi feita uma remoção de *outliers* segundo o critério de *Modified Z-score* (Iglewicz, 1993).

Análise de PCA

A avaliação da especificidade das imunoglobulinas IgM e IgG obtidas por *western blotting* foi feita no programa Igor Pro 6.1 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR) num computador Apple iMac G9 (Apple Computer Inc., Cupertino, CA).

Foi realizada análise de componentes principais (PCA), em que foi escolhida sempre apenas a primeira componente principal. Procuraram-se diferenças significativas entre grupos de tratamento através do teste de Kruskal-Wallis e Wilcoxon de forma idêntica aos descritos anteriormente.

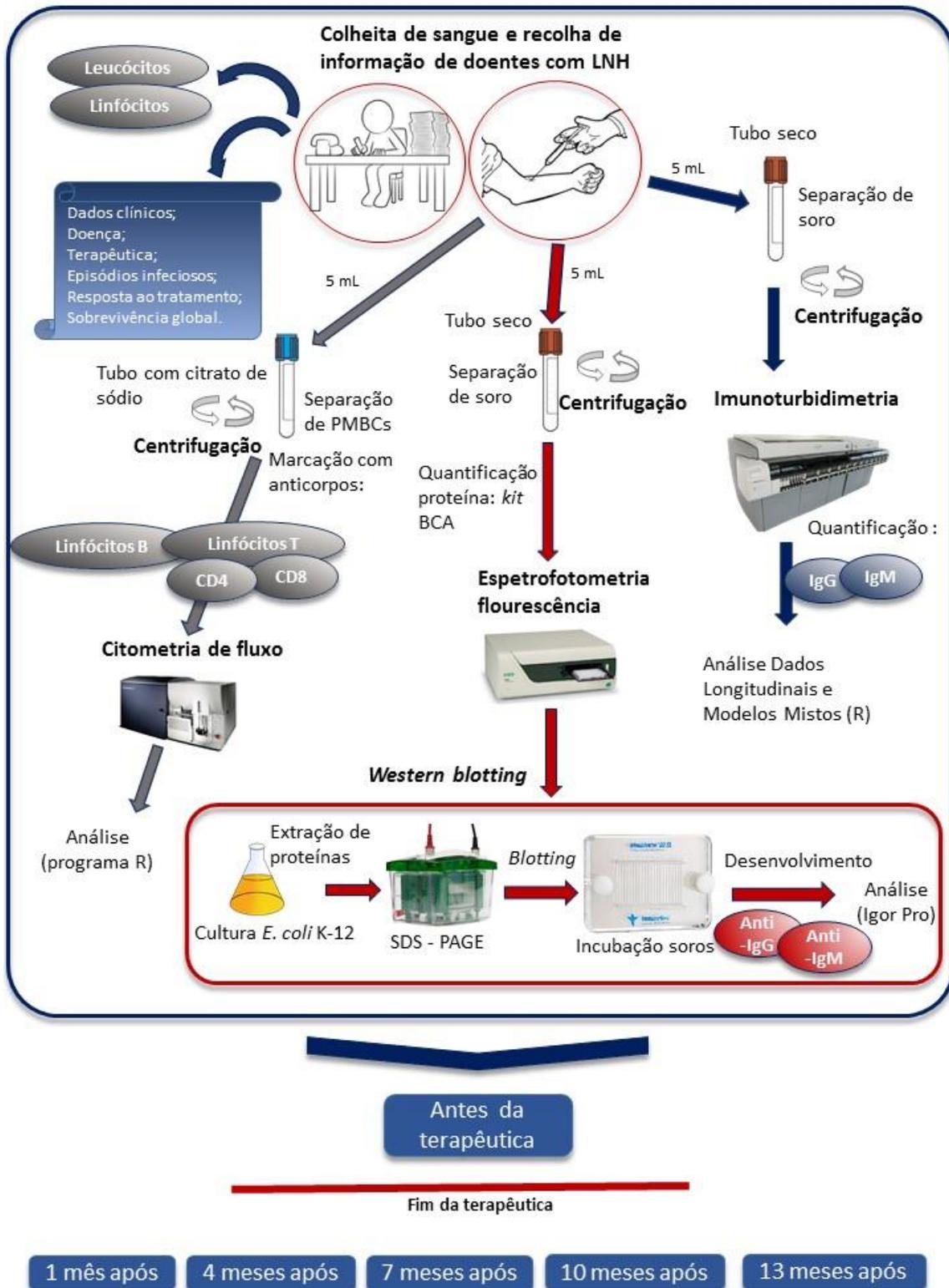
A correlação entre parâmetros foi realizada através do cálculo do coeficiente de correlação de Spearman (Spearman, 1904).

Correlação entre parâmetros

A fim de averiguar possíveis correlações entre os parâmetros medidos, foi calculada a matriz de correlações, contendo os coeficientes de correlação de Spearman (Spearman, 1904). Para cada par de parâmetros, acompanhados do respetivo valor P que testa a hipótese nula de o coeficiente ser igual a zero. Optou-se pelo coeficiente de correlação de Spearman dada a presença significativa de *outliers*.

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.2. Diagrama do trabalho



4.3. Procedimento experimental

4.3.1. COLHEITA DE SANGUE PERIFÉRICO

Em cada instante de tempo estudado foram colhidos no total 15 ml de sangue periférico de cada indivíduo, distribuídos por três tubos, para realização das avaliações laboratoriais seguidamente detalhadas. As colheitas de sangue foram efetuadas pelos técnicos profissionais do Departamento de Hematologia do IPOFG nos instantes de estudo definidos coincidindo com a ida dos doentes à consulta. As amostras de sangue periférico foram colhidas para um tubo de vácuo (Vacutainer™) de citrato de sódio tamponado (0,109 mol/L sangue) e para dois tubos de vácuo (Vacutainer™) secos (sem anticoagulante) seguindo as regras de segurança de manipulação de sangue humano.

4.3.2. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEADAS DO SANGUE PERIFÉRICO POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE

4.3.2.1. Descrição da técnica de centrifugação

O isolamento de células mononucleadas do sangue periférico (PBMCs) foi efetuada através de um gradiente de concentração utilizando o reagente Histopaque®. Esta metodologia separa as PBMCs por centrifugação numa solução em que se estabelece um gradiente de densidade de $1,077 \pm 0,001$ g/mL. As células distribuem-se ao longo deste gradiente de acordo com a sua densidade, o que permite a separação e recuperação de várias frações celulares como apresentado na Figura 23. O anel de células mononucleadas contém linfócitos (B, T, NK), monócitos e macrófagos (English, 1974).

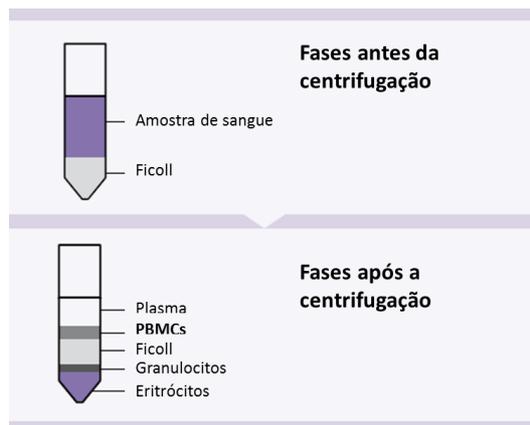


Figura 23. Figura esquemática das fases da separação de PBMCs por gradiente de densidade . Adaptado (MACS Miltenyi Biotec – Isolamento de células mononucleares de sangue periférico humano por centrifugação por gradiente de densidade – Protocolo)

4.3.2.2. Procedimento experimental – Separação de células nonucleadas do sangue periférico

A separação das PBMCs de cada amostra foi feita imediatamente após a colheita, de forma a preservar a viabilidade das mesmas. O sangue foi colhido diretamente para tubos de vácuo com citrato de sódio para impedir a coagulação.

Cada amostra de sangue foi diluída (1:1 em tampão fosfato salino (PBS - NaCl 7,3 M; KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 10,1mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH7,4) e colocada cuidadosamente sobre o gradiente de densidade Histopaque® (3 mL), evitando a mistura de fases. O gradiente de densidade armazenado a 4°C, foi utilizado à temperatura ambiente, de forma a aumentar o rendimento da recuperação de PBMCs. As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente, a 1800 rpm durante 20 min. O anel de PBMCs foi transferido para novo tubo estéril de fundo cónico, onde as células foram lavadas com PBS (20 mL) e centrifugadas a 1200 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado no volume de PBS remanescente. Na eventual de contaminação do *pellet* com eritrócitos, procedeu-se à incubação da amostra com 2 mL tampão de lise de eritrócitos (RBCL - NH₄Cl 1,5M; NaHCO₃ 1,4x10⁻¹M; EDTA 1mM, pH7.3) durante 10 min repetindo a centrifugação anterior. O *pellet* de células foi ressuscitado em 1 mL de PBS e foi determinada a concentração celular e a taxa de viabilidade na diluição de 1:1 em Azul de Tripano 0,2%. As células foram mantidas a 4°C até à aquisição das células no citómetro de fluxo.

4.3.3. DETERMINAÇÃO DE POPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

4.3.3.1. Descrição da técnica de citometria de fluxo

A citometria de fluxo permite a rápida medição da luz dispersa e emissão de fluorescência produzidas por células ou partículas adequadamente marcadas ao atravessarem individualmente um feixe de luz (Ormerod, 2003). O citômetro de fluxo dispõe em posição central na coluna de fluxo, as células ou partículas suspensas num líquido isotônico em fila única por focagem hidrodinâmica. A fonte de excitação é um laser de Árgon que emite luz num comprimento de onda de 488 nm ao qual se pode juntar outro laser com emissão de luz a um comprimento de onda superior para obtenção de 4 ou mais fluorescências num só tubo (Ormerod, 2003). Quando uma célula atravessa o feixe de luz, provoca um processo de dispersão fotónica ou de emissão de fluorescência, cuja intensidade depende das características da célula. A dispersão, a extinção ou a refração da luz, bem como a fluorescência emitida pela partícula, são fenómenos físicos avaliados pelos diferentes sensores ao atravessar o laser. A dispersão frontal (FSC) é proporcional ao tamanho relativo da célula, e a dispersão ortogonal ou lateral a 90° (SSC) evidencia a complexidade da estrutura interna da célula (granularidade, relação núcleo-citoplasma) (Ormerod, 2003). Os sinais luminosos medidos são amplificados e convertidos em pulsos eletrónicos pelos fotomultiplicadores, sofrendo uma conversão analógica-digital. Os sinais digitais são processados em vários canais de acordo com a sua intensidade, acumulando-se em tempo real para uma posterior análise computadorizada (Ormerod, 2003). Estes dados são apresentados geralmente sob a forma de histogramas que combinam um parâmetro com o número de partículas avaliadas, ou de diagramas biparamétricos – diagramas de pontos, que combinam os parâmetros dois a dois (Figura 24). No histograma/diagrama de pontos, cada ponto corresponde a um evento analisado pelo citômetro, em que os eventos com características semelhantes posicionam-se na mesma área do histograma/diagrama permitindo a seleção e contagem dos mesmos (Figura 24) (Shapiro, 2003).

A citometria de fluxo é atualmente aplicada em muitas disciplinas, nomeadamente hematologia (Brown, 2000), bioquímica (O'Connor, 2001), microbiologia (Álvarez-Barrientos, 2000; Vives-Rego, 2000) e indústria alimentar (Comas-Riu, 2009). O uso da citometria de fluxo tem vindo a expandir-se, devido ao grande número de reagentes e anticorpos monoclonais que têm sido desenvolvidos na identificação direcionada de uma determinada célula ou partícula.

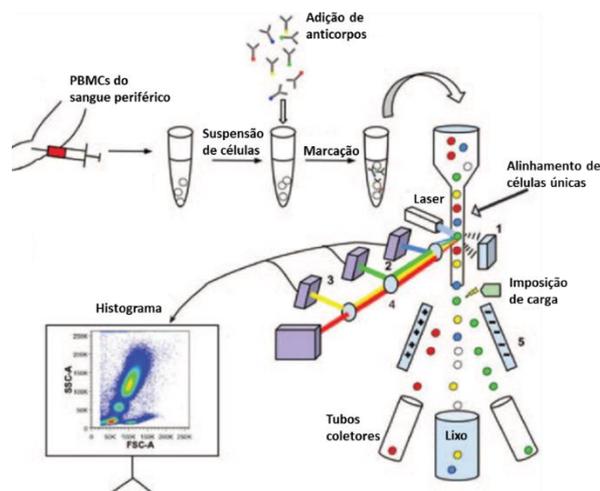


Figura 24. Representação esquemática do processo de funcionamento de um citômetro de fluxo. 1 – Detetor de dispersão frontal; 2 – Detetor de dispersão ortogonal; 3 – Detetores de fluorescência; 4 – Filtros e espelhos; 5 – Placas de deflexão carregadas. Adaptado (Jahan-Tigh, 2012)

4.3.3.2. Procedimento experimental – Marcação linfocitária de antígenos de superfície

A marcação de PBMCs foi realizada segundo o protocolo de marcação linfocitária de antígenos de superfície praticado no IPOLFG (Herzenberg, 1976).

Os anticorpos monoclonais de superfície foram adicionados a 200 μ L da suspensão de PBMCs em tubos de vidro de fundo redondo nos volumes sumarizados na Tabela 11 e incubados durante 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura.

Tabela 11. Volumes adicionados de anticorpos de marcação linfocitária de superfície. n.a. – não se aplica.

Células a marcar	Anticorpo	Vol (μ L)
Linfócitos T auxiliares	anti-CD4 Pacific Blue	2,5
Linfócitos B	anti-CD19 PE	10
Linfócitos T	anti-CD3 PerCPcy5.5	10
Linfócitos T citotóxicos	anti-CD8 APC-H7	5

As células marcadas foram incubadas com 1 mL de RBCL durante 10 minutos para remoção de eritrócitos. As amostras foram centrifugadas durante 5 minutos, a 1500 rpm, em que foi rejeitado o sobrenadante. O *pellet* de linfócitos foi lavado com 200 μ L de PBS e centrifugados durante 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o *pellet* ressuspenso em 200 μ L de PBS+Albumina do soro bovino (BSA) 0,2%. As

suspensões de células foram mantidas no escuro a 4°C até leitura imediata no citómetro de fluxo.

Na impossibilidade de aquisição imediata das células procedeu-se à fixação das mesmas pela adição de 300 µL de formaldeído 1% em PBS e armazenaram-se a 4°C. As células foram adquiridas no prazo máximo de 24 horas.

As amostras foram adquiridas no citómetro BD FACSAria III, usando o programa BD FACSDiva Software de acordo com o protocolo de aquisição em prática no IPOLFG. As populações e subpopulações linfocitárias foram analisadas no programa Infinicyt™ de acordo com os protocolos de análise. Foram adquiridos pelo menos 100.000 eventos em cada amostra.

4.3.4. SEPARAÇÃO DE SORO E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEINA TOTAL

4.3.4.1. Descrição da técnica de separação de soro

O soro é a fração líquida de sangue total, obtida após a coagulação sanguínea. Esta fração é composta por água, proteínas (p.e. albumina, imunoglobulinas), eletrólitos (Na⁺ e Cl⁻), nutrientes (p.e. glicose e aminoácidos), hormonas (p.e. cortisol, tiroxina), detritos (p.e. ureia) e gases (p.e. CO₂, O₂). O coágulo é removido por centrifugação e o sobrenadante resultante, é cuidadosamente recolhido (Krebs, 1950).

4.3.4.2. Procedimento experimental – Separação do soro

Foram colhidos 5 mL de cada indivíduo para tubos de vácuo secos Vacutainer® de forma a permitir a coagulação. Aguardou-se a formação do coágulo durante (aproximadamente) 1h com os tubos em posição inclinada (cerca de 45°). A separação do soro foi feita por centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm a 4°C. A fase sobrenadante correspondente ao soro foi armazenada em alíquotas em tubos estéreis a -20°C para análise posterior de anticorpos (Henry, 1979).

4.3.4.3. Método do ácido bicinconínico

O método do ácido bicinconínico (BCA), tal como o método de Lowry, baseia-se na redução de Cu^{2+} a Cu^+ pela proteínas em meio alcalino (método do biureto) com a detecção colorimétrica altamente sensível e seletiva do catião cobre com um reagente único contendo BCA (Smith, 1985). O produto da reação de cor púrpura é dependente da temperatura e é formada pela quelação de duas moléculas de BCA com um ião cobre reduzido. Estes complexos solúveis em água exibem uma forte absorvância a 562 nm, que é linear com o aumento da concentração de proteína sobre uma ampla gama de concentrações (20-2000 $\mu\text{g/mL}$).

A quantidade de proteína pode ser estimada utilizando uma curva padrão com uma proteína cuja concentração seja conhecida, como p.e. a albumina bovina sérica (BSA).

Mesmo após o fim do período de incubação da amostra com a solução contendo BCA, a cor final continua a desenvolver, no entanto, a taxa de desenvolvimento é suficientemente lenta para permitir que um grande número de amostras sejam analisadas em conjunto.

A estrutura macromolecular da proteína, o número de ligações peptídicas que reagem com Cu^{2+} e a presença de três aminoácidos particulares (cisteína, tirosina e triptofano) são registadas como sendo responsáveis pela formação de cor púrpura com BCA (Smith, 1985; Wiechelman, 1988).

4.3.4.4. Protocolo da quantificação de proteína total pelo método do ácido bicinconínico

Para a determinação da concentração total de proteína foi usado o *kit Pierce BCA Protein Assay* (Thermo Scientific). As amostras foram diluídas 1:100 em PBS, proporção testada previamente como sendo a mais adequada. O reagente de trabalho (WR) - contendo BCA - foi preparado na proporção recomendada de 50:1 dos reagentes A e B (respetivamente) que acompanham o *kit*. O procedimento foi efetuado em microplacas de fundo redondo, aos quais foram adicionados 200 μL de WR e 25 μL de cada amostra diluída de soro. Após agitação, as placas foram seladas e as amostras foram incubadas durante 30 min a 37°C. A absorvância foi lida a 562 nm no espectrofotómetro xMark™.

A cada placa foram adicionadas em triplicado diluições da solução de BSA 2 mg/mL [25: 2000] $\mu\text{g/mL}$ para a construção da curva de calibração. Nos casos em que a concentração de proteína foi superior ao limite máximo permitido pela curva, o ensaio foi repetido diluindo a amostra 1:200 em PBS.

4.3.5. QUANTIFICAÇÃO DE IGM E IGG SÉRICAS PELO MÉTODO DE IMUNOTURBIDIMETRIA

4.3.5.1. Descrição da técnica de imunoturbidimetria

A imunoturbidimetria é um método altamente preciso e sensível utilizado nos laboratórios hospitalares na medição quantitativa e simultânea de fármacos ou biomoléculas em fluidos corporais, como soro, plasma ou urina. (Chianese, 2012).

A turbidimetria baseia-se no fato da quantidade de luz, que atravessa uma solução de partículas, diminuir à medida que a turvação da solução aumenta. Esta turvação é medida ao ângulo de 0° em relação à luz incidente, tal como na espectrofotometria (McClatchey, 2002). Assim, a turbidimetria mede a diminuição de intensidade de luz incidente numa amostra causada pela dispersão, reflexão e absorção do feixe de luz causada pelas suas moléculas constituintes (McClatchey, 2002).

Na imunoturbidimetria, os ensaios baseiam-se na reação de aglutinação induzida pela ligação do antigénio-anticorpo. Quando uma luz é dirigida para a mistura da amostra, a variação na absorvência medida fotometricamente é proporcional à taxa de aglutinação das micropartículas (Teppo, 1982).

4.3.5.2. Procedimento experimental - Imunoturbidimetria para deteção de IgG e IgM

A quantificação de IgG e IgM foi efetuada segundo o protocolo dos *kits* de deteção de imunoglobulinas IgM e IgG (Abbott Diagnostics) (Croci, 1989; Ledue, 2002) e faz parte das análises de rotina de exigidos pelos médicos no contexto de LNH B. A deteção de imunoglobulinas é feita pela separação dos soros (como descrito anteriormente) a partir de amostras de sangue total colhido em tubos de vácuo secos. O soro foi analisado no máximo até 3 horas após a colheita, como recomendado pelo fabricante do *kit* utilizado.

As amostras foram colocadas no suporte do analisador bioquímico automático (Abbott Architect ci8200) que procede ao processamento das amostras. Os soros foram diluídos em solução salina NaCl (0,9%) de acordo com a imunoglobulina a analisar (1:5 para a deteção IgM e não diluída para a deteção de IgG). Posteriormente foi retirado de cada amostra o volume de 7 µL e adicionados a 200 µL de tampão fornecido pelo *kit* (Tris 100 mmM/L, polietilenoglicol (PEG) 30 g/L; 0,1% azida de sódio, pH 7.0) e foi

efetuada a medição do branco da amostra antes da adição do anticorpo a detetar a 340 nm. Por fim, na presença do anticorpo apropriado (diluído 1:1 em Tris 100 mM/L, 0,1% azida de sódio, pH 9.0) em excesso (4 µL), a concentração de imunoglobulina foi medida em função da turbidez a 340 nm eliminando o valor medido no branco.

Os valores de concentração das imunoglobulinas foram obtidos através de uma curva de calibração efetuada usando diluições de *Specific Protein Multiconstituent Calibrator* [20: 300 mg/dL]. O *Specific Protein Multiconstituent Calibrator* é composto por IgA, IgG, IgM, C3, C4, haptoglobina e transferrina humanas em concentrações conhecidas, podendo ser utilizado na quantificação simultânea destes constituintes numa amostra de soro.

4.3.6. AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE E DIVERSIDADE DAS IMUNOGLOBULINAS POR WESTERN BLOTTING

4.3.6.1. Descrição da técnica de *western blotting*

A técnica de *western blotting* também conhecida como *immunoblot* ou *Panama blot* é um poderoso e importante método utilizado na imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para uma membrana adsorvente (Burnette, 1981; Towbin, 1979). Resumidamente, uma mistura de proteínas para as quais se quer testar a reatividade de anticorpos, é separada com base no peso molecular pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE) pela aplicação um campo elétrico (Cleveland, 1977). O gel funciona como uma matriz inerte onde as proteínas podem migrar segundo a sua estrutura primária devido às quebras das ligações covalentes (β -mercaptoetanol ou di-tiotreitol) e marcação negativa das proteínas originadas pelo SDS. (Laemmli, 1970).

Sob a imposição de carga elétrica, estes resultados são transferidos para uma membrana (de nitrocelulose, fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou de nylon) que é então incubada com anticorpos específicos para a proteína de interesse formando um complexo anticorpo-antigénio. Esse anticorpo é denominado anticorpo primário. A adição do anticorpo secundário comumente conjugado com uma enzima (p.e. peroxidase ou fosfatase alcalina) permite a deteção do complexo anticorpo-antigénio previamente formado. A revelação da deteção das proteínas de interesse na membrana é feita pela adição do substrato dessa enzima. Nos locais onde a enzima está presente

ocorrerá a formação do produto dessa reação evidenciando as regiões onde o anticorpo se ligou (Mahmood, 2012).

4.3.6.2. Procedimento experimental de *western blotting*

O repertório e funcionalidade das imunoglobulinas séricas; IgM e IgG, foi avaliada pela técnica semi-quantitativa *Western blotting* que permite a avaliação da reatividade de anticorpos contra grandes painéis de antígenos segundo Haury (Haury, 1994; Haury, 1997). Neste trabalho as imunoglobulinas foram testadas contra proteínas de superfície de *E. coli*.

4.3.6.2.1. CULTURA CELULAR E EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE *E. COLI*

As células provenientes de uma colônia de *E. coli* k-12 conservadas a -80 °C foram cultivadas em 1 L meio LB líquido, *overnight* a 37 °C com agitação orbital constante de 150 rpm. A cultura foi distribuída por tubos tipo Falcon de 50 mL e as células foram recolhidas por centrifugação a 4°C, 13000 rpm durante 10 min numa centrífuga Multifuge 1S-R. A biomassa foi determinada pela subtração do peso dos tubos vazios ao peso dos tubos com as amostras após centrifugação e secagem a 65 °C na estufa Heratherm™ até o peso se tornar constante. As células de *E. coli* (1 g) foram posteriormente homogeneizadas em 8 mL de tampão de extração de proteínas (Tris 62,5 mM pH 6.8, 2-mercaptoetanol 5%; ditiotreitól 100 mM, aprotinina 1 µg/mL, pepstatina 1 µg/mL e inibidor de proteases TLCK 50 µg/mL) no homogeneizador de tecidos Polytron PT3100. Adicionaram-se 2 mL de SDS 10% à suspensão e procedeu-se à completa homogeneização das proteínas no aparelho de ultrassons (Branson Sonifier 450) por 1 min a 60 Hz. A suspensão foi colocada a 100°C durante 10 min numa placa de aquecimento e seguidamente a 4°C até arrefecer. Centrifugou-se 10 min a 3000 rpm a 4 °C para remover detritos na centrífuga Multifuge 1S-R. Seguiu-se o passo de ultracentrifugação a 4°C do sobrenadante a 10000 rpm durante 10 min no aparelho Beckman L7-55. Filtrou-se o sobrenadante por uma coluna com lã de vidro.

Foram testados vários volumes de extrato de proteínas diluída em tampão de aplicação (glicerol 20%, SDS 2%, Tris 62,5 mM, pH 6.8, 2-Mercaptoetanol 5%, azul de

bromofenol 0,02 % P/V) nas mesmas condições do ensaio seguidamente descrito até a frente do azul de bromofenol chegar o fundo do gel para um volume total de aplicação de 120 μ L.

4.3.6.2.2. SDS - PAGE

A separação eletroforética das proteínas extraídas foi realizada por SDS-PAGE. A composição do gel de corrida foi Acrilamida/Bisacrilamida 10% P/V; Tris/HCl 0,1% P/V pH 8.8; dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% P/V; N, N, N', N' – Tetrametiletilenodiamina (TEMED) 0,1 % V/V e persulfato de amônio 0.25% P/V e a composição do gel de concentração foi Acrilamida/Bisacrilamida 4% p/v; Tris/HCl 0,125 M pH 6.8; SDS 0,1% P/V; TEMED 0,08 % V/V e persulfato de amônio 0.05% P/V. Aguardou-se a solidificação do gel de corrida e do gel de concentração em cassetes de montagem com espessura de 1 mm pertencentes às células verticais de eletroforese Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad) sem pente marcador de poços. Foi aplicada água saturada com isobutanol no limite superior do gel de concentração para impedir a desidratação do mesmo, esta solução foi cuidadosamente aspirada antes da aplicação do extrato de proteínas.

Aplicaram-se 60 μ L do extrato de proteínas diluído em 60 μ L de solução de aplicação contendo azul de bromofenol. Procedeu-se à corrida cobrindo toda a cassette com tampão apropriado pH 8.3 (tris base 0,05M; glicina 0,38 M; SDS 0,1%). Os extratos proteicos correram a 12,5 mA até que a frente de azul de bromofenol atingir o final do gel.

4.3.6.2.3. TRANSFERÊNCIA

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose numa eletrotransferência semi-seca durante 90 min 0.8 mA/cm² na unidade de transferência *Semi Dry Electroblotter* (Sartorius). Para a transferência foi utilizado um sistema de sanduíche de três tampões como descrito (Kyhse-Andersen, 1984). Foram dispostas seis camadas de papel Whatman previamente cortadas (9x7 cm) embebidas em Tampão 1 (Tris HCl 0,3 M pH 10.4; etanol 20 % V/V) diretamente no ânodo, seguidas por três camadas de papel *Whatman* (9x7 cm) embebidas em Tampão 2 (Tris HCl 0,025 M, pH 10.4, etanol 20% V/V). Em seguida, a membrana de nitrocelulose (9x7 cm) e o gel (8,6x6 cm) e finalmente 9 camadas de papel Whatman (8,6x6 cm) embebidas em Tampão 3 (Tris HCl 0,025 M pH 9.4 etanol 20 V/V, ácido aminohexanóico 0,04 M) foram colocados em cima. Após a transferência, as

membranas foram bloqueadas *overnight* com PBS+0,2% Tween à temperatura ambiente com agitação leve.

4.3.6.2.4. INCUBAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DAS MEMBRANAS

A incubação de diferentes soros com a membrana foi realizada utilizando as unidades de incubação Miniblotter[®] 28 SL. Durante o posicionamento da membrana nas unidades de incubação, foram colocados na parte posterior da membrana de nitrocelulose uma esponja fina e película aderente para perfeito selamento das unidades evitando a evaporação das amostras de soro dos canais de incubação nas *cassettes*. Antes da aplicação dos soros, foi aspirado o volume de PBS+0,2% Tween remanescente de cada um dos canais de incubação.

Em cada canal foram aplicados 50 µL das amostras de soro previamente diluídas em PBS+0,2% Tween na concentração de 1 mg/mL. As mostras foram incubadas durante 4 h à temperatura ambiente com agitação 5-6 agitações por min no agitador de placas. As amostras de soro foram aspiradas e as membranas foram lavadas 4 vezes durante 10 s com PBS/Tween 0,2% e seguidas de uma lavagem prolongada (1h) na mesma agitação descrita. Todos os soros estudados foram aplicados em duas membranas independentes de forma a testar as reatividades das imunoglobulinas IgG e IgM.

Para revelação da reatividade da IgM, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgM conjugado com fosfatase alcalina 1 µL/mL diluído em PBS+0,2% Tween durante 1,5 h com agitação num volume total de 10 mL por membrana e posteriormente lavada com PBS+0,2% Tween e 2 vezes com TBS (Tris base 0,05 M, NaCl 0,138 M, KCl 0,027 M, pH 8.0) para completa remoção do reagente Tween.

Repetiu-se o procedimento para a revelação da reatividade da IgG adicionando o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina 1 µL/mL a uma nova membrana previamente incubada com os soros.

As imunoreatividades foram reveladas com a adição dos substratos NBT (3,3 µl/mL) e e BCIP (1,65 µl/mL) diluídos em tampão de fosfatase alcalina (Tris 0,1 M, MgCl₂ – 6H₂O 5 mM; NaCl 0,01 M, pH 9.5) num volume total de 10 mL durante 10 minutos em agitação. Após desenvolvimento apropriado lavaram-se as membranas diversas vezes com água destilada para interromper a reação como descrito anteriormente (Kyhse-Andersen, 1984).

As imunoreatividades foram registadas em suporte digital através de um *scanner* de alta resolução como descrito por Haury (Haury, 1997) Posteriormente, as membranas foram coradas com 10 mL de ouro coloidal *Protogold* (solução de coloração de

proteínas) *overnight* com agitação suave, revelando a posição de migração das proteínas. A reação foi interrompida com três lavagens com água destilada. As imagens das proteínas coradas foram transferidas para suporte digital através de um *scanner* de alta resolução da mesma forma descrita. O perfil de densidade ótica da coloração da proteína é adquirida exatamente no espaço entre as pistas onde os soros foram testados, de modo que a imunocoloração não interfira com a coloração de ouro coloidal. A comparação entre quaisquer dois perfis de imunoreactividade pode ser feito comparativamente aos seus perfis de proteínas correspondentes. Os perfis de migração proteínas que foram corrigidos para defeitos migração eletroforética por sobreposição de picos de proteína correspondentes (Haury, 1997).

5. Resultados

5.1. Caracterização da amostra de doentes com LNH B

Os 53 doentes com LNH B recrutados foram estudados prospectivamente no momento de diagnóstico e até 13 meses após o fim da terapêutica mais adequada para o tipo de neoplasia. Os doentes foram agrupados pelo tipo de terapêutica: 9 indivíduos foram tratados com o anticorpo rituximab (R), 11 indivíduos foram tratados com regimes de quimioterapia (QT) e 33 foram tratados com a combinação de ambas as terapias (RQT).

A Tabela 12 apresenta a caracterização clínica e demográfica dos doentes com LNH B por grupo de tratamento. De forma breve, a população de doentes contou com 33 homens (62%) cuja mediana de idade no momento do diagnóstico foi de 62 anos [min: 26; máx: 84]. Para além do grupo de doentes em monoterapia com R, o grupo tratado com QT contou com 7 doentes tratados com fludarabina + ciclofosfamida (FC) (63%) e os restantes 4 doentes tratados com clorambucil + prednisolona (ClorP) enquanto no grupo de tratamento com RQT, os regimes de terapia mais comuns foram R + ciclofosfamida + adriamicina (hidroxidaunorubicina) + vincristina (Oncovin®) + prednisolona (RCHOP) prescritos a 16 doentes (48%) e rituximab + ciclofosfamida + vincristina + prednisolona (RCVP) prescritos a 10 doentes (30%). O número mediano de ciclos terapêuticos foi de 4 em R; 4 em QT e 8 em RQT.

O tipo de LHN B mais frequente no grupo terapêutico R foi o linfoma B da zona marginal (MALT) gástrico diagnosticado em 6 doentes (67%). O grupo tratado com QT contou com 9 doentes diagnosticados com leucemia linfática crónica (82%) e no grupo de tratamento RQT foram diagnosticados 14 doentes com linfoma folicular (42%) e 12 doentes com linfoma B difuso de grandes células (36%).

A percentagem de indivíduos em cumprimento de primeira linha de tratamento foram 67% tratados com R; 73% tratados com QT e 94% tratados com RQT. Os doentes que cumpriram duas ou mais linhas de terapêutica anteriores foram incluídos no estudo quando verificado um intervalo mínimo de 2 anos em relação ao último tratamento. Para a análise estatística foram incluídos os resultados dos doentes com remissão completa e parcial: 8 (89%) em R; 10 (91%) em QT e 30 (91%) em RQT sendo que os doentes que não responderam ao tratamento foram excluídos da análise nos instantes pós terapêutica (5 doentes).

Tabela 12. Caracterização clínica e demográfica dos doentes com LNHB participantes no estudo.

População de doentes (n=53)			
Idade no diagnóstico (anos)			
mediana [min:máx]	62 [26;84]		
≥ 60 anos, n (%)	32 (60%)		
Sexo masculino, n (%)			
33 (62%)			
Grupo terapêutico	Rituximab	Quimioterapia	Rituximab + Quimioterapia
Doentes, n (%)	9 (17%)	11 (21%)	33 (62%)
Idade no diagnóstico (anos)			
mediana [min:máx]	62 [26;81]	62 [46;84]	64 [33;84]
≥ 60 anos, n (%)	5 (56%)	9 (81%)	18 (54%)
Sexo masculino, n (%)			
	6 (67%)	8 (73%)	19 (58%)
Raça caucasiana, n (%)			
	9 (100%)	11 (100%)	31 (94%)
Remissão			
Completa, n (%)	7 (78%)	9 (82%)	26 (79%)
Parcial, n (%)	1 (11%)	1 (9%)	4 (12%)
Mediana de ciclos de			
	4 [2:4]	4 [2:12]	8 [2:19]
Linha terapêutica			
Mediana [min:máx]	1 [1:2]	1 [1:2]	1 [1:5]
1, n (%)	6 (67%)	8 (73%)	31 (94%)
2, n (%)	3 (33%)	3 (27%)	1 (3%)
≥ 3, n (%)			1(3%)
LNH B diagnosticado, n (%)			
	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma B da zona marginal (MALT) gástrica, 6 (67%) • Linfoma B da zona marginal (MALT) tiroideia, 1 (11%) • Linfoma B da zona marginal (MALT), 1 (11%) • LNHB de baixo grau NOS*, 1 (11%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Leucemia linfática crónica, 9 (82%) • Linfoma linfoplasmocítico difuso, 6 (9%) • Linfoma folicular, 1 (9%) 	<ul style="list-style-type: none"> • Linfoma folicular, 14 (42%) • Linfoma B difuso de grandes células, 12 (36%) • Linfoma do Manto, 3 (9%) • Linfoma B da zona extranodal tipo MALT, 3 (9%) • Linfoma B de baixo grau NOS*, 1 (4%)
Estádio de LNHB, n (%)			
I	3 (33%)	3 (27%)	2 (6%)
II	4 (44%)	3 (27%)	10 (30%)
III			2 (6%)
VI	2 (22%)	5 (45%)	19 (58%)
Regimes terapêuticos, n (%)			
	<ul style="list-style-type: none"> • Rituximab 9 (100%) 	<ul style="list-style-type: none"> • ClorP - 4 (37%) • FC - 7 (67%) 	<ul style="list-style-type: none"> • RCHOP - 16 (48%) • RCVP - 10 (30%) • RB+FC - 1 (3%) • RCHOP+ESHAP - 1 (3%) • RCHOP+MP - 1 (3%) • RCHOP+RCVP+CMOPP - 1 (3%) • RCVP+RCNOP+RCHOP - 1 (3%) • RCVP+RCHOP+ESHAP -1 (3%)

Regimes de terapêutica utilizados: ClorP - Clorambucil + Prednisolona; CMOPP - Ciclofosfamida + Mecloretamina, Vincristina (Oncovin®) + Procarbazina + Prednisolona; ESHAP - Etoposido + Metilprednisolona (solu-Medrol®), Citarabina (Ara-C) + Cisplatina; FC - Fludarabina + Ciclofosfamida; FCM - Fludarabina + Ciclofosfamida + Mitoxantrona; MP - Mitoxantrona + Prednisolona; R - Rituximab; RB - Rituximab + Bendamustina; RCHOP - Rituximab + Ciclofosfamida + Adriamicina (hidroxidaunorubicina)+ Vincristina (Oncovin®) + Prednisolona; RCNOP - Rituximab + Ciclofosfamida + Doxorubicina + Vincristina + Prednisolona; RCVP - Rituximab + ciclofosfamida + vincristina + prednisolona; RFC - Rituximab + Fludarabina + Ciclofosfamida. *Not otherwise specified

5.2. Análise de sobrevivência

A análise de sobrevivência foi realizada sobre a população de 53 doentes com LNHB de cada grupo terapêutico monitorizados periodicamente desde o momento de diagnóstico até 13 meses após o fim do tratamento.

Os instantes de tempo selecionados para a monitorização pós terapêutica foram: um mês após o fim da terapêutica e posteriormente em intervalos de três meses até aos 13 meses após o fim da terapêutica. A designação dos instantes e períodos de tempo estudados é a mesma ao longo do texto (Tabela 13).

Tabela 13. Instantes e períodos de tempo estudados e abreviaturas correspondentes, usadas ao longo do texto. aft – após o fim do tratamento.

Instante de tempo	Abreviatura	Período de tempo	Abreviatura
Diagnóstico	T0	Tratamento	T0'
1 mês aft	T1	fim do tratamento - 1 Mês aft	T1'
4 meses aft	T2	1 Mês aft - 4 Meses aft	T2'
7 meses aft	T3	4 Meses aft - 7 Meses aft	T3'
10 meses aft	T4	7 Meses aft - 10 Meses aft	T4'
13 meses aft	T5	10 Meses aft - 13 Meses aft	T5'

Durante o estudo foram registados 6 óbitos na população de doentes, resultando numa sobrevivência global de 89% no final do acompanhamento (Tabela 14). As 4 ocorrências registadas durante o período de tratamento (T0') e 2 ocorrências entre os 10 e os 13 meses após o fim do tratamento (T5') foram atribuídas aos LNH diagnosticados. As taxas de sobrevivência nos três grupos estudados são mostradas na Tabela 14.

Tabela 14. Taxas de sobrevivência global do total de doentes com LNH B e por grupo terapêutico.

Grupo	Período	Doentes em risco	Número de eventos	Taxa de sobrevivência (%)	σ
Doentes	T0'	53	4	93	0,036
LNH B	T5'	47	2	89	0,044
R	T0'	9	1	89	0,105
QT	T0'	11	1	91	0,087
	T5'	10	1	82	0,116
RQT	T0'	33	2	94	0,042
	T5'	29	1	91	0,051

Durante o seguimento foram registados no grupo de doentes tratados com RQT uma proposta para transplante de medula no período T2' e um abandono voluntário do estudo no período T4' pelo que deixaram de fazer parte do estudo a partir dessas

ocasiões. Em ambas as situações, os dados dos doentes foram incluídos no estudo até ao momento de exclusão dos indivíduos.

Na Figura 25 estão representadas as curvas de Kaplan-Meier que representam a taxa de sobrevivência dos doentes com LNH B por grupo terapêutico ao longo do período do estudo. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos terapêuticos.

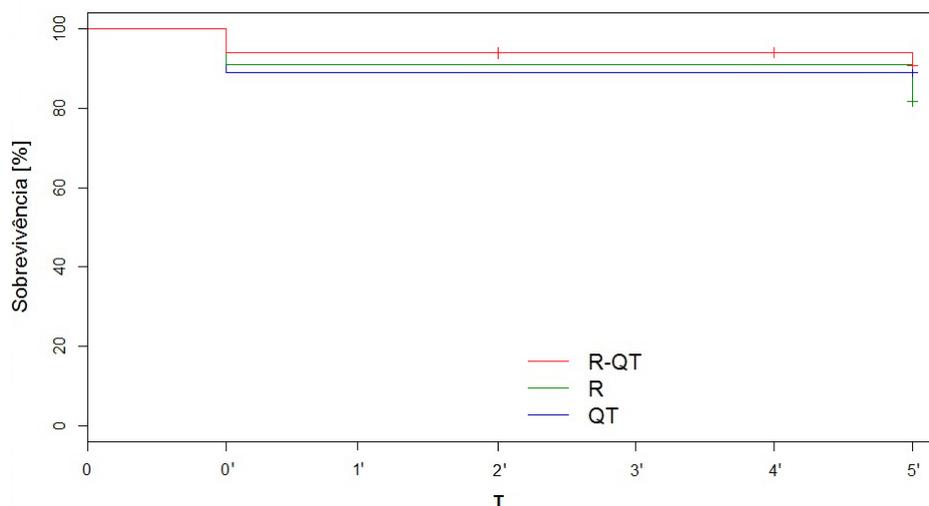


Figura 25. Curvas de *Kaplan-Meier* representativas da sobrevivência dos doentes com LNH B para os grupos de tratamento com R, QT e RQT utilizando a função *surv.fit* da biblioteca *R survival* (T. Therneau, 2015; T. M. Therneau & Grambsch, 2000).

5.3. Estudo das populações e subpopulações linfocitárias

5.3.1. LEUCÓCITOS

Os leucócitos são um grupo heterogéneo de células mononucleadas que podem ser classificadas em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e agranulócitos (monócitos e linfócitos). Estas células têm um papel importante na imunidade e por conseguinte no combate às infeções e células estranhas (Greer, 2013).

O estudo desta população, à semelhança das restantes populações e subpopulações analisadas, envolveu a realização de testes estatísticos comparativos entre cada instante de tempo intra e inter grupos terapêuticos.

No momento T0, os resultados revelaram unicamente diferenças significativas entre as medianas dos grupos terapêuticos QT ($10,60 \times 10^3/\mu\text{L}$) e R ($5,55 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p < 0,05$). Os valores elevados de leucócitos/ μL observados no instante T0 no grupo de doentes tratados com QT poder-se-ão dever à ocorrência de episódios de infeção sistémica no momento de diagnóstico ocasionando picos de produção de neutrófilos bem como ao tipo de LNH B diagnosticado maioritariamente neste grupo (leucemia linfática crónica 9/11 doentes). Na Figura 26 estão representados os resultados do número de leucócitos/ μL de cada indivíduo no instante T0 e ao longo do período de seguimento de 13 meses após o fim do tratamento (T1 – T5). As curvas mostram as medianas de cada tratamento ao longo do tempo em cada grupo terapêutico. Para efeitos de melhor visualização gráfica, não são apresentadas barras de erro relativamente ao primeiro e ao terceiro quartis bem como os valores discrepantes, apesar destes últimos serem contemplados na análise.

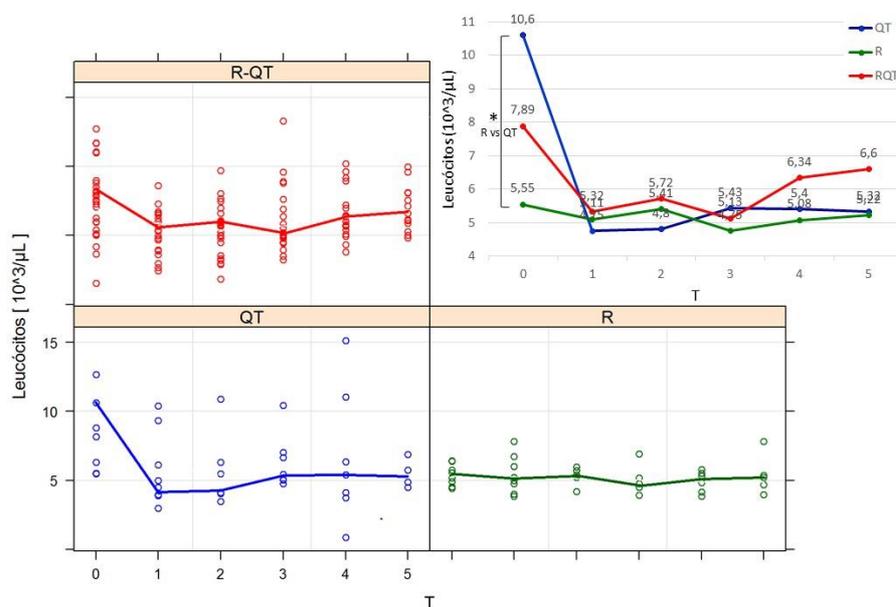


Figura 26. Representação gráfica do número de leucócitos por microlitro ($10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis das medianas em cada instante de tempo, ver secção 9. Anexos). Valores de referência: $4-10 \times 10^3/\mu\text{L}$. * $p < 0,05$

No período T1-T5 não foram encontradas diferenças estatísticas entre a contagem de leucócitos entre grupos de tratamento, sendo no entanto registada uma diminuição da mediana da contagem destas células em todos os grupos de tratamento nestes instantes. Também não foram encontradas diferenças estatísticas em qualquer dos grupos entre os valores das medianas nos períodos pós terapêutica quando comparados com os valores no diagnóstico.

Durante todo o período de estudo, foram observadas contagens de leucócitos/ μL abaixo dos valores de referência ($4-10 \times 10^3/\mu\text{L}$) em alguns indivíduos pertencentes às três terapêuticas. Ao atingir concentrações leucocitárias abaixo do nível de referência (leucopénia), um tipo de efeito adverso destes 3 tipos de tratamento (Lyman, 2014; Rozman, 2012; Voog, 2003), estes doentes poderão mostrar suscetibilidade à contração de infeções.

Para estudar esta ocorrência foram realizadas curvas de sobrevivência livre de eventos de primeiro episódio de leucopénia nos três grupos terapêuticos ao longo dos períodos entre avaliações ($T0'-T5'$). É de notar que nesta análise, a ocorrência de um evento num determinado momento, inviabiliza a entrada desse indivíduo na contagem seguinte.

A Tabela 15 e a Figura 27 mostram as taxas sobrevivência livre de primeiros eventos de leucopénia em cada grupo terapêutico ao longo dos períodos entre avaliações ($T0'-T5'$).

Tabela 15. Taxas de sobrevivência livre de primeiros eventos de leucopénia em cada grupo terapêutico dos doentes com LNH B em cada período de estudo. σ – desvio padrão.

Grupo	Período	Doentes em risco	Número de eventos	Taxa de sobrevivência (%)	σ
R	T1'	9	1	89	0,105
	T5'	8	1	78	0,139
QT	T1'	11	3	73	0,134
	T2'	8	2	55	0,150
	T4'	6	1	46	0,150
RQT	T0'	33	2	94	0,042
	T1'	31	5	79	0,071
	T2'	26	5	64	0,084

O grupo tratado com QT mostrou ser o grupo com maior número de primeiros eventos de leucopénia ao longo do tempo de seguimento, com apenas 45,5% ($n= 6$) de doentes livres de ocorrência. No fim do acompanhamento, o grupo com menos casos de leucopénia mostrou ser o grupo tratado com R (63,6%, $n= 2$) seguido de RQT (77,8%, $n= 12$). Não foram assinaladas diferenças significativas no número de casos de leucopénia entre tratamentos.

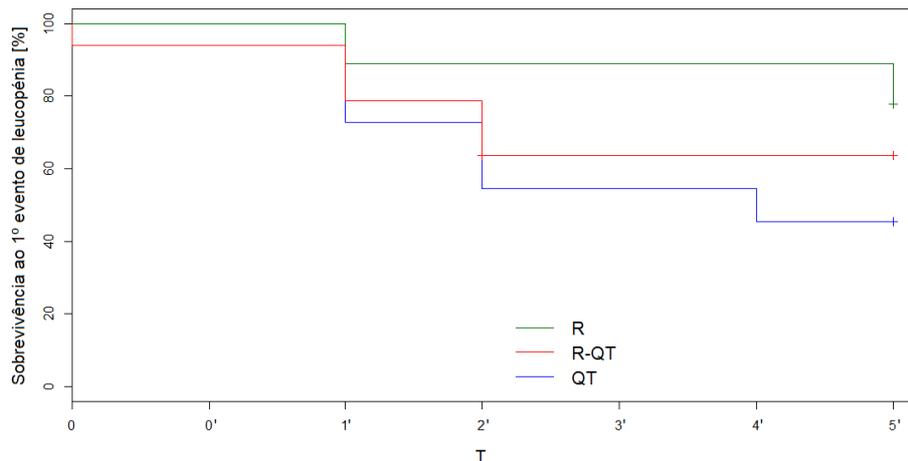


Figura 27. Representação gráfica das taxas de primeiros eventos de leucopénia nos doentes com LNH B nos grupos de tratamento com QT, R e RQT no diagnóstico (T0) e nos períodos de tratamento (T0') e de seguimento (T1-T5).

5.3.2. LINFÓCITOS TOTAIS

A população linfocitária abrange o número total de linfócitos B, T e NK (*natural killer*). A maioria das estratégias terapêuticas altera a dinâmica deste compartimento conduzindo à linfocitopénia. A recuperação desta população depende de múltiplos fatores, incluindo a intensidade dos regimes usados. No entanto, os doentes com LNH B demonstram frequentemente sinais clínicos e biológicos de imunossupressão antes de iniciar o tratamento (Kim, 2011a).

De forma similar aos leucócitos, o número de linfócitos total foi obtido por análise no contador hematológico automático. Apesar de ser possível a determinação de leucócitos pela técnica de citometria de fluxo pela marcação de CD45, ainda não é conhecido um grupamento de diferenciação (CD) *pan* de linfócitos totais (Autissier, 2010).

O estudo da variação do número de linfócitos nos três grupos de tratamento mostrou unicamente diferenças estatísticas no momento T0 no qual o grupo tratado com QT (med = $2,91 \times 10^3/\mu\text{L}$) se apresentou superior ao grupo tratado com RQT (med = $1,60 \times 10^3/\mu\text{L}$; $p < 0,05$) (Figura 28). Esta diferença pode verificar-se devido ao tipo de doença predominantemente diagnosticada nestes grupos: leucemia linfática crónica (no grupo QT) e linfoma folicular e linfoma B difuso de grandes células (em RQT).

Nos instantes T1-T3, verificou-se uma diminuição não significativa da mediana do número de linfócitos nos grupos de tratamento com QT e R em comparação com o momento T0. O grupo de tratamento com RQT superou o valor de mediana no diagnóstico ($1,60 \times 10^3/\mu\text{L}$) a partir de T4 (med_{T4} = $1,65 \times 10^3/\mu\text{L}$; med_{T5} = $1,76 \times 10^3/\mu\text{L}$). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre grupos.

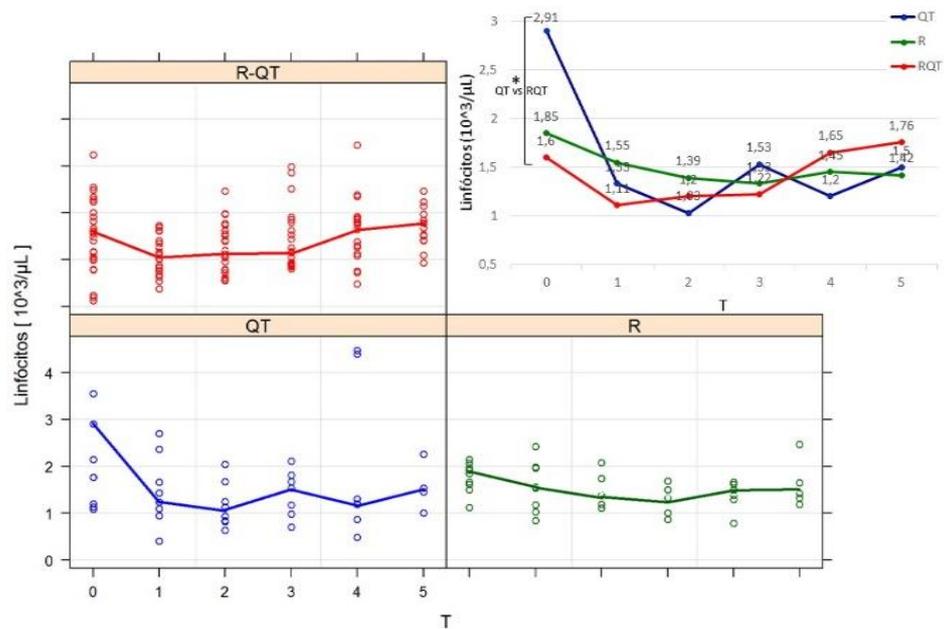


Figura 28. Representação gráfica do número de linfócitos por microlitro ($10^3/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis, ver secção 9. Anexos). Intervalo de referência $1-4 \times 10^3/\mu\text{L}$. * $p < 0,05$

Foram verificados vários episódios de linfopenia nos indivíduos de cada grupo de tratamento. Este efeito adverso, muito comum nas terapêuticas antineoplásicas, caracteriza-se por atingir concentrações abaixo do nível mínimo de referência ($< 1,0 \times 10^3/\mu\text{L}$) (Aoki, 2012; Porrata, 2010). A Tabela 16 e a Figura 29 mostram as taxas sobrevivência livre de primeiros eventos de linfopenia no período T0'-T5'. Não foram encontradas diferenças no número de eventos de linfopenia entre grupos.

Tabela 16. Taxa sobrevivência livre de primeiros eventos de linfopenia em cada grupo terapêutico de doentes com LNH B assinalados em cada período.

Grupo	Tempo	Doentes em risco	Número de eventos	Taxa de sobrevivência (%)	σ
R	T1	9	2	78	0,139
	T3	7	1	67	0,157
	T4	6	1	56	0,166
QT	T1	11	2	82	0,116
	T2	8	3	51	0,158
RQT	T0	33	6	82	0,067
	T1	27	6	64	0,084
	T2	20	1	60	0,085
	T3	19	1	57	0,087

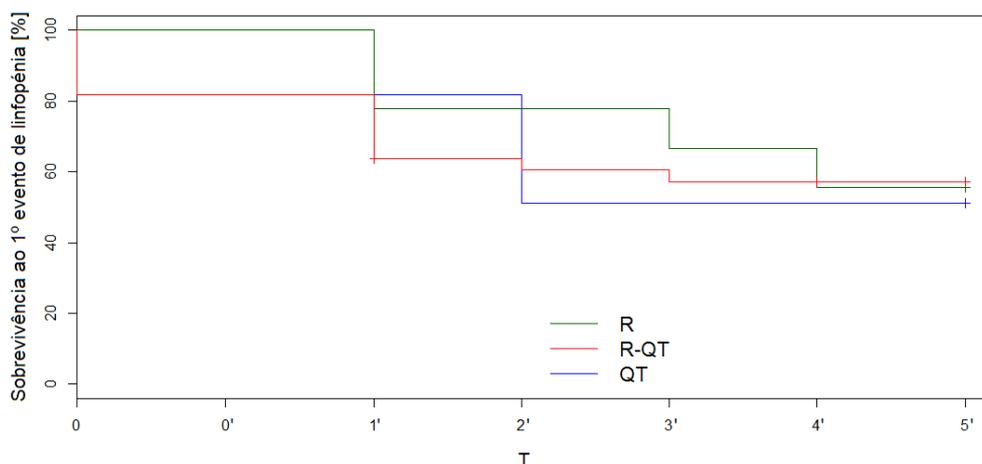


Figura 29. Representação gráfica das taxas de primeiros eventos de linfopenia dos doentes com LNH B nos grupos de tratamento com QT, R e RQT no diagnóstico (T0) e no período de seguimento (T1-T5).

5.3.3. LINFÓCITOS B

A ativação de linfócitos B por antígenos, especialmente proteínas monoméricas, requer tanto a ligação do antígeno pela imunoglobulina de superfície das células B (BCR) como a interação da célula B com as células auxiliaadoras T (CD4) específicas do antígeno induzindo uma fase de proliferação de células B vigorosa provocando a expansão clonal das células B *naïve* em células plasmáticas secretoras de anticorpos ou linfócitos B de memória. A ativação linfocitária B independente de linfócitos T envolve unicamente a identificação do antígeno, nomeadamente lipopolissacarídeos bacterianos ou de cápsulas bacterianas conduzindo à diferenciação em plasmócitos (Janeway, 2001c).

A quantificação de linfócitos B foi feita por citometria de fluxo por marcação com o anticorpo anti-CD19. Este anticorpo, à semelhança do anticorpo anti-CD20, é um marcador *pan* de linfócitos B marcando os diversos estádios de maturação B desde linfócitos pré B até linfócitos B maduros. No entanto, foi descrita a maior afinidade de anticorpos anti-CD19 na deteção de linfócitos B neoplásicos (Ginaldi, 1998).

À semelhança do estudo realizado nas populações anteriormente descritas, os valores medianos de linfócitos B circulantes foram comparados intra e entre grupos terapêuticos em cada instante de tempo. No momento do diagnóstico, os doentes com LNH B do grupo tratado com QT mostraram valor mediano de linfócitos B circulantes (7761,50 / μ L) significativamente superiores aos grupos de tratamento com R (205,95 / μ L, $p < 0,001$) e com RQT (270,00 / μ L; $p < 0,01$) explicados pelo tipo de doença maioritariamente diagnosticada no grupo QT. A eficácia funcional do anticorpo anti CD-

20 na ablação linfocitária B foi verificada em ambos os tratamentos com R e com RQT entre os instantes T1 e T3 não apresentando diferenças significativas entre si. No mesmo período, os grupos de tratamento R e RQT, mostraram valores medianos significativamente inferiores quando comparados com os resultados obtidos em QT (Figura 30).

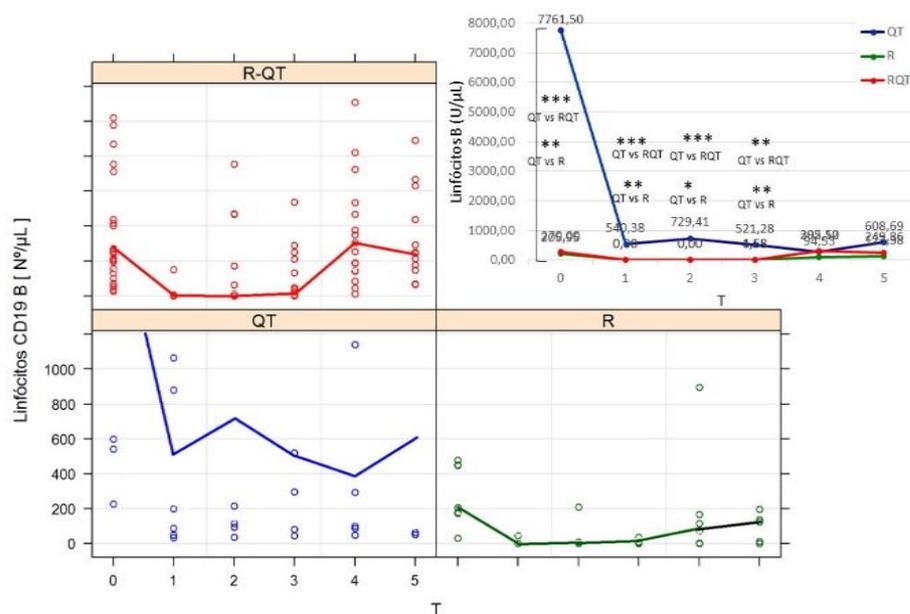


Figura 30. Representação gráfica do número de linfócitos B por microlitro (N/μL) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis, ver secção 9. Anexos). Intervalo de referência: 100-800 /μL. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

No intervalo de tempo T4-T5 foram observados sinais de restabelecimento dos níveis de linfócitos B nos grupos terapêuticos R e RQT, em que os valores medianos se aproximam dos valores do intervalo de referência (100-800 /μL) (Figura 30). Contudo, não foram verificadas diferenças estatísticas entre grupos nem mesmo quando comparados com os valores no diagnóstico, evidenciando sinais de recuperação.

A análise gráfica do perfil linfocitário B ao longo do tempo no grupo de doentes tratados com QT mostra uma diminuição acentuada dos níveis medianos linfocitários B ao longo do período pós terapêutica, não apresentando contudo diferenças estatísticas ao longo do tempo.

5.3.4. LINFÓCITOS T

Os linfócitos T têm a função de coordenar as defesas imunológicas contra vírus, bactérias e fungos bem como na eliminação de células tumorais. Em contexto de tratamento de LNH B, são muito frequentes as ocorrências de infeção tornando estas células cruciais no combate a invasores (Bow, 1998). Os linfócitos T podem ser divididos em duas grandes subpopulações, os linfócitos auxiliares (CD4⁺) e os linfócitos T citotóxicos (CD8⁺) (Greer, 2013).

O estudo da alteração do número de linfócitos T nos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT no momento de diagnóstico e nos instantes posteriores ao fim do tratamento foi realizada de forma a comparar os grupos em cada instante de tempo bem como em cada instante comparativamente com o diagnóstico. No momento do diagnóstico foram encontradas unicamente alterações significativas entre os tratamentos com QT (1724,63/ μ L) e RQT (2448,08/ μ L; $p < 0,05$) (Figura 31). Estes resultados são reveladores do tipo de doença em maioria nestes dois grupos de tratamento (QT - 9/11 leucemia linfática crónica e RQT – 14 linfoma folicular e 12 linfoma B difuso de grandes células). A análise estatística dos resultados não mostrou alterações significativas entre os grupos de tratamento no tempo de seguimento (T1-T5).

A comparação dos resultados de cada instante com o momento no diagnóstico não mostrou quaisquer diferenças em nenhum dos grupos.

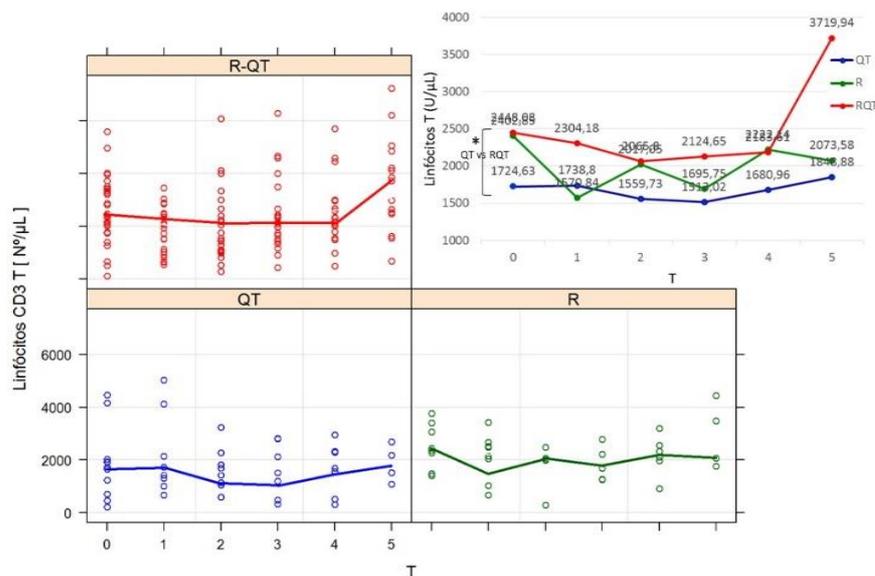


Figura 31. Representação gráfica do número de linfócitos T por microlitro (U/ μ L) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis, ver secção 9. Anexos). Intervalo de referência: 500-2500 / μ L. * $p < 0,05$

5.3.4.1. LINFÓCITOS T AUXILIADORES

Os linfócitos T auxiliares (CD4) após ativação e diferenciação desempenham um papel importante na mediação da resposta imunitária através da secreção de citocinas específicas. Estas células realizam várias funções que vão desde a ativação das células do sistema imunitário inato, dos linfócitos-B, dos linfócitos T citotóxicos, bem como de células não imunes e desempenham um papel crítico na supressão da reação imunitária (Luckheeram, 2012).

O número de linfócitos T CD4/ μL determinado não mostrou quaisquer alterações significativas entre grupos de tratamento nos instantes estudados nem sofreu alterações consideradas estatísticas entre o tempo de seguimento e o momento de diagnóstico em cada um dos tratamentos (Figura 32).

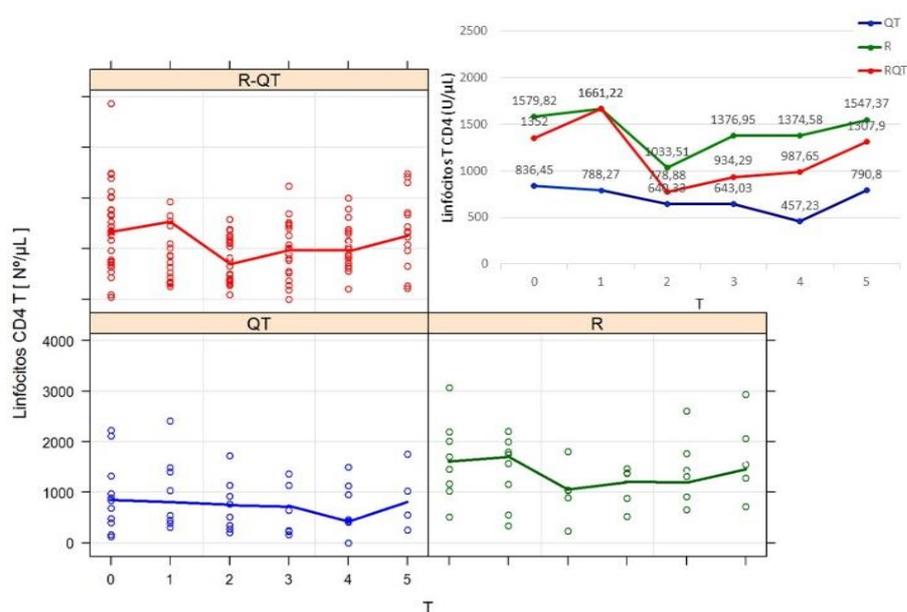


Figura 32. Representação gráfica do número de linfócitos T CD4 ($\text{U}/\mu\text{L}$) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis, ver secção 9. Anexos). Intervalo de referência: 300-1300 μL .

5.3.4.2. LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS

Os linfócitos T citotóxicos (CD8), desempenham um papel chave na resposta mediada por células no sistema imunitário. Estas células, também referidas como linfócitos T citotóxicos, protegem o hospedeiro contra organismos estranhos através de meios líticos e não líticos. A resposta de linfócitos T também elimina as células tumorais

transformadas e regula a resposta imunitária, nomeadamente no combate a vírus (Gulzar, 2004).

O estudo do número de linfócitos T CD8/ μL de sangue apresentou no momento de diagnóstico T0, diferenças estatísticas entre os grupos terapêuticos R (588,11/ μL) e RQT (1076,42/ μL ; $p < 0,05$). Não foram encontradas alterações significativas entre grupos de tratamento nos instantes estudados após fim da terapêutica. A subpopulação linfocitária T CD8 não sofreu alterações consideradas estatísticas entre os tempos de seguimento após fim da terapêutica e o momento de diagnóstico em nenhum um dos tratamentos (Figura 33).

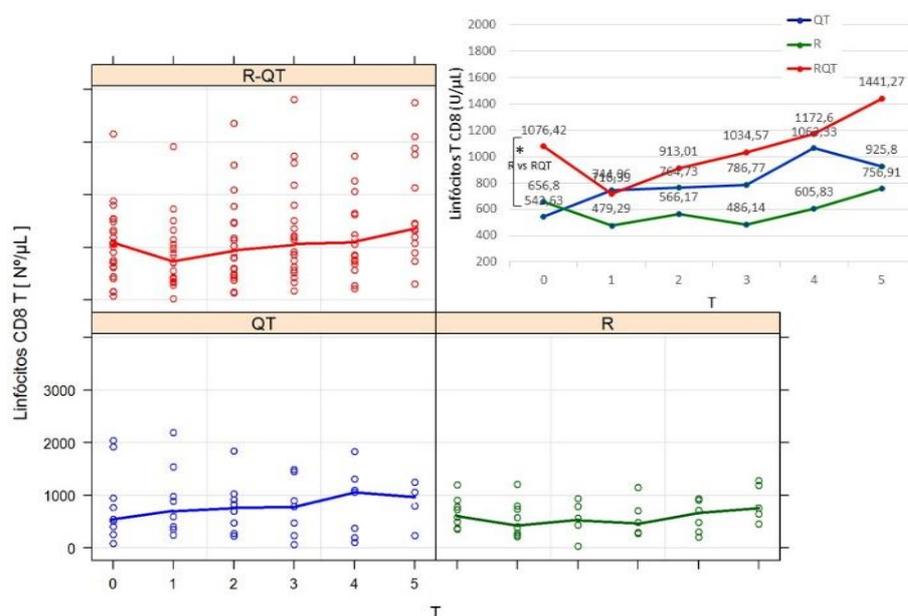


Figura 33. Representação gráfica do número de linfócitos T CD8 (Nº/ μL) no momento do diagnóstico e ao longo do tempo de seguimento nos doentes tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1º e 3º quartis, ver secção 9. Anexos). Intervalo de referência: 100-900 / μL . * $p < 0,05$

5.4. Estudo da produção e reatividade de IgM e IgG

As imunoglobulinas são glicoproteínas sintetizadas e excretadas pelos linfócitos B efetores, também conhecidos como plasmócitos, que uma vez libertadas na circulação sanguínea se podem ligar a antigénios alvo iniciando a sua neutralização ou destruição (Greer, 2013). A IgM é uma classe de imunoglobulinas pentaméricas produzidas na fase aguda da infeção. A IgG (monomérica), apesar de também surgir na fase aguda, é mais

específica possibilitando a proteção contra futuras infecções permanecendo durante toda a vida (Greer, 2013).

5.4.1. IgM

O estudo comparativo dos níveis séricos de IgM não mostrou alteração significativa entre os três grupos terapêuticos, nem mesmo quando equiparados aos valores medianos no momento T0 (Figura 34). Estes resultados sugerem que apesar da depleção de linfócitos B causada pelas terapêuticas, a produção de IgM permanece inalterada possivelmente devido à manutenção da produção de IgM pelos plasmócitos CD20⁻ (Reynolds, 2015).

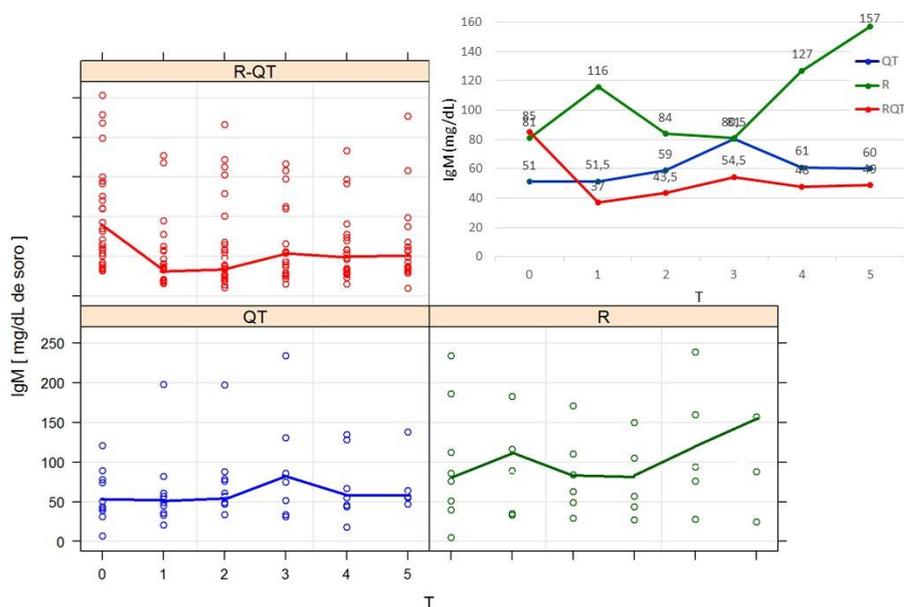


Figura 34. Representação gráfica da alteração da concentração de IgM sérica (mg/dL) no momento do diagnóstico e durante o período de seguimento dos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas (Para consulta 1^o e 3^o quartis, ver secção 9. Anexos). Valores de referência: 40-230 mg/dL.

Para o estudo da reatividade da IgM, os resultados das medições de densidade ótica de cada grupo de tratamento nos instantes após o fim da terapêutica (T1-T5) foram subtraídos os valores de densidade ótica no instante T0. Esta transformação dos dados permitiu eliminar os efeitos da doença, evidenciando unicamente a alteração durante o período de reconstituição imunitária. A primeira componente (fator 1), o único considerado relevante na análise de componentes principais (PCA) ao longo do período T1-T5 não revelou quaisquer diferenças entre grupos terapêuticos ao longo do tempo (Figura 35).

Não foram encontradas correlações entre a análise de PCA da reatividade de IgM e os restantes parâmetros analisados.

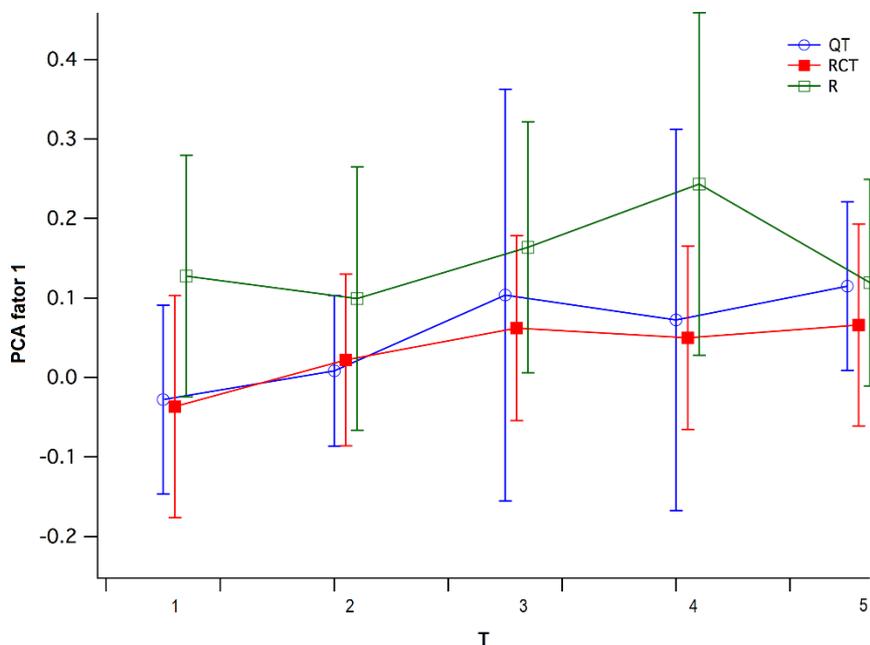


Figura 35. Representação gráfica dos valores médios de PCA (fator 1) da diferença das reatividades de IgM em T-T0 ao longo do tempo de seguimento nos grupos de doentes com LNH B de tratados com QT, R e RQT. As linhas unem as médias de cada grupo. As barras de erro representam o desvio padrão.

5.4.2. IgG

Os níveis séricos de IgG também não revelaram diferenças significativas entre os três grupos terapêuticos ao longo do período após fim da terapêutica. De forma semelhante aos resultados dos níveis séricos de IgM, também não foram encontradas alterações significativas do momento de diagnóstico para os instantes T1-T5 (Figura 36). Similarmente aos resultados de IgM, estes dados não parecem sugerir a influência do tratamento na concentração sérica de IgG parecendo mostrar a manutenção da produção de IgG pelos plasmócitos (Kurokawa, 2011). Os linfócitos B maduros que não expressam CD20 (CD20⁻) não parecem ser afetados pelos tratamentos R, QT e RQT.

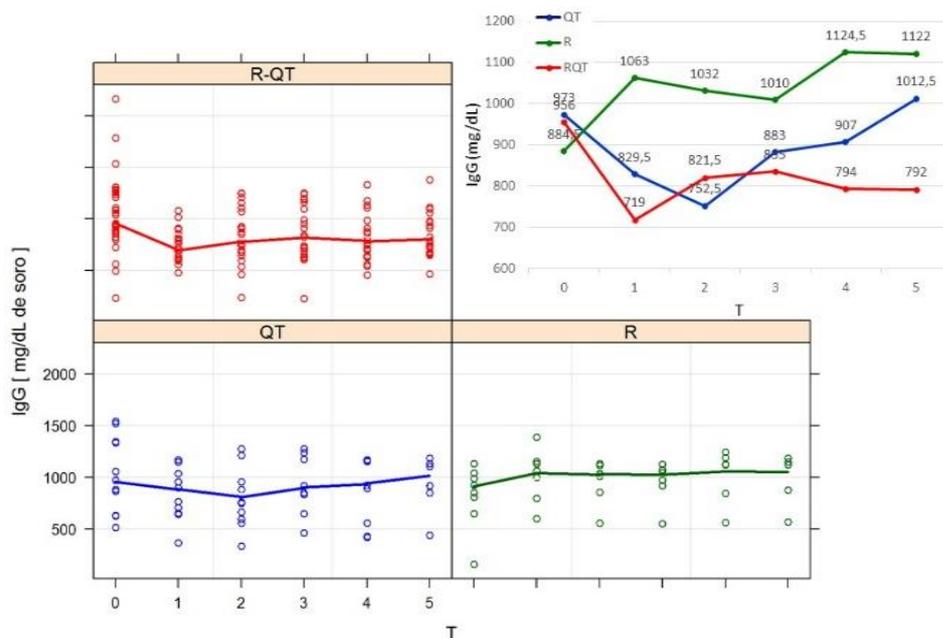


Figura 36. Representação gráfica da alteração da concentração de IgG sérica (mg/dL) no momento do diagnóstico e durante o período de seguimento dos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT. As linhas representam a união das medianas. (Para consulta 1ª e 3ª quartis, ver secção 9. Anexos). Valores de referência: 700-1600 mg/dL.

O procedimento da análise da reatividade de IgG foi realizada de forma análoga ao efetuado com IgM. A análise de componentes principais PCA (fator 1) ao longo do período T1-T5 não revelou diferenças entre grupos terapêuticos (Figura 37).

Não foram encontradas correlações entre a análise de PCA da reatividade de IgG e os restantes parâmetros estudados.

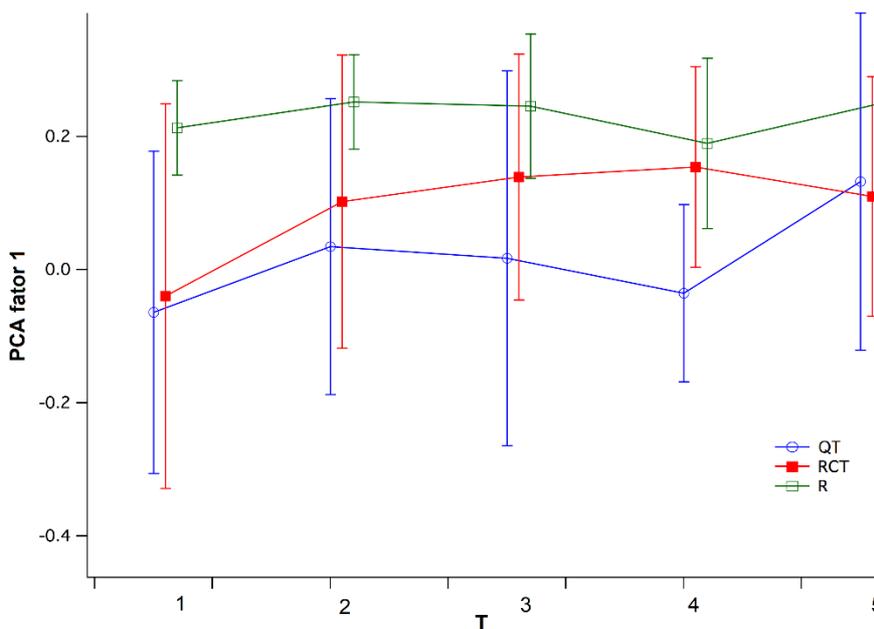


Figura 37. Representação gráfica dos valores médios de PCA (fator 1) da diferença das reatividades de IgG em T-T0 ao longo do tempo de seguimento nos grupos de doentes com LNH B de tratados com QT, R e RQT. As linhas unem as médias de cada grupo. As barras de erro representam o desvio padrão.

5.5. Eventos infecciosos

Os doentes com LNH B apresentam frequentemente episódios infecciosos em contexto de diagnóstico, durante o tratamento e mesmo durante o período de recuperação por consequência das alterações imunológicas consequentes da doença diagnosticada e em consequência da terapêutica durante o tratamento e durante o período de recuperação imunológica (Feugier, 2005).

No presente estudo foram registados os números de ocorrências de infeções bacterianas, virais e fúngicas nos doentes com LNH B dos grupos de terapêutica R, QT e RQT no período de tratamento e períodos T0'– T5'. O grupo de doentes tratados com RQT foi o que apresentou mais intercorrências infecciosas: durante o tratamento, registaram-se neste grupo 52 infeções bacterianas, destacando-se significativamente ($p < 0,05$) dos outros tratamentos (QT – 6 e R – 3) (Figura 38). O grupo tratado com RQT mostrou também ser o que apresentou maior número de infeções virais (Figura 39) e fúngicas (Figura 40) durante o tratamento.

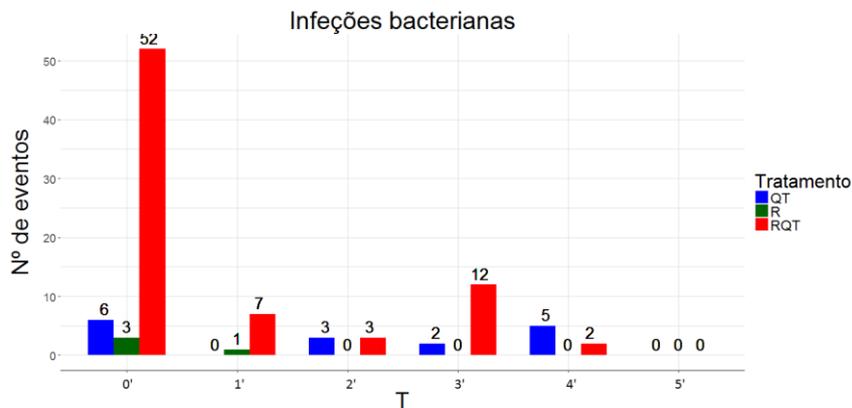


Figura 38. Representação gráfica do número de eventos de infeções bacterianas observadas durante o período de tratamento e entre os períodos de tempo estudados nos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

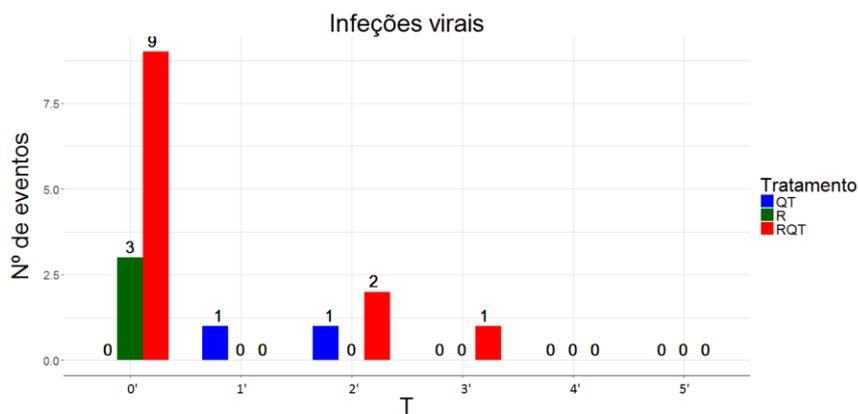


Figura 39. Representação gráfica do número de eventos de infeções virais bacterianas observadas durante o período de tratamento e entre os períodos de tempo estudados nos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

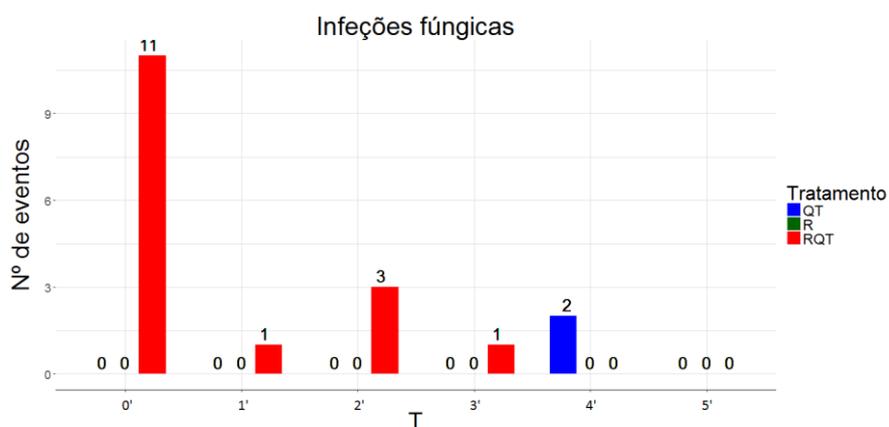


Figura 40. Representação gráfica do número de eventos de infeções fúngicas observadas durante o período de tratamento e entre os períodos de tempo estudados nos doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

Não foram, no entanto, encontradas diferenças estatísticas. Durante o acompanhamento pós terapêutica, o grupo com maior número de infeções foi o RQT, seguido de QT. Os doentes do grupo tratado com R apresentaram unicamente intercorrências durante o tratamento e no período entre o fim do tratamento e um mês após o fim do tratamento.

Não foram encontradas correlações entre o número de infeções assinaladas em cada indivíduo de cada um dos grupos terapêuticos (Tabela 17) e os episódios de leucopénia e linfopénia.

Neste estudo não foi discriminada o grau de infeção sistémica ou localizada, sendo somente contabilizado o número de eventos.

Tabela 17. Número de infeções bacterianas, virais e fúngicas assinaladas aos longo do período T0'-T5' nos doentes pertencentes aos grupos de tratamento com R, QT e RQT.

Terapêutica	Doente	Bacterianas						Virais						Fúngicas						
		T0'	T1'	T2'	T3'	T4'	T5'	T0'	T1'	T2'	T3'	T4'	T5'	T0'	T1'	T2'	T3'	T4'	T5'	
QT	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
	7	0	0	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
R	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	2	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	6	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
RQT	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	4	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	
	10	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	11	3	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	12	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	13	2	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	15	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
	16	4	1	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	
	17	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	18	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	19	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	20	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	21	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	22	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	23	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
27	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
28	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	0		
29	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
32	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0		

6. Discussão

O LNH de células B é uma neoplasia do sistema imunitário que provoca frequentemente obstáculos às respostas imunológicas dos doentes, sendo muitas vezes diagnosticados em contexto de infeção. Adicionalmente, as estratégias terapêuticas alteram também por si, a dinâmica dos compartimentos imunológicos. Neste trabalho pretendeu-se clarificar a influência dos protocolos de tratamento com imunoterapia, quimioterapia e a associação de ambos nos parâmetros celulares e humorais nos doentes com LNH B sob tratamento e no período imediato ao final do tratamento. Para tal foram caracterizadas as populações linfocitárias antes e após a terapêutica. Os dados demográficos dos doentes foram examinados, bem com as diferenças entre o número e tipo intercorrências infecciosas.

Os indivíduos com LNH B recrutados aquando do diagnóstico apresentaram uma mediana da idade de 62 anos [55; 71], sendo que 60% dos doentes tinham idade superior a 60 anos. Estes resultados mostraram-se concordantes com o descrito noutros trabalhos de investigação (Ferlay, 2015). A amostra contou com 60% de indivíduos do sexo masculino acompanhando a proporção de 3 homens: 2 mulheres como descrita na literatura (Fisher, 2004; Shankland, 2012).

Apesar de não ser o objetivo primário deste estudo, foi avaliada a sobrevivência global dos doentes recrutados. Esta análise não revelou diferenças estatísticas entre grupos, mostrando contudo uma menor taxa de sobrevivência no grupo de tratados com QT ao fim de 13 meses de seguimento (82%) comparativamente com R (89%) e RQT (91%). Uma das limitações deste estudo prende-se com o fato de o número de doentes tratados com QT ser muito limitado (11), uma vez que são observadas em contexto clínico taxas de sobrevivência superiores a 94% ao fim de um ano pós tratamento em doentes com leucemia linfática crónica em maioria neste grupo (9/11 doentes) (Eichhorst, 2006). Outra das limitações prende-se com o período de seguimento ter sido apenas de 13 meses após o fim do tratamento. Este tempo é considerado reduzido, incapacitando o espelhamento das taxas de sobrevivência já comprovadas (Eichhorst, 2006).

No momento do diagnóstico, foram assinaladas diferenças significativamente superiores no grupo QT (med = $10,60 \times 10^3/\mu\text{L}$) relativamente ao grupo R (med = $5,55/\mu\text{L}$) quanto ao número de leucócitos/ μL . Estes resultados podem indicar a presença muito frequente de episódios de infeção sistémica em contexto de diagnóstico nos doentes com leucemia linfática crónica. Em situações de infeção o número de leucócitos aumenta face ao aumento do número de neutrófilos mobilizados para o sangue periférico (Hallek, 2008; Mantovani, 2011). O subtipo de linfoma presente no grupo de tratamento com R: linfomas tipo MALT com localização gástrica (6 doentes), tiroideia (1 doente) e cutânea (1 doente) são casos de linfoma localizados e não envolvem consequentemente o aumento do número de leucócitos no sangue periférico. No mesmo instante, foi observada uma linfocitose significativa no grupo de doentes tratados com QT (med = $2,91 \times 10^3/\mu\text{L}$) comparativamente como grupo tratado com RQT (med = $1,60 \times 10^3/\mu\text{L}$). Estes resultados podem dever-se ao aumento característico do número de linfócitos periféricos nos doentes com leucemia linfática crónica (LLC) em contraste com os doentes tratados com RQT maioritariamente diagnosticados com linfoma folicular (42%) e linfoma B difuso de grandes células (LNH BDGC) (36%). Os doentes com LLC apresentam normalmente linfocitose periférica, enquanto os restantes (LNH Folicular e LNH BDGC) apresentam acumulação de linfócitos nos ganglios linfáticos. Durante o seguimento foram assinalados eventos de leucopénia e linfocitopénia nos três grupos de tratamento, sem diferenças significativas entre os grupos. A presença de episódios de leucolinfocitopénia poderá contudo estar relacionado com a eficácia terapêutica quer a nível periférico, como a nível localizado (Kim, 2011b).

O número de linfócitos B mostrou-se aumentado no momento do diagnóstico no grupo de tratamento com QT (med = $7761,50/\mu\text{L}$) comparativamente aos tratamentos com imunoterapia: R ($205,95/\mu\text{L}$) e RQT ($270,00/\mu\text{L}$), mais uma vez apoiando o efeito característicos da leucemia linfática crónica no aumento de linfócitos B periféricos em contraste com as doenças tratadas com R e RQT (outros sub-tipos de LNH B). A rápida depleção de linfócitos B após o tratamento com imunoterapia (R e RQT) deve-se à eficácia na atuação do anticorpo monoclonal anti CD20. A recuperação numérica de linfócitos B periféricos nos doentes tratados com R e RQT notou-se a partir do instante T4 (10 meses após o fim da terapia). Este resultado mostra-se tardio em relação a outros estudos envolvendo a reconstituição imunitária que mencionam sinais de recuperação B aos 4 meses após o fim do tratamento (Kurokawa, 2011).

A análise comparativa entre os níveis de linfócitos T CD3 entre grupos encontrou diferença significativa entre os tratamentos com QT ($1724,63/\mu\text{L}$) e RQT ($2448,08/\mu\text{L}$),

$p < 0,05$) no momento do diagnóstico. Apesar da diferença numérica, este resultado não têm significado do ponto de vista biológico. No entanto, por haver alteração estatística mesmo que injustificada biologicamente, foram analisados os números periféricos das subpopulações linfocitárias T: CD4 e CD8. A análise das subpopulações revelou unicamente diferenças estatísticas nos níveis medianos de linfócitos CD8⁺ no momentos de diagnóstico entre os grupos tratados com R (588,11/ μ L) e RQT (1076,42/ μ L; $p < 0,05$). Similarmente, não foram encontradas quaisquer diferenças com justificação clínica sugerindo a manutenção do compartimento T em contexto de imunoterapia, quimioterapia e ambos, pelo menos durante o curto período de seguimento pós terapêutica analisado neste trabalho.

A avaliação das concentrações séricas de IgG e IgM não mostrou alterações, o que nega a evidência da influência dos tratamentos ao longo do seguimento quanto aos níveis séricos de imunoglobulinas. Estes resultados parecem sugerir a manutenção da quantidade e função de plasmócitos tanto produtores de IgM como de IgG em todos os tratamentos. Porém este tema ainda se encontra em debate na literatura, já que há relatos da influência do tratamento com rituximab na recuperação sérica de IgM nos primeiros meses após terapia. Este fato pode atribuir-se à produção de IgM por linfócitos CD20⁺ (linfo-plasmócitos) e portanto potencialmente afetadas pelo tratamento (Kurokawa, 2011; Levine, 1999). A manutenção de IgG é menos controversa havendo consenso na produção de IgG por plasmócitos CD20⁻ e, por isso, não afetados pelo tratamento com rituximab (Kurokawa, 2011). Os resultados da comparação de reatividades das imunoglobulinas IgM e IgG, também parecem sugerir inalteração da diversidade biológica de imunoglobulinas inter grupos de tratamento, sendo as imunoglobulinas estudadas maioritariamente policlonais.

A comparação da contagem de infeções por grupo de tratamento durante a administração dos regimes de terapia mostra unicamente diferenças significativas no número de infeções bacterianas durante o tratamento com RQT. Neste grupo foram contabilizados 52 episódios infecciosos em contraste com R (3) e QT (6). A diferença significativa encontrada entre os grupos QT e RQT poderá constituir um artifício visto que a grande incidência de episódios de infeção durante o regime com QT está bem descrita (García-Suárez, 2003). Este resultado poderá ser influenciado pelo reduzido número de indivíduos recrutados neste grupo. Relativamente ao grupo tratado com R, e de forma semelhante ao regime com QT, podem encontrar-se relatos de aumento da incidência de infeções em contexto de tratamento com este anticorpo (Gea-Banacloche, 2010; Kelesidis, 2011).

7. Conclusões

Este trabalho comparou a reconstituição imunitária de doentes com LNH B tratados com imunoterapia, quimioterapia ou imunoquimioterapia.

Os resultados obtidos permitem concluir:

1. O grupo de doentes tratado com quimioterapia apresentou, no momento de diagnóstico, um número de leucócitos e linfócitos significativamente superiores aos outros grupos de tratamento. Os níveis de leucócitos parecem estar aumentados à custa do número de neutrófilos, causados pela infeção, e de linfócitos B neoplásicos presentes na periferia, característicos da doença predominante neste grupo (leucemia linfática crónica);
2. O número de linfócitos B periféricos encontra-se significativamente reduzido nos grupos de doentes tratados com rituximab e no grupo tratado com rituximab em associação a quimioterapia no período T1 – T3;
3. O compartimento linfocitário T não mostrou ser alterado pelos tratamentos com imunoterapia, quimioterapia ou imunoquimioterapia no intervalo de seguimento estudado;
4. As concentrações séricas de IgM e de IgG não parecem ser alteradas pelos tratamentos com imunoterapia, quimioterapia ou imunoquimioterapia no intervalo de seguimento estudado;
5. A reatividade das imunoglobulinas IgM e IgG não mostrou alterações significativas entre grupos de tratamento no intervalo de seguimento estudado;
6. O grupo tratado com RQT mostrou ser significativamente, o grupo com maior número de intercorrências infecciosas bacterianas durante o decorrer do tratamento.

8. Referências bibliográficas

- Abulayha, A., Bredan, A., El Enshasy, H., & Daniels, I. (2014). Rituximab: modes of action, remaining dispute and future perspective. *Future Oncology (London, England)*, *10*(15), 2481–2492.
- Adams, J. L., Smothers, J., Srinivasan, R., & Hoos, A. (2015). Big opportunities for small molecules in immunoncology. *Nature Reviews Drug Discovery*, *14*(9), 603–622.
- Alexander, D. D., Mink, P. J., Adami, H. O., Chang, E. T., Cole, P., Mandel, J. S., & Trichopoulos, D. (2007). The non-Hodgkin lymphomas: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, *120* Suppl 12, 1-39.
- Allen, C. D. C., Okada, T., & Cyster, J. G. (2007). Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity*, *27*(2), 190-202 .
- Altieri, A., Bermejo, J. L., & Hemminki, K. (2005). Familial risk for non-Hodgkin lymphoma and other lymphoproliferative malignancies by histopathologic subtype: The Swedish Family-Cancer Database. *Blood*, *106*(2), 668–672.
- Álvarez-Barrientos, A., Arroyo, J., Cantón, R., Nombela, C., & Sánchez-Pérez, M. (2000). Applications of flow cytometry to clinical microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*, *13*(2), 167–195.
- Amoroso, A., Hafsi, S., Militello, L., Russo, A. E., Soua, Z., Mazzarino, M. C., ... Libra, M. (2011). Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, *16*, 770–782.
- Ansell, S. M. (2015). Non-Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. In *Mayo Clinic Proceedings*. Rochester, Mayo Foundation, Vol. 90, 1152–1163.
- Aoki, T., Nishiyama, T., Imahashi, N., & Kitamura, K. (2012). Lymphopenia following the completion of first-line therapy predicts early relapse in patients with diffuse large B cell lymphoma. *Annals of Hematology*, *91*(3), 375–382.
- Arkin, M. R., & Wells, J. a. (2004). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *3*(4), 301–317.
- Autissier, P., Soulas, C., Burdo, Tricia, H., Williams, K. C. (2010). Immunophenotyping of lymphocyte, monocyte and dendritic cell subsets in normal rhesus macaques by 12-color flow cytometry: Clarification on DC heterogeneity. *Journal of Immunology Methods*, *360*(1-2), 119–128.
- Bajor-Dattilo, E. B., Pittaluga, S., & Jaffe, E. S. (2013). Pathobiology of T-cell and NK-cell lymphomas. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, *26*, 75-87.
- Bakhshi, A., Jensen, J. P., Goldman, P., Wright, J. J., McBride, O. W., Epstein, A. L., & Korsmeyer, S. J. (1985). Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around Jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*, *41*(3), 899–906.
- Bakhtiar, R. (2012). Therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *Journal of Chemical Education*, *89*(12), 1537–1542.
- Beral, P. (1991). AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet*, *337*(8745), 805–809.
- Bergsagel, P. L., Chesi, M., Nardini, E., Brents, L. A., Kirby, S. L., & Kuehl, W. M. (1996). Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13931–13936.
- Blair, A., Cantor, K. P., & Zahm, S. H. (1998). Non-Hodgkin's lymphoma and agricultural use of the insecticide

- lindane. *American Journal of Industrial Medicine*, 33(1), 82–87.
- offetta, P. (2011). I. Epidemiology of adult non-Hodgkin lymphoma. *Annals of Oncology*, 22(Supplement 4), iv27-iv31.
- Bonavida, B. (2007). “Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immuno-resistance, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions.” *Oncogene*, 26(25), 3629–3636.
- Boross, P., & Leusen, J. H. W. (2012). Mechanisms of action of CD20 antibodies. *American Journal of Cancer Research*, 2(6), 676–690.
- Bosetti, C., Levi, F., Ferlay, J., Lucchini, F., Negri, E., & La Vecchia, C. (2008). Incidence and mortality from non-Hodgkin lymphoma in Europe: The end of an epidemic? *International Journal of Cancer*, 123(8), 1917–1923.
- Bow, E. (1998). Infection risk and cancer chemotherapy: the impact of the chemotherapeutic regimen in patients with lymphoma and solid tissue malignancies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, 1–5.
- Bowles, J. A., Wang, S. Y., Link, B. K., Allan, B., Beuerlein, G., Campbell, M. A., ... Weiner, G. J. (2006). Anti-CD20 monoclonal antibody with enhanced affinity for CD16 activates NK cells at lower concentrations and more effectively than rituximab. *Blood*, 108(8), 2648–2654.
- Brack, C., Hiram, M., Lenhard-Schuller, R., & Tonegawa, S. (1978). A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell*, 15(1), 1–14.
- Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 II), 1221–1229.
- Burnette, W. N. (1981). “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203.
- Byrd, J. C., Waselenko, J. K., Maneatis, T. J., Murphy, T., Ward, F. T., Monahan, B. P., ... White, C. A. (1999). Rituximab therapy in hematologic malignancy patients with circulating blood tumor cells: Association with increased infusion-related side effects and rapid blood tumor clearance. *Journal of Clinical Oncology*, 17(3), 791–795.
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117(19), 5019–5032.
- Carbone, A., Gloghini, A., Serraino, D., & Spina, M. (2009). HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 4(1), 3–10.
- Cardoso, E. (2007) Células e órgãos do sistema imunológico. In *Fundamentos de Imunologia* (1ª Edição). Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Cardoso, E. (2007a) Imunoglobulinas. In *Fundamentos de Imunologia* (1ª Edição). Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Cardoso, E., Pacheco, F. C. (2007b) Linfócitos B. In *Fundamentos de Imunologia* (1ª Edição). Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Carroll, M. C. (2004). The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology*, 5(10), 981–986.
- Casulo, C., Maragulia, J., & Zelenetz, A. D. (2013). Incidence of hypogammaglobulinemia in patients receiving rituximab and the use of intravenous immunoglobulin for recurrent infections. *Clinical Lymphoma*,

Myeloma and Leukemia, 13(2), 106–111.

- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P. S., Said, J. W., & Knowles, D. M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *New England Journal of Medicine*, 332(18), 1186–1191.
- Chaires, J. B., Satyanarayana, S., Suh, D., Fokt, I., Przewloka, T., & Priebe, W. (1996). Parsing the free energy of anthracycline antibiotic binding to DNA. *Biochemistry*, 35(7), 2047–2053.
- Cheson, B. D., Fisher, R. I., Barrington, S. F., Cavalli, F., Schwartz, L. H., Zucca, E., & Lister, T. A. (2014). Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of hodgkin and non-hodgkin lymphoma: The lugano classification. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), 3059–3068.
- Chianese, A., Bravi, M., & Fazio, E. (2012). Turbidimetry and Nephelometry. In *Industrial Crystallization Process Monitoring and Control*, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 51–57.
- leveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., & Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 252(3), 1102–1106.
- Clynes, R. a, Towers, T. L., Presta, L. G., & Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine*, 6(4), 443–446.
- Cohen, J. B., Bucur, S., Winton, E. F., Sinha, R., Heffner, L. T., King, N., ... Flowers, C. R. (2015). Combination of GM-CSF With Fludarabine-Containing Regimens in Chronic Lymphocytic Leukemia and Indolent Non-Hodgkin Lymphoma. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 15(9), 514–518.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., ... Gisselbrecht, C. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *The New England Journal of Medicine*, 346(4), 235–242.
- Colvin, M. (2003). Alkylating agents. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th edition). Hamilton, BC Decker Inc.
- Comas-Riu, J., & Rius, N. (2009). Flow cytometry applications in the food industry. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36(8), 999–1011.
- Conley, M. E., Dobbs, A. K., Farmer, D. M., Kilic, S., Paris, K., Grigoriadou, S., ... Campana, D. (2009). Primary B cell immunodeficiencies: comparisons and contrasts. *Annual Review of Immunology*, 27, 199–227.
- Croci, D., Nespolo, A., Bosoni, M. A., & Tarengi, G. (1989). A Simple Immunoturbidimetric Method for IgG and Albumin Quantitation in Cerebrospinal Fluid and Serum. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 27(11), 863–868.
- Cronstein, B. N. (1997). The mechanism of action of methotrexate. *Rheumatic Disease Clinics of North America*, 23(4), 739–755.
- Dalakas, M. C. (2008). B cells as therapeutic targets in autoimmune neurological disorders. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 4(10), 557–567.
- Dall'Ozzo, S., Tartas, S., Paintaud, G., Cartron, G., Colombat, P., Bardos, P., ... Thibault, G. (2004). Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of CGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Research*, 64(13), 4664–4669.
- Daniels, I., Abulayha, A. M., Thomson, B. J., & Haynes, A. P. (2006). Caspase-independent killing of Burkitt lymphoma cell lines by rituximab. *Apoptosis*, 11(6), 1013–1023.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
- Deans, J. P., Li, H., & Polyak, M. J. (2002). CD20-mediated apoptosis: Signalling through lipid rafts.

Immunology, 107(2), 176–182.

- Doroshov, J. H. (1983). Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Research*, 43(10), 4543–4551.
- Eichhorst, B. F., Busch, R., Hopfinger, G., Pasold, R., Hensel, M., Steinbrecher, C., ... Hallek, M. (2006). Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 107(3), 885–891.
- English, D., & Andersen, B. R. (1974). Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of Immunological Methods*, 5(3), 249–252.
- Evans, L. S., & Hancock, B. W. (2003). Non-Hodgkin lymphoma, *The Lancet*, 362, 139–146.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. (2013). *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. (Vol. 11).
- Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Fermé, C., ... Coiffier, B. (2005). Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(18), 4117–4126.
- Fisher, S. G., & Fisher, R. I. (2004). The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma. *Oncogene*, 23, 6524–6534.
- Frei, E., & Eder, J. P. J. (2003). Combination Chemotherapy. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th edition). Hamilton, BC Decker Inc.
- Fuertes, M. A., Castilla, J., Alonso, C., & Perez, J. M. (2003). Cisplatin Biochemical Mechanism of Action: From Cytotoxicity to Induction of Cell Death Through Interconnections Between Apoptotic and Necrotic Pathways. *Current Medicinal Chemistry*, 10(3), 257–266.
- Gaidano, G., Foà, R., & Dalla-favera, R. (2012). Molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), 3432–3438.
- García-Suárez, J., Krsnik, I., Reyes, E., De Miguel, D., Hernanz, N., Barr-Alí, M., & Burgaleta, C. (2003). Elderly haematological patients with chemotherapy-induced febrile neutropenia have similar rates of infection and outcome to younger adults: A prospective study of risk-adapted therapy. *British Journal of Haematology*, 120(2), 209–216.
- Gea-Banacloche, J. C. (2010). Rituximab-associated infections. *Seminars in Hematology*, 47(2), 187–198.
- Gidding, C. E. M., Kellie, S. J., Kamps, W. A., & De Graaf, S. S. N. (1999). Vincristine revisited. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 29(3), 209–288.
- Ginaldi, L., De Martinis, M., Matutes, E., Farahat, N., Morilla, R., & Catovsky, D. (1998). Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias. *Journal of Clinical Pathology*, 51, 364–369.
- Godon, a, Moreau, A., Talmant, P., Baranger-Papot, L., Geneviève, F., Milpied, N., ... Avet-Loiseau, H. (2003). Is t(14;18)(q32;q21) a constant finding in follicular lymphoma? An interphase FISH study on 63 patients. *Leukemia Official Journal of the Leukemia Society of America Leukemia Research Fund UK*, 17(1), 255–259.

- Gokbuget, N., & Hoelzer, D. (1997). Vindesine in the treatment of leukaemia. *Leukemia & Lymphoma*, 26(5–6), 497–506.
- Goodlad, J. R., Davidson, M. M., Hollowood, K., Batstone, P., & Ho-Yen, D. O. (2000). Borrelia burgdorferi-associated cutaneous marginal zone lymphoma: A clinicopathological study of two cases illustrating the temporal progression of B. burgdorferi-associated B-cell proliferation in the skin. *Histopathology*, 37(6), 501–508.
- Goossens, T., Klein, U., & Küppers, R. (1998). Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(5), 2463–2468.
- Gould, B. E., & Ruthanna, M. D. (2011). *Pathophysiology for the health professionals* (4th edition). St. Louis, Elsevier Ltd.
- Greer, J. P., Reddy, N.M., Williams, M. E. (2013). Non Hodgkin Lymphoma in adults. In *Wintrobe's Clinical Hematology* (13th edition). Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Grem, J. L., & Keith, B. (2005). Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: Antimetabolites. In *The Cancer Handbook*. New Jersey, John Wiley & Sons, Ltd.
- Gros, P., Milder, F. J., & Janssen, B. J. C. (2008). Complement driven by conformational changes. *Nature Reviews Immunology*, 8(1), 48–58.
- Gulzar, N., & Copeland, K. F. T. (2004). CD8+ T-cells: function and response to HIV infection. *Current HIV Research*, 2(1), 23–37.
- Hagemester, F., & Manoukian, G. (2009). Bendamustine in the treatment of non-Hodgkin's lymphomas. *OncoTargets and Therapy*, 2, 269–279.
- Hallek, M., Cheson, B. D., Catovsky, D., Caligaris-Cappio, F., Dighiero, G., Döhner, H., ... Kipps, T. J. (2008). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: A report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111(12), 5446–5456.
- Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A., & George, A. J. T. (2010). The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), 325–338.
- Haurly, M., Grandien, A., Sundblad, A., Coutinho, A., & Nobrega, A. (1994). Global analysis of antibody repertoires. 1. An immunoblot method for the quantitative screening of a large number of reactivities. *Scandinavian Journal of Immunology*, 39(1), 79–87.
- Haurly, M., Sundblad, A., Grandien, A., Barreau, C., Coutinho, A., & Nobrega, A. (1997). The repertoire of serum IgM in normal mice is largely independent of external antigenic contact. *European Journal of Immunology*, 27(6), 1557–1563.
- Hauswirth, A. W., Skrabs, C., Schützing, C., Raderer, M., Chott, A., Valent, P., ... Jäger, U. (2008). Autoimmune thrombocytopenia in non-Hodgkin's lymphomas. *Haematologica*, 93(3), 447–450.
- Hendry, L., Bowen, A., Matutes, E., Swansbury, J., & Catovsky, D. (2004). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia and low grade non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, 45(5), 945–950.
- Hennessy, B. T., Hanrahan, E. O., & Daly, P. a. (2004). Non-Hodgkin lymphoma: an update. *The Lancet Oncology*, 5(6), 341–353.
- Herzenberg, L. A., & Sweet, R. G. (1976). Fluorescence-activated cell sorting. *Scientific American*, 234(3), 108–117.

- Himes, R. H. (1991). Interactions of the catharanthus (Vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. *Pharmacology and Therapeutics*, 51(2), 257-267.
- Hoar, S. K., Blair, a, Holmes, F. F., Boysen, C. D., Robel, R. J., Hoover, R., & Fraumeni, J. F. (1986). Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft-tissue sarcoma. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 256(9), 1141–1147.
- Hochster, H. S., Kim, K., Green, M. D., Mann, R. B., Neiman, R. S., Oken, M. M., ... O'Connell, M. J. (1992). Activity of fludarabine in previously treated non-Hodgkin's low-grade lymphoma: Results of an eastern cooperative oncology group study. *Journal of Clinical Oncology*, 10(1), 28–32.
- Hoelder, S., Clarke, P. A., & Workman, P. (2012). Discovery of small molecule cancer drugs: Successes, challenges and opportunities. *Molecular Oncology*, 6(2), 155-176.
- Humphreys, M., Lavery, P., Morris, C., & Nevin, N. (1997). Klinefelter syndrome and non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 97(2), 111–113.
- Husain, A., Roberts, D., Pro, B., McLaughlin, P., & Esmaeli, B. (2007). Meta-analyses of the association between Chlamydia psittaci and ocular adnexal lymphoma and the response of ocular adnexal lymphoma to antibiotics. *Cancer*, 110(4), 809–815.
- Hussell, T., Isaacson, P. G., Spencer, J., & Crabtree, J. E. (1993). The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to Helicobacter pylori. *The Lancet*, 342(8871), 571–574.
- Iglewicz, B., & Hoaglin, D. (1993). *How to Detect and Handle Outliers: The ASQC Basic References in Quality Control: Statistical Techniques*, Milwaukee, ASQC Quality Press.
- Inaba, H., & Pui, C.-H. (2012). Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone. *Lancet Oncol.*, 11(11), 1096–1106.
- Jacomet, C., Girard, P. M., Lebrette, M. G., Farese, V. L., Monfort, L., & Rozenbaum, W. (1997). Intravenous methotrexate for primary central nervous system non-Hodgkin's lymphoma in AIDS. *Aids*, 11(14), 1725–1730.
- Jagłowski, S. M., Alinari, L., Lapalombella, R., Muthusamy, N., & Byrd, J. C. (2010). The clinical application of monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 116(19), 3705-3714.
- Jahan-Tigh, R. R., Ryan, C., Obermoser, G., & Schwarzenberger, K. (2012). Flow Cytometry. *Journal of Investigative Dermatology*, 132(10), e1.
- Jak, M., van Bochove, G. G. W., van Lier, R. A. W., Eldering, E., & van Oers, M. H. J. (2011). CD40 stimulation sensitizes CLL cells to rituximab-induced cell death. *Leukemia*, 25(6), 968–978.
- Jaksic, B., Brugiattelli Maura, Krc, I., Losonczi, H., Holowiechki, J., Planinc-Peraica, A., ... Lutz, D. (1997). High Dose Chlorambucil versus Binet's Modified Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Regimen in the Treatment of Patients with Advanced B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Results of an International Multicenter Randomized Trial. *Cancer*, 79, 2107–2114.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001a). Structural variation in immunoglobulin constant regions. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. (2001b). T-cell receptor gene rearrangement. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001c). B-cell activation by armed helper T cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th editio). New York: Garland Science.

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001d). Survival and maturation of lymphocytes in peripheral lymphoid tissues. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* (5th ed.). New York: Garland Science.
- J Jannazzo, A., Hoffman, J., & Lutz, M. (2008). Monitoring of anthracycline-induced cardiotoxicity. *Annals of Pharmacotherapy*, *42*, 99-104.
- Jazirehi, A. R., & Bonavida, B. (2005). Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention. *Oncogene*, *24*(13), 2121–2143.
- João, C. (2006a). Immunoglobulin is a highly diverse self-molecule that improves cellular diversity and function during immune reconstitution. *Medical Hypotheses*, *68*(1), 158–161.
- João, C., Ogle, B. M., Gay-Rabinstein, C., Platt, J. L., & Cascalho, M. (2004). B Cell-Dependent TCR Diversification. *The Journal of Immunology*, *172*(8), 4709–4716.
- João, C., Ogle, B. M., & Geyer, S. (2006b). Immunoglobulin promotes the diversity and the function of T cells. *European Journal of Immunology*, *36*(7), 1718–1728.
- Kaplan, E. L., & Meier, P. (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association*, *53*(282), 457–481.
- Kelesidis, T., Daikos, G., Boumpas, D., & Tsiodras, S. (2011). Does rituximab increase the incidence of infectious complications? A narrative review. *International Journal of Infectious Diseases*, *15* (1), e2-e16.
- Kim, S. S., Ruiz, V. E., Carroll, J. D., & Moss, S. F. (2011a). Helicobacter pylori in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Letters*, *305*(2), 228-238.
- Kim, Y. R., Kim, J. S., Kim, S. J., Jung, H. A., Kim, S. J., Kim, W. S., ... Min, Y. H. (2011b). Lymphopenia is an important prognostic factor in peripheral T-cell lymphoma (NOS) treated with anthracycline-containing chemotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, *4*(1), 34-43.
- Korsmeyer, S. J., Arnold, a, Bakhshi, A., Ravetch, J. V, Siebenlist, U., Hieter, P. a, ... Waldmann, T. A. (1983). Immunoglobulin gene rearrangement and cell surface antigen expression in acute lymphocytic leukemias of T cell and B cell precursor origins. *The Journal of Clinical Investigation*, *71*(2), 301–313.
- Krebs, H. a. (1950). Chemical composition of blood plasma and serum. *Annual Review of Biochemistry*, *19*(12), 409–430.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Source Journal of the American Statistical Association*, *47*(260), 583–621.
- Küppers, R., & Rajewsky, K. (1998). The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annual Review of Immunology*, *16*, 471–493.
- Kurokawa, T., Hase, M., Tokuman, N., & Yoshida, T. (2011). Immune reconstitution of B-cell lymphoma patients receiving CHOP-based chemotherapy containing rituximab. *Hematological Oncology*, *29*(1), 5–9.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *10*(3–4), 203–209.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Lam, K. P., Kühn, R., & Rajewsky, K. (1997). In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, *90*(6), 1073–1083.
- Lawley, P. D., & Brookes, P. (1967). Interstrand cross-linking of DNA by difunctional alkylating agents. *Journal*

of *Molecular Biology*, 25(1), 143–160.

- LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 112(5), 1570–1580.
- Ledue, T. B., Collins, M. F., & Ritchie, R. F. (2002). Development of Immunoturbidimetric Assays for Fourteen Human Serum Proteins on the Hitachi 912™, 40(5), 520–528.
- Lee, S., & Margolin, K. (2011). Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers*, 3(4), 3856–3893.
- Lefebvre, M.-L., Krause, S. W., Salcedo, M., & Nardin, A. (2006). Ex Vivo-activated Human Macrophages Kill Chronic Lymphocytic Leukemia Cells in the Presence of Rituximab: Mechanism of Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity and Impact of Human Serum. *Journal of Immunotherapy*, 29(4), 388–397.
- Lenz, G., Nagel, I., Siebert, R., Roschke, A. V., Sanger, W., Wright, G. W., ... Staudt, L. M. (2007). Aberrant immunoglobulin class switch recombination and switch translocations in activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(3), 633–43.
- Lenz, G., & Staudt, L. M. (2010). Aggressive lymphomas. *The New England Journal of Medicine Review*, 362, 1417–1429.
- Léveillé, C., AL-Daccak, R., & Mourad, W. (1999). CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines. *European Journal of Immunology*, 29(1), 65–74.
- Levine, T. D., & Pestronk, A. (1999). IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab. *Neurology*, 52(8), 1701–1704.
- List, A. F., Greer, J. P., Cousar, J. B., Stein, R. S., Flexner, J. M., Sinangil, F., ... Purtilo, D. T. (1986). Non-Hodgkin's lymphoma after treatment of Hodgkin's disease: Association with Epstein-Barr virus. *Annals of Internal Medicine*, 105(5), 668–673.
- Liu, M. M. ., Duke, J. L. J. L. ., Richter, D. J. . h D. J., Vinuesa, C. G. . C. G., Goodnow, C. C. C. . f, Kleinstein, S. H. . c S. H., & Schatz, D. G. . g D. G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature*, 451(7180), 841–845.
- Luckheeram, R., Zhou, R., Verma, A., & Xia, B. (2012). CD4+T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, 1–12.
- Lyman, G. H., Abella, E., & Pettengell, R. (2014). Risk factors for febrile neutropenia among patients with cancer receiving chemotherapy: A systematic review. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 90(3), 190–199.
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
- Maia, S., Cardoso, A. A. (2007) Imunologia tumoral. In *Fundamentos de Imunologia* (1ª Edição). Lisboa, Lidel - Edições Técnicas, Lda.
- Malhotra, V., & Perry, M. C. (2003). Classical chemotherapy: mechanisms, toxicities and the therapeutic window. *Cancer Biology & Therapy*, 2, (Suppl 1), 1-3.
- Maloney, D. G. (2012). Anti-CD20 antibody therapy for B-cell lymphomas. *The New England Journal of Medicine*, 366(21), 2008–2016.
- Maloney, D., Smith, B., & Appelbaum, F. (1996). The anti-tumor effect of monoclonal anti-CD20 antibody (mAb) therapy includes direct antiproliferative activity and induction of apoptosis in CD20 positive non-Hodgkin's lymphoma (NHL) cell lines. *Blood*, 88, (Suppl 1): 637.
- Manis, J. P., Tian, M., & Alt, F. W. (2002). Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends in Immunology*, ;23(1), 31-39.
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration.

Cancer Chemotherapy Reports. Part 1, 50(3), 163–170.

- Mantovani, A., Cassatella, M. a, Costantini, C., & Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews. Immunology, 11(8), 519–531.*
- Mao, Y., Hu, J., Ugnat, a M., & White, K. (2000). Non-Hodgkin's lymphoma and occupational exposure to chemicals in Canada. *Annals of Oncology, 11, 69–73.*
- Marcus, R., Imrie, K., Belch, A., Cunningham, D., Flores, E., Catalano, J., ... Smith, P. (2005). CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood, 105(4), 1417–1423.*
- Mariette, X. (2002). Lymphomas in rheumatoid arthritis patients treated with methotrexate: a 3-year prospective study in France. *Blood, 99(11), 3909–3915.*
- McClatchey, K. D. (2002). *Clinical Laboratory Medicine* (2nd edition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- McKay, L., & Cidlowski, J. (2003). Corticosteroids in the Treatment of Neoplasms. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th edition). Hamilton, BC Decker Inc.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., ... Mellstedt, H. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews Clinical Oncology, 11(9), 509–524.*
- Migliazza, a, Martinotti, S., Chen, W., Fusco, C., Ye, B. H., Knowles, D. M., ... Dalla-Favera, R. (1995). Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(26), 12520–12524.*
- Miller, T., & Dahlberg, S. (1998). Chemotherapy alone compared with chemotherapy plus radiotherapy for localized intermediate-and high-grade non-Hodgkin's lymphoma. *The New England Journal of Medicine, 339(1), 21–26.*
- Minotti, G., Mancuso, C., Frustaci, A., Mordente, A., Santini, S. A., Calafiore, A. M., ... Gentiloni, N. (1996). Paradoxical inhibition of cardiac lipid peroxidation in cancer patients treated with doxorubicin: Pharmacologic and molecular reappraisal of anthracycline cardiotoxicity. *Journal of Clinical Investigation, 98(3), 650–661.*
- Moccia, A. A., Hoskins, P., Klasa, R., Savage, K. J., Shenkier, T., Skinnider, B., ... Connors, J. M. (2010). Gemcitabine, dexamethasone, and cisplatin (GDP): Effective and well-tolerated salvage therapy for relapsed/refractory Hodgkin lymphoma (HL). *Haematologica, 27(11), 1222-1225.*
- Morgan, B. (1999). Regulation of the complement membrane attack pathway. *Crit Rev Immunol, 19(3), 173–198.*
- Morrison, H. I., Semenciw, R. M., Wilkins, K., Mao, Y., & Wigle, D. T. (1994). Non-Hodgkin's lymphoma and agricultural practices in the prairie provinces of Canada. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, 20(1), 42–47.*
- Moskowitz, C. H., Bertino, J. R., Glassman, J. R., Hedrick, E. E., Hunte, S., Coady-Lyons, N., ... Zelenetz, A. D. (1999). Ifosfamide, carboplatin, and etoposide: A highly effective cytoreduction and peripheral-blood progenitor-cell mobilization regimen for transplant- eligible patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology, 17(12), 3776–3785.*
- Müller-Eberhard, H. J. (1986). The membrane attack complex of complement. *Annual Review of Immunology, 4, 503–528.*
- Muller, A. J., & Scherle, P. a. (2006). Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors. *Nature Reviews. Cancer, 6(August), 613–625.*

- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., Honjo, T., ... Liu, D. R. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, *102*(5), 553–563.
- Nadler, L. M., Ritz, J., Hardy, R., Pesando, J. M., Schlossman, S. F., & Stashenko, P. (1981). A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *The Journal of Clinical Investigation*, *67*(1), 134–140.
- Nardini, E., Aiello, a, Giardini, R., Colnaghi, M. I., Menard, S., & Balsari, a. (2000). Detection of aberrant isotype switch recombination in low-grade and high-grade gastric MALT lymphomas. *Blood*, *95*(3), 1032–1038.
- Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, *8*(1), 34–47.
- Nogai, H., Dörken, B., & Lenz, G. (2011). Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *29*(14), 1803-1811.
- O'Connor, J. E., Callaghan, R. C., Escudero, M., Herrera, G., Martínez, A., Monteiro, M. D., & Montolíu, H. (2001). The relevance of flow cytometry for biochemical analysis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, *51*(4), 231–239.
- Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C., & Baltimore, D. (1990). RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science*, *248*(4962), 1517–1523.
- Oki, Y., McLaughlin, P., Pro, B., Hagemester, F. B., Bleyer, A., Loyer, E., & Younes, A. (2005). Phase II study of oxaliplatin in patients with recurrent or refractory non-Hodgkin lymphoma. *Cancer*, *104*(4), 781–787.
- Opelz, G., & Henderson, R. (1993). Incidence of non-hodgkin lymphoma in kidney and heart transplant recipients. *The Lancet*, *342*(8886–8887), 1514–1516.
- Ormerod, M. G. (2003). *Flow cytometry: a practical approach* (3rd edition). Oxford, Oxford University Press.
- Palmer, A., Mason, G. G., Paramio, J. M., Knecht, E., & Rivett, A. J. (1994). Changes in proteasome localization during the cell cycle. *European Journal of Cell Biology*, *64*(1), 163–175.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, *12*(4), 252–264.
- Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Kuppers, R., & Dalla-Favera, R. (2001). Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, *412*(6844), 341–346.
- Pescovitz, M. D. (2006). Rituximab, an anti-CD20 monoclonal antibody: History and mechanism of action. *American Journal of Transplantation*, *6*(5), 859–866.
- Pettitt, A. R. (2003). Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *121*(5), 692–702.
- Pires, A. E., Afonso, A. F., Queirós, A., Cabral, M. S., Porrata, L., Markovic, S. N., ... João, C. (2010). Treatment with polyclonal immunoglobulin during T-cell reconstitution promotes naive T-cell proliferation. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *33*(6), 618–625.
- Plunkett, W., & Gandhi, V. (1997). Nucleoside analogs: cellular pharmacology, mechanism of action, and strategies for combination therapy. In: *Nucleoside analogs in cancer therapy*, New York, Marcel Dekker.
- Pohlman, B. (1996). Ifosfamide in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Seminars in Oncology*, *23*(3 Suppl. 6), 27–32.
- Porrata, L. F., Rsitow, K., Inwards, D. J., Ansell, S. M., Micallef, I. N., Johnston, P. B., ... Markovic, S. N. (2010). Lymphopenia assessed during routine follow-up after immunochemotherapy (R-CHOP) is a risk factor for

- predicting relapse in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia*, 24(7), 1343–1349.
- Priestman, T. (2012). Practical aspects of cancer chemotherapy. In *Cancer Chemotherapy in Clinical Practice* (2nd edition), Vol. 1. London, Springer-Verlag.
- R Development Core Team. (2016). R: a language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, Vienna.
- Raghavan, S. C., Swanson, P. C., Wu, X., Hsieh, C. L., & Lieber, M. R. (2004). A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature*, 428(6978), 88–93.
- Raj, S., Franco, V. I., & Lipshultz, S. E. (2014). Anthracycline-induced cardiotoxicity: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 16(6), 315 - 329.
- Ravetch, J. V., & Lanier, L. L. (2000). Immune Inhibitory Receptors. *Science*, 290(5489), 84–89.
- Ray, A., & Prefontaine, K. E. (1994). Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(2), 752–756.
- Reff, M. E. E., Carner, K., Chambers, K. S. S., Chinn, P. C. C., Leonard, J. E. E., Raab, R., ... Anderson, D. R. R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*, 83(2), 435–445.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews Immunology*, 12(4), 269–281.
- Reynolds, A. E., Kuraoka, M., & Kelsoe, G. (2015). Natural IgM is produced by CD5+ plasma cells that occupy a distinct survival niche in bone marrow. *Journal of Immunology*, 194(1), 231–242.
- Ricklin, D., Hajishengallis, G., Yang, K., & Lambris, J. D. (2010). Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology*, 11(9), 785–797.
- Roberts, D. M., Jones, R. B., Smith, R. M., Alberici, F., Kumaratne, D. S., Burns, S., & Jayne, D. R. W. (2015). Rituximab-associated hypogammaglobulinemia: Incidence, predictors and outcomes in patients with multi-system autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*, 57, 60–65.
- Rogers, L. M., Veeramani, S., & Weiner, G. J. (2014). Complement in monoclonal antibody therapy of cancer. *Immunol Res*, 59(1–3), 203–210.
- Rosenberg, S. A. (1977). Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Treatment Reports*, 61(6), 1023–1027.
- Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230), 62–68.
- Rosenberg, S. a, Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nature Medicine*, 10(9), 909–915.
- Rowinsky, E. (2003). The Vinca Alkaloids. In *Holland-Frei Cancer Medicine* (6th edition). Hamilton, BC Decker Inc.
- Rozman, S., Sonc, M., & Novakovic, B. J. (2012). Late-onset neutropenia following primary treatment of diffuse large B-cell lymphoma with rituximab-containing therapy. *Leukemia & Lymphoma*, 53(10), 1945–1948.
- Rummel, M. J., Niederle, N., Maschmeyer, G., Banat, G. A., Von Grünhagen, U., Losem, C., ... Brugger, W. (2013). Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: An open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 381(9873), 1203–1210.

- Saadoun, D., Suarez, F., Lefrere, F., Valensi, F., Mariette, X., Aouba, A., ... Hermine, O. (2005). Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: A new entity? *Blood*, *105*(1), 74–76.
- Saven, A., Lee, T., Kosty, M., & Piro, L. (1996). Cladribine and mitoxantrone dose escalation in indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *14*(7), 2139–2144.
- Schäcke, H., Döcke, W. D., & Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*, *96*(1), 23–43.
- Schatz, D. G., Oettinger, M. A., & Baltimore, D. (1989). The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell*, *59*(6), 1035–1048.
- Schulz, H., Bohlius, J., Skoetz, N., Trelle, S., Kober, T., Reiser, M., ... Engert, A. (2007). Chemotherapy plus Rituximab versus chemotherapy alone for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Sehn, L. H., Goy, A., Offner, F. C., Martinelli, G., Caballero, M. D., Gadeberg, O., ... Press, O. W. (2015). Randomized phase II trial comparing obinutuzumab (GA101) with rituximab in patients with relapsed CD20+ indolent B-Cell non-hodgkin lymphoma: Final analysis of the GAUSS study. In *Journal of Clinical Oncology*, *33*, 3467–3474.
- Seto, S., Carrera, C. J., Kubota, M., Wasson, D. B., & Carson, D. A. (1985). Mechanism of deoxyadenosine and 2-chlorodeoxyadenosine toxicity to nondividing human lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, *75*(2), 377–383.
- S Shan, D., Ledbetter, J. a, & Press, O. W. (1998). Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood*, *91*(5), 1644–1652.
- Shankland, K. R., Armitage, J. O., & Hancock, B. W. (2012). Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*, *380*(9844), 848–857.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry* (4th edition.). New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, *52*(34), 591–611.
- Sikder, M. A., & Friedberg, J. W. (2008). Beyond rituximab: The future of monoclonal antibodies in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Current Hematologic Malignancy Reports*, *3*, 187-193.
- Smith, M., & Greene, W. (1991). Molecular biology of the type I human T-cell leukemia virus (HTLV-I) and adult T-cell leukemia. *Journal of Clinical Investigation*, *87*(3), 761–766.
- Smith, M. R. (2003). Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, *22*(47), 7359–7368.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., ... Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85.
- Solal-Celigny, P. (2006). Follicular lymphoma international prognostic index. *Current Treatment Options in Oncology*, *7*(4), 270–275.
- Spearman, C. (1904). The Proof and Measurement of Association between Two Things. *The American Journal of Psychology*, *15*, 72–101.
- Spencer, D. M. S., Bilardi, R. A., Koch, T. H., Post, G. C., Nafie, J. W., Kimura, K. I., ... Phillips, D. R. (2008). DNA repair in response to anthracycline-DNA adducts: A role for both homologous recombination and nucleotide excision repair. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *638*(1–2), 110–121.

- Staker, B. L., Hjerrild, K., Feese, M. D., Behnke, C. A., Burgin, A. B., & Stewart, L. (2002). The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(24), 15387–15392.
- Stel, A. J., Ten Cate, B., Jacobs, S., Kok, J. W., Spierings, D. C. J., Dondorff, M., ... Kroesen, B. J. (2007). Fas receptor clustering and involvement of the death receptor pathway in rituximab-mediated apoptosis with concomitant sensitization of lymphoma B cells to fas-induced apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *178*(4), 2287–2295.
- Summerfield, G. P., Taylor, P. R. A., Mounter, P. J., & Proctor, S. J. (2002). High-dose chlorambucil for the treatment of chronic lymphocytic leukaemia and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Haematology*, *116*(4), 781–786.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., ... Vardiman, J. . (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue* (Vol. 4). WHO
- Swift, L., McHowat, J., & Sarvazyan, N. (2007). Anthracycline-induced phospholipase A2 inhibition. In *Cardiovascular Toxicology*, *7*, 86–91.
- Tacar, O., Sriamornsak, P., & Dass, C. R. (2013). Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *65*, 157-170.
- Teppo, A. M. (1982). Immunoturbidimetry of albumin and immunoglobulin G in urine. *Clinical Chemistry*, *28*(6), 1359–1361.
- Tewey, K. M., Rowe, T. C., Yang, L., Halligan, B. D., & Liu, L. F. (1984). Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science (New York, NY)*, *226*(4673), 466–468.
- Thakur, D. S. (2011). Topoisomerase II Inhibitors in cancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, *3*(4), 1173–1181.
- Therneau, T. (2015). *A Package for Survival Analysis in S*. New York, Springer.
- Therneau, T. M., & Grambsch, P. M. (2000). *Modeling Survival Data: Extending the Cox Model*. New York, Springer.
- Thorn, C., Oshiro, C., Marsh, S., Hernandez-Boussard, T., McLeod, H., Klein, T., & Altman, R. (2012). Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics*, *21*(7), 440–446.
- Tissing, W. J. E., Meijerink, J. P. P., den Boer, M. L., & Pieters, R. (2003). Molecular determinants of glucocorticoid sensitivity and resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *17*(1), 17–25.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(9), 4350–4354.
- Tulpule, A., Rarick, M. U., Kolitz, J., Bernstein, J., Myers, A., Buchanan, L. A., ... Levine, A. M. (2001). Liposomal daunorubicin in the treatment of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology*, *12*(4), 457–462.
- Ulcickas Yood, M., Quesenberry Jr., C. P., Guo, D., Caldwell, C., Wells, K., Shan, J., ... Manos, M. M. (2007). Incidence of non-Hodgkin's lymphoma among individuals with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, *46*(1), 107–112.
- van der Velden, V. H. (1998). Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation*, *7*(4), 229–237.

- Van Oers, M. H. J., Klasa, R., Marcus, R. E., Wolf, M., Kimby, E., Gascoyne, R. D., Hagenbeek, A. (2006). Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: Results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood*, *108*(10), 3295–3301.
- Vineis, P., Miligi, L., & Costantini, A. S. (2007). Exposure to solvents and risk of non-Hodgkin lymphoma: Clues on putative mechanisms. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *16*, 381–384.
- Visco, C., Finotto, S., Zambello, R., Paolini, R., Menin, A., Zanotti, R., ... Rodeghiero, F. (2013). Combination of rituximab, bendamustine, and cytarabine for patients with mantle-cell non-Hodgkin lymphoma ineligible for intensive regimens or autologous transplantation. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(11), 1442–1449.
- Vives-Rego, J., Lebaron, P., & Nebe-Von Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(4), 429–448.
- Vockerodt, M., Yap, L.-F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., & Murray, P. G. (2015). The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *The Journal of Pathology*, *235*, 312–22.
- Voog, E., Morschhauser, F., & Solal-Céligny, P. (2003). Neutropenia in patients treated with rituximab. *The New England Journal of Medicine*, *348*(26), 2691-2694.
- Vose, J. M., Neumann, M., & Harris, M. E. (2008). International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes international T-cell lymphoma project. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(25), 4124–4130.
- Wajant, H. (2009). The role of TNF in cancer. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *49*, 1–15.
- Waldmann, T. A. (2006). The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nature Reviews Immunology*, *6*(8), 595–601.
- Walport, M. J. (2001a). Complement-first of two parts. *The New England Journal of Medicine*, *344*, 1058–1066.
- Walport, M. J. (2001b). Complement-second of two parts. *The New England Journal of Medicine*, *344*(15), 1140-1444.
- Wang, R., Zhang, Y., Lan, Q., Holford, T. R., Leaderer, B., Hoar Zahm, S., ... Zheng, T. (2009). Occupational exposure to solvents and risk of non-Hodgkin lymphoma in Connecticut women. *American Journal of Epidemiology*, *169*(2), 176–185.
- Wang, S. S., Slager, S. L., Brennan, P., Holly, E. A., De Sanjose, S., Bernstein, L., ... Hartge, P. (2007). Family history of hematopoietic malignancies and risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL): a pooled analysis of 10 211 cases and 11 905 controls from the International Lymphoma Epidemiology Consortium (InterLymph). *Blood*, *109*(8), 3479–3488.
- Wang, X., Li, Z., Naganuma, A., & Ye, B. H. (2002). Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(23), 15018–15023.
- Weiner, G. J. (2010). Rituximab: Mechanism of action. *Seminars in Hematology*, *47*(2), 115–123.
- Weiss, R. B. (1992). The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Seminars in Oncology*, *19*(6), 670–686.
- Wiechelman, K. J., Braun, R. D., & Fitzpatrick, J. D. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry*, *175*(1), 231–237.
- Wilcoxon, F. (1945). Individual Comparisons by Ranking Methods. *Biometrics Bulletin*, *1*(6), 80–83.
- Zhou, X., Hu, W., & Qin, X. (2008). The role of complement in the mechanism of action of rituximab for B-cell lymphoma: implications for therapy. *The Oncologist*, *13*(9), 954–966.

Zunino, F., & Capranico, G. (1990). DNA topoisomerase II as the primary target of anti-tumor anthracyclines. *Anti-Cancer Drug Design*, 5(4), 307–317.

9. Anexos

9.1. Imagens complementares

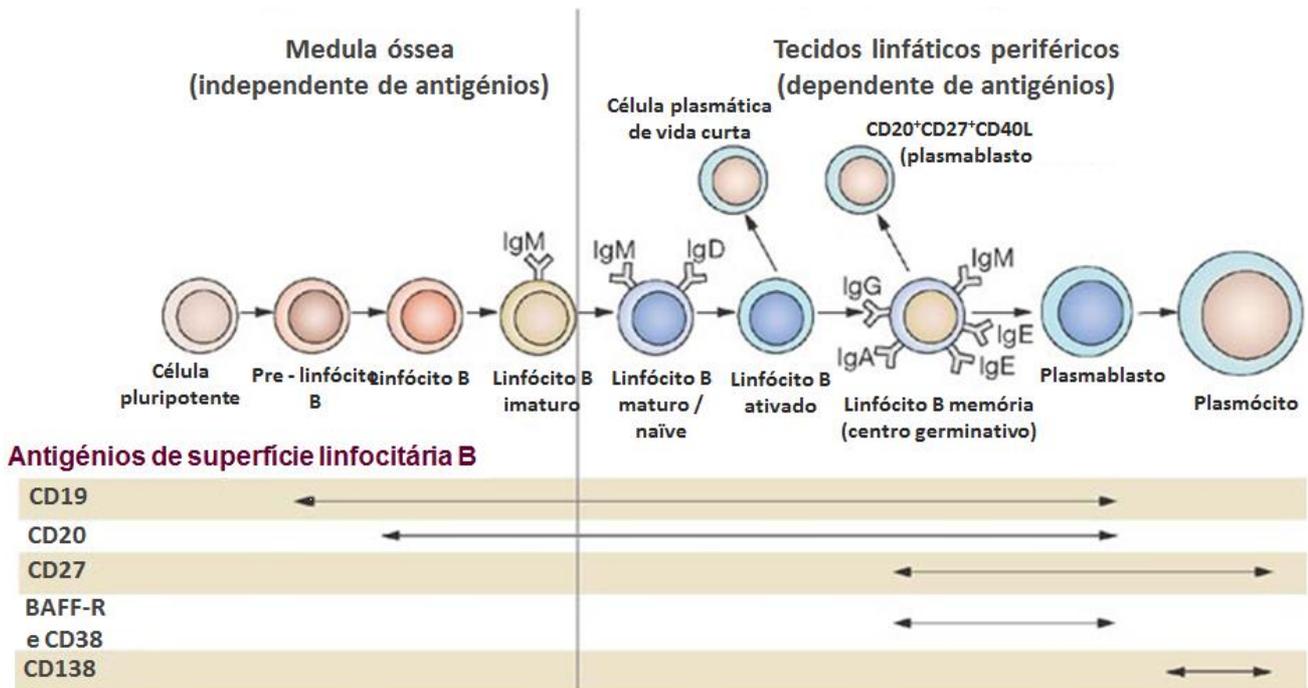


Figura A 1. Representação esquemática dos diversos marcadores CD durante os estádios de diferenciação linfocitária B (Adaptado (Dalakas, 2008)).

9.2. Resultados adicionais

9.2.1. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE GRUPOS DE TRATAMENTO

Leucócitos

Tabela A 1. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de leucócitos ($N \times 10^3/\mu\text{L}$) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	
0	11	10,6 (7,23; 34,72)	9	5,55 (4,92; 6,39)	30	7,89 (5,97; 11,04)	0,0327
1	8	4,75 (3,96; 6,93)	8	5,11 (4,58; 6,19)	21	5,32 (3,97; 6,21)	0,9780
2	8	4,8 (3,91; 7,45)	5	5,41 (5,21; 5,69)	21	5,72 (4,78; 6,60)	0,9239
3	7	5,43 (5,04; 6,83)	5	4,75 (4,48; 5,17)	20	5,13 (4,51; 7,08)	0,3796
4	7	5,4 (3,92; 8,68)	6	5,08 (4,31; 5,46)	17	6,34 (5,65; 7,22)	0,1229
5	4	5,32 (4,78; 6,04)	5	5,22 (4,68; 5,38)	15	6,6 (5,98; 8,07)	0,0539

Linfócitos totais

Tabela A 2. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de linfócitos totais ($n \times 10^3/\mu\text{L}$) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($10^3/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	
0	11	2,91(1,49; 9,03)	9	1,85 (1,62; 1,97)	30	1,60 (1,08; 2,17)	0,0895
1	8	1,33 (1,06; 1,84)	8	1,55 (1,14; 1,97)	21	1,11 (0,77; 1,40)	0,1869
2	8	1,03 (0,83; 1,35)	5	1,39 (1,19; 1,74)	21	1,20 (0,80; 1,63)	0,4635
3	7	1,53 (1,08; 1,74)	5	1,33 (1,01; 1,50)	20	1,22 (0,92; 1,81)	0,8913
4	7	1,20 (1,03; 2,85)	6	1,45 (1,31; 1,59)	17	1,65 (1,13; 1,86)	0,8387
5	4	1,50 (1,34; 1,72)	5	1,42 (1,33; 1,65)	15	1,76 (1,47; 1,90)	0,7009

Linfócitos B CD19

Tabela A 3. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de linfócitos B CD19 ($n/\mu\text{L}$) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana ($U/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($U/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	n	Mediana ($U/\mu\text{L}$) (1 ^o qrt;3 ^o qrt)	
0	11	7761,50 (598,30; 32050,00)	7	205,95 (174,90; 449,20)	29	270,00 (155,20; 978,00)	0,0019
1	8	540,38 (78,02; 1226,00)	8	0,00 (0,00; 0,00)	21	0,00 (0,00; 1,81)	0,0000
2	8	729,41(110,00; 2819,00)	5	0,00 (0,00; 7,40)	21	0,00 (0,00; 7,21)	0,0008
3	7	521,28 (188,00; 3430,00)	5	1,58 (1,55; 8,96)	20	4,65 (0,00; 69,11)	0,0039
4	7	292,52 (94,66; 4692,00)	6	94,53 (19,88; 152,70)	17	305,10 (144,60; 533,90)	0,1696
5	4	608,69 (60,54; 1688,00)	5	123,38 (10,76; 135,70)	15	249,86 (178,00; 649,30)	0,0644

Linfócitos T CD3

Tabela A 4. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de linfócitos T CD3 (n/μL) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	
0	11	1724,63 (976,00; 1977,00)	8	2402,85 (2067,00; 3148,00)	30	2448,08 (2036,00; 3394,00)	0,1130
1	8	1738,80 (1231,00; 2631,00)	8	1570,84 (1784,00; 2554,00)	21	2304,18 (929,30; 2454,00)	0,5933
2	8	1559,73 (1110,00; 1937,00)	5	2017,05 (1980,00; 2071,00);	21	2065,80 (1300,00; 2670,00)	0,6274
3	7	1513,02 (829,00; 2458,00)	5	1695,75 (1273,00; 2209,00)	20	2124,65 (1492,00; 2867,00)	0,4649
4	7	1680,96 (1039,00; 2314,00)	6	2222,14 (2012,00; 2505,00)	17	2183,61 (1800,00; 2971,00)	0,4001
5	4	1848,88 (1409,00; 2303,00)	5	2073,58 (2066,00; 3483,00)	15	3719,94 (2505,00; 4530,00)	0,1371

Linfócitos T CD4

Tabela A 5. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de Linfócitos T CD4 (n/μL) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	
0	11	836,45 (1132,00; 2055,00)	8	1579,82 (1132,00; 2055,00)	30	1352,00 (750,50; 750,50)	0,1171
1	8	788,27 (435,00; 1423,00)	8	1661,22 (1008,00; 1844,00)	21	1661,22 (435,50; 1016,00)	0,0722
2	8	640,33 (333,10; 975,60)	5	1033,51 (893,60; 1043,00)	21	778,88 (397,30; 1174,00)	0,6914
3	7	643,03 (235,40; 1141,00)	5	1376,95 (884,60; 1387,00)	20	934,29 (544,80; 1415,00)	0,3231
4	7	457,23 (418,90; 1040,00)	6	1374,58 (1008,00; 1687,00)	17	987,65 (716,50; 1299,00)	0,0843
5	4	790,80 (481,80; 1206,00)	5	1547,37 (1286,00; 2066,00)	15	1307,90 (805,70; 1688,00)	0,3058

Linfócitos T CD8

Tabela A 6. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação da população de Linfócitos T CD8 (n/μL) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (U/μL) (1ºqrt;3ºqrt)	
0	11	542,63 (327,50; 953,50)	8	656,80 (464,10; 809,20)	30	1076,42 (708,20; 1326,00)	0,0951
1	8	744,06 (393,10; 1123,00)	8	479,29 (275,20; 756,10)	21	716,39 (407,70; 1060,00)	0,3366
2	8	764,73 (424,10; 949,60)	5	566,17 (439,70; 784,00)	21	913,01 (588,80; 1477,00)	0,1898
3	7	786,77 (358,40; 1172,00)	5	486,14 (296,50; 709,00)	20	1034,57 (696,50; 1581,00)	0,0964
4	7	1063,33 (287,60; 1204,00)	6	605,83 (350,90; 858,60)	17	1172,60 (732,10; 1652,00)	0,1100
5	4	925,80 (653,10; 1106,00)	5	756,91 (647,00; 1195,00)	15	1441,27 (1141,00; 2825,00)	0,0296

IgM

Tabela A 7. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação dos níveis séricos de IgM (mg/dL) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	
0	11	51,00 (40,50; 83,50)	8	81,00 (48,25; 130,50)	33	85,00 (51,00; 145,00)	0,3090
1	10	51,50 (38,25; 60,00)	7	116,00 (62,00; 230,00)	21	37,00 (21,00; 58,00)	0,0663
2	10	59,00 (50,75; 78,25)	7	84,00 (56,00; 140,50)	24	43,50 (27,25; 76,25)	0,1037
3	8	80,50 (47,50; 156,80)	6	81,00 (47,25; 138,80)	20	54,50 (29,50; 110,80)	0,4028
4	8	61,00 (45,50; 129,80)	6	127,00 (80,50; 219,20)	21	48,00 (33,00; 74,00)	0,1134
5	6	60,00 (55,25; 119,50)	5	157,00 (88,00; 314,00)	19	49,00 (36,00; 78,00)	0,2096

IgG

Tabela A 8. Teste de Kruskal Wallis para a comparação da recuperação dos níveis séricos de IgG (mg/dL) em doentes com LNH B tratados com R, QT e RQT.

T	QT		R		R-QT		p value
	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	n	Mediana (mg/dL) (1ºqrt;3ºqrt)	
0	11	973,00 (747,50; 1340,00)	8	884,50 (765,80; 1001,00)	33	956,00 (866,00; 1238,00)	0,3713
1	10	829,50 (665,00; 1015,00)	6	1063,00 (896,50; 1141,00)	21	719,00 (622,00; 860,00)	0,0439
2	8	752,50 (612,00; 938,80)	6	1032,00 (932,50; 1076,00)	20	821,50 (725,50; 1070,00)	0,3878
3	8	883,00 (785,20; 1192,00)	6	1010,00 (931,80; 1067,00)	21	835,00 (650,80; 1112,00)	0,7804
4	8	907,00 (524,80; 1156,00)	6	1124,50 (912,50; 1174,00)	21	794,00 (700,00; 913,00)	0,2982
5	6	1012,50 (865,00; 1123,00)	5	1122,00 (873,00; 1150,00)	19	792,00 (703,50; 976,50)	0,2643

9.3. Reagentes

- 2-mercaptoetanol 99,0% (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Ácido 6-aminohexanóico $\geq 99,9$ % (Merck Millipore, Billerica)
- Ácido acético glacial $\geq 99,85$ % (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Ácido clorídrico fumegante ($d = 1,19$) 37% (MERCK, Darmstadt)
- Ácido etilenodiaminotetracético, (Sigma-Aldrich, St. Louis)
- Acrilamida (40%) + bisacrilamida (1,07%) BioRad , Hercules
- Albumina do soro bovino (bovine serum albumin BSA))
- Anticorpo anti-CD19^{PE} (BD Pharmingen, San Jose)
- Anticorpo anti-CD3^{PerCPcy5.5} (BD Biosciences, San Jose)
- Anticorpo anti-CD4^{Pacific Blue} (BD Biosciences, San Jose)
- Anticorpo anti-CD8^{APC-H7} (BD Biosciences, San Jose)
- Anticorpo IgG anti humana (produzida em cabra) conjugada com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology, Birmingham)
- Anticorpo IgM anti humana (produzida em cabra) conjugada com fosfatase alcalina (Southern Biotechnology, Birmingham)
- Azul de bromofenol (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Azul de cloreto nitrotetrazólico (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Azul de Coomassie Brilhante R- 250 (Bio Rad, Hercules)
- Azul de tripano (InvitrogenTM, Carlsbad)
- Calibrador de proteínas *Specific Protein Multiconstituent Calibrator* - 1E78-02 (Abbott diagnostics, Santa Clara)
- Cloreto de amônio (Sigma, St. Louis)
- Cloreto de magnésio hexahidratado 99.995% (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Cloreto de potássio (Sigma-Aldrich[®], St. Louis)
- Cloreto de sódio (Sigma-Aldrich[®], St. Louis)
- Ditrioteitol 99,0 % (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Duodecilssulfato de sódio (Sigma-Aldrich[®], St. Louis)
- Etanol absoluto $\geq 99,8$ % (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Formaldeído 37 % (Sigma-Aldrich[®], St. Louis)
- Fostato dissódico 5-bromo-4-cloro-3-indolil (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Glicina ≥ 99 % (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Gradiente de densidade de $1,077 \pm 0,001$ g/mL (Histopaque[®] – 1077 Sigma-Aldrich[®], St. Louis);
- Hidrogenocarbonato de sódio NaHCO₃ (MERCK, Darmstadt)
- Hidrogenofosfato de sódio anidro 99%, (MERCK, Darmstadt)

- Hidrogenofosfato dipotássio 99,5% (MERCK, Darmstadt)
- Inibidor de proteases Aprotinina (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Inibidor de proteases Pepstatina (Thermo Fisher Scientific, Waltham)
- Inibidor de proteases TLCK (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Isobutanol ≥99% (Sigma-Aldrich®, St. Louis)
- *Kit* detecção Imunoglobulina A Clinical Chemistry – IgA (Abbott Diagnostics, Santa Clara)
- *Kit* detecção Imunoglobulina G Clinical Chemistry – IgG (Abbott Diagnostics, Santa Clara)
- *Kit* detecção Imunoglobulina M Clinical Chemistry – IgM (Abbott Diagnostics, Santa Clara)
- *Kit* Pirce® BCA Proteína Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham)
- Lã de vidro (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Membranas de nitrocelulose (Bio Rad, Hercules)
- Metanol ≥ 99,9 % (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Papel de filtro *Whatman*® 20 x 25 cm (Sigma-Aldrich®, St. Louis)
- Persulfato de amônio (Sigma-Aldrich®, St. Louis)
- Protease Inhibitor Cocktail Set I – Calbiochem® (Merk Millipore, Billerica)
- Solução de ouro coloidal Protogold (BioCell, Cardiff)
- Tampão de lise de eritrócitos (RBCL) (preparado em laboratório)
- Tampão fosfato salino (PBS) (preparado em laboratório)
- Tampão salino tris (TBS) (preparado em laboratório)
- Tampão de fosfatase alcalina (preparado em laboratório)
- Tris-Base 99.9% (Sigma-Aldrich®, St. Louis)
- Tween 20 (BioRad, Hercules)
- N, N, N', N' – Tetrametiletilenodiamina (TEMED) ~99% (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Substrato de fosfatase alcalina de desenvolvimento colorimétrico BCIP/NBT (Promega Corporation, Madison)

9.4. Equipamento

- Agitador de placas modelo S2025-XLD-B, ProBlot Rocker 25XL (Labnet)
- Agitador vortex Genie II modelo G560 (Scientific Industries)
- Analisador bioquímico automático Architect[®] modelo C8000/Ci8200 (Abbott diagnostics)
- Autoclave modelo VA-SV 35 (Bluestone)
- Balança analítica ME103E (Mettler Toledo)
- Células verticais de eletroforese Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (BioRad)
- Centrífuga refrigerada Multifuge 1S-R (ThermoScientific)
- Espectrofotômetro para leitura de microplacas modelo xMark[™] (Bio-Rad)
- Estufa bacteriológica e de cultivo modelo Heratherm[™] (Thermo Fisher Scientific)
- FACSAria III (BD Biosciences),
- Fonte de corrente Brl 250 (Gibco Life Technologies)
- Homogeneizador de sonda de ultra-sons modelo 450 (Branson Sonifier)
- Homogenizador de tecidos modelo PT 3100 (Polytron)
- Medidor de pH modelo CyberScan pH 510 (Eutech)
- Microcentrífuga modelo EasySpin Plus (Eppendorf)
- Placa aquecimento/agitação para microtubos modelo Eppendorf[™] Thermomixer[™] R (Fisher Scientific)
- Placa de agitação modelo SP87325 (Thermo Scientific)
- Sistema de eletroforese Mini-Protean-3 (BioRad)
- Ultracentrífuga refrigerada L7-55 (Beckman)
- Unidades de incubação Miniblotter[®] 28 SL (Immunetics)
- Unidades de transferência Semi Dry Electrobloetter (Sartorius)
- *Scanner* HP Scanjet G2410 Flatbed Scanner (Hewlett-Packard)

9.5. Material

- Câmara de Neubauer
- Erlenmeyers
- Espátulas
- Frascos de vidro
- Gobelés
- Luvas descartáveis
- Magnetos
- Micropipetas P1, P5, P10, P100, P200, P1000 μ L e respectivas pontas
- Microplacas de 96 poços com fundo plano, Nunc™
- Microplacas de fundo redondo
- Microtubos de 1,5 e 2,0 mL
- Pipeta eletrónica e respetivas pipetas sorológicas 5, 10, 20 mL
- Pipetas de Pasteur estéreis
- Pipetas de vidro de 10 mL e de 20 mL
- Pipetas multicanais P100, P200, P1000 μ L e respetivas pontas
- Placas retangulares de poliestireno ThermoScientific™ Nunc™ OmniTray™
- Provetas 50 mL, 1 L, 2L
- Suportes de microtubos e de tubos de fundo cónico de 15 mL
- Tubos de plástico com fundo cónico de 15 mL estéreis
- Tubos de plástico com fundo cónico de 50 mL estéreis
- Tubos de vácuo com citrato de sódio, V= 5 mL, BD Vacutainer™
- Tubos de vácuo secos colheita de sangue, BD Vacutainer™
- Tubos de vidro com fundo redondo de 15 mL estéreis
- Película aderente
- Esponjas finas para *immunoblotting*
- Cassettes descartáveis Miniblotter® de 28 poços, 50 μ L cada