

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pâmela de Brum Soares

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PACIENTES
COM MIELOMA MÚLTIPLO**

Santa Maria, RS
2016

Pâmela de Brum Soares

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PACIENTES COM
MIELOMA MÚLTIPLO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Farmacêuticas.**

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva
Coorientadora: Prof^ª Dr^ª Daniela Bitencourt Rosa Leal

Santa Maria, RS
2016

Pâmela de Brum Soares

**AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PACIENTES COM
MIELOMA MÚLTIPLO**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do Grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**.

Aprovado em 25 de agosto de 2016:

José Edson Paz da Silva, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra.
(Coorientadora)

Jamile Fabbrin Gonçalves, Dra. (IFF Alegrete)

Juliana Fleck, Dra. (UNIFRA)

Danieli Valnes Magni, Dra. (UFSM)

Sandra Trevisan Beck, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

... aos meus pais, Carmen Cássia e José Mario, por todo exemplo e apoio,

...à minha irmã Tahiane, pelo amor inspirador à Hematologia.

*“A verdadeira viagem de descoberta
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos”.*

(Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo Àquele que está sempre presente guiando meus passos e iluminando minha trajetória, Deus.

Agradeço a todos os amigos da espiritualidade por estarem sempre de prontidão para me proteger e inspirar meus pensamentos.

Minha imensa gratidão aos meus pais Carmen Cássia e José Mario, por sempre me concederem segurança e base em minhas escolhas e conquistas, além do amor incondicional.

À minha irmã Tahiane, a qual positivamente influenciei na escolha profissional, e hoje retribui com admirável trabalho na área da Hematologia.

Aos meus orientadores José Edson e Daniela por proporcionarem a oportunidade de continuar minha caminhada acadêmica. Obrigada pela confiança e apoio!

Aos meus colegas da UFSM/Palmeira das Missões que me auxiliaram nos primeiros meses de ingresso no curso durante as minhas ausências.

Agradeço enormemente aos colegas do LAC/HUSM, especialmente ao José, Karla e Sabrina, pelo constante apoio e compreensão durante as ausências e períodos turbulentos.

Obrigada aos colegas da Hemato-Oncologia/HUSM que auxiliaram na coleta das amostras de sangue dos pacientes.

Meu agradecimento aos colegas do laboratório 4229 pela colaboração na realização deste trabalho. Agradeço especialmente à Claudinha, Livia e Liliane que estiveram presentes em muitas etapas dos experimentos. Meu reconhecimento e enorme gratidão ao Pedro, que iniciou como bolsista do projeto e esteve sempre disposto a encarar os desafios experimentais.

Enfim, a todos que colaboraram, seja de forma profissional como pessoal, o meu sincero muito obrigada!

*“Não haverá borboletas se a vida
não passar por longas
e silenciosas metamorfoses”.*
(Rubem Alves)

RESUMO

AVALIAÇÃO DA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM PACIENTES COM MIELOMA MÚLTIPLO

AUTORA: Pâmela de Brum Soares

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

O mieloma múltiplo (MM) é uma doença hematológica incurável caracterizada pela proliferação de população clonal de plasmócitos na medula óssea, que secretam anticorpos monoclonais ou fragmentos destes, ocasionando na falha da hematopoiese normal. Em adição às falhas nas respostas mediadas pelos anticorpos alterados, os pacientes demonstram defeitos nas suas respostas imunes celulares, sendo frequente a ocorrência de infecções. As nucleotidases, ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (NTPDase) e 5'-nucleotidase (5'-NT), e a adenosina desaminase (ADA), nas suas formas solúveis ou na superfície externa da membrana das células como nos linfócitos, têm demonstrado influenciar, direta ou indiretamente, o crescimento das células tumorais através da modulação de moléculas sinalizadoras como ATP, ADP, AMP e adenosina, através de vários mecanismos envolvendo o sistema purinérgico. Este sistema muda dinamicamente com o contexto fisiopatológico em que está inserido e está também ligado à produção de citocinas, afetando o crescimento, a sobrevivência e o processo de apoptose em células do mieloma. O objetivo deste estudo foi avaliar as atividades das enzimas NTPDase, 5'-NT e ADA, realizadas por espectrofotometria, presentes no soro de pacientes com MM tratados (n= 22) e não tratados (n=9), pelo menos nos últimos 90 dias (fase de platô), e do grupo controle (n=30), a sua correlação com as atividades das caspases 1, 3 e 8 realizadas por fluorimetria, e a relação com a concentração de diversas citocinas identificadas por citometria de fluxo. Além disso, também foram avaliadas as atividades de E-NTPDase e E-ADA por espectrofotometria, bem como o percentual de expressão de CD39⁺ e CD73⁺ em linfócitos, identificados através da citometria de fluxo, de pacientes com MM tratados (n=32) e não tratados (n=10) (fase de platô) e do grupo controle (n=85). Os resultados obtidos demonstraram uma redução na atividade de nucleotidases (NTPDase e 5'-NT) e um aumento da atividade de ADA no soro de pacientes com MM. Os níveis séricos das citocinas IL-6 e IL-10 estavam entre 80% e 100% mais elevados, respectivamente, em pacientes com MM e podem estar relacionados com efeitos imunossupressores e antiapoptóticos. Os efeitos antiapoptóticos parecem estar aumentados uma vez que as atividades das caspases 1, 3 e 8 estavam aproximadamente 70% reduzidas nos pacientes com MM e foram positivamente correlacionadas com as atividades de NTPDase e 5'-NT. A avaliação da atividade de E-NTPDase e percentagem de linfócitos CD39⁺ não foi modificada nos pacientes com MM, enquanto houve uma redução no percentual de linfócitos CD73⁺ nos pacientes tratados. Ainda, a atividade de E-ADA nos linfócitos apresentou-se aumentada em ambos os grupos de pacientes com MM, assim como no soro, indicando uma possível compensação frente a um aumento de adenosina extracelular. Dessa forma, pode-se concluir que os pacientes com MM apresentam uma modulação na sinalização purinérgica decorrente de alterações nas atividades ou percentual de expressão das enzimas responsáveis por este sistema, que estão relacionadas direta ou indiretamente com a concentração de algumas citocinas e atividade das caspases. O efeito da modulação do sistema purinérgico pode afetar a resposta imune destes pacientes e pode estar envolvido com a recaída da doença e/ou resistência aos tratamentos, além de suscetibilidade a infecções.

Palavras-chave: Mieloma múltiplo. Sinalização purinérgica. Citocinas. Caspases.

ABSTRACT

EVALUATION OF PURINERGIC SIGNALING IN PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA

AUTHOR: Pâmela de Brum Soares

ADVISOR: José Edson Paz da Silva

Multiple myeloma (MM) is an incurable hematological disorder characterized by clonal population of bone marrow plasma cells proliferation, which secrete monoclonal antibodies or fragments thereof, causing failure in normal hematopoiesis. In addition to failures in responses mediated by altered antibodies, the patients show defects in their cellular immune responses, often with the occurrence of infections. The nucleotidases, ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) and 5'-nucleotidase (5'-NT), and adenosine deaminase (ADA), in their soluble forms or in the external surface of the cell membrane such lymphocytes, have shown to influence, directly or indirectly, the growth of tumor cells by modulating of signaling molecules such as ATP, ADP, AMP and adenosine, by various mechanisms involving the purinergic system. This system dynamically changes with the pathophysiologic context in which it is inserted and is also linked to cytokines production, affecting the growth, survival and apoptosis process in myeloma cells. The aim of this study was to evaluate the activities of NTPDase, 5'-NT and ADA enzymes carried out by spectrophotometry, present in the serum of patients with MM treated (n = 22) and untreated (n = 9), at least in the last 90 days (plateau phase), and of the control group (n=30), its correlation with the activity of caspases 1, 3 and 8 performed by fluorimetry, and the relationship with the concentration of various cytokines identified by flow cytometry. Moreover, we also evaluated the activity of E-NTPDase and E-ADA by spectrophotometry as well as the percentage of CD39⁺ and CD73⁺ expression in lymphocytes, identified by flow cytometry, of MM patients treated (n = 32) and untreated (n = 10) (plateau phase) and of the control group (n=85). The obtained results demonstrated a reduction in the nucleotidases activity (5'-NT and NTPDase) and increased in ADA activity in serum from patients with MM. Serum levels of IL-6 and IL-10 cytokines were between 80% and 100% higher, respectively, in MM patients and may be related to immunosuppressive and anti-apoptotic effects. The anti-apoptotic effects appear to be increased since the activity of caspases 1, 3 and 8 were reduced approximately 70% in patients with MM and were positively correlated with the activities of NTPDase and 5'-NT. Evaluation of E-NTPDase activity and percentage of CD39⁺ lymphocytes was not modified in patients with MM, while there was a reduction in the percentage of CD73⁺ lymphocytes in the patients treated. Also, the E-ADA activity in lymphocytes presented increased in both groups of MM patients as well as in the serum, indicating a possible compensation against an increase of extracellular adenosine. Thus, it can be concluded that patients with MM exhibit a modulation in purinergic signaling resulting from changes in activities or percentage of expression of enzymes responsible for the system, that are directly or indirectly related to the concentration of certain cytokines and the activity of caspases. The effect of the modulation of the purinergic system may affect the immune response in these patients and may be involved in the relapse of the disease and / or resistance to treatment, and susceptibility to infections.

Keywords: Multiple Myeloma. Purinergic Signaling. Cytokines. Caspases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

| | |
|---|----|
| FIGURA 1 – Principais critérios avaliados para identificação do mieloma múltiplo | 14 |
| FIGURA 2 – Fases do mieloma múltiplo | 15 |
| FIGURA 3 – Interação entre a célula plasmática do mieloma múltiplo, o microambiente e o sistema imune..... | 18 |
| FIGURA 4 – Diagrama esquemático das vias de ativação da apoptose | 20 |
| FIGURA 5 – Representação dos componentes do sistema purinérgico | 23 |
| FIGURA 6 – Estimulação do receptor P2X7 na ativação da apoptose | 25 |
| FIGURA 7 – Enzimas envolvidas na degradação extracelular de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina | 26 |
| FIGURA 8 – Geração de adenosina via NAD ⁺ /CD38 em células do mieloma múltiplo | 30 |
| FIGURA 9 – Mecanismo de ação proposto dos fármacos utilizados no mieloma múltiplo .. | 32 |

MANUSCRITO 1

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – NTPDase activity in ATP (A) and ADP (B) hydrolysis, 5'-NT activity (C) and ADA activity (D) in serum of multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30)..... | 51 |
| FIGURA 2 – Serum levels of cytokines of patients with multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30)..... | 52 |
| FIGURA 3 – Caspases activities of patients with multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30)..... | 53 |

MANUSCRITO 2

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 – E-NTPDase activity in ATP (A) and ADP (B) hydrolysis, and E-ADA activity (C) in peripheral lymphocytes of untreated and treated multiple myeloma (MM) patients and control group | 65 |
| FIGURA 2 – CD39 and CD73 expression in peripheral lymphocytes of untreated and treated multiple myeloma (MM) patients and control group..... | 66 |

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

| | |
|---|----|
| TABELA 1 – General characteristics of the control group and multiple myeloma (MM) patients | 50 |
| TABELA 2 – Correlation among caspases and nucleotidases activities of untreated and treated MM patients..... | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------|---|
| ADP | adenosina difosfato |
| AMP | adenosina monofosfato |
| APAF-1 | fator de ativação de protease apoptótica |
| APRIL | fator de ligação proliferativo |
| ATP | adenosina trifosfato |
| BAFF | fator de ativação do linfócito B |
| CPs | células plasmáticas do mieloma múltiplo |
| DISC | complexo de sinalização indutor de morte |
| E-5'-NT | ecto-5'-nucleotidase |
| E-ADA | ecto-adenosina desaminase |
| EGF | fator de crescimento endotelial |
| E-NPP | ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase |
| E-NTPDase | ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase |
| EROS | espécies reativas do oxigênio |
| FADD | domínio de morte associado ao Fas |
| FGF | fator de crescimento de fibroblastos |
| FLC | <i>free light chain</i> – cadeia leve livre |
| GMSI | gamopatia monoclonal de significado indeterminado |
| GPI | glicosilfosfatidilinositol |
| HGF | fator de crescimento de hepatócitos |
| HIFs | fatores indutores de hipóxia |
| IAPs | proteínas inibidoras da apoptose |
| ICE | enzima conversora de interleucina-1 β |
| IFN | interferon |
| IGF | fator de crescimento semelhante à insulina tipo |
| IL | interleucina |
| MDSCs | células supressoras de origem mieloide |
| MIP-1 α | proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa |
| MM | mieloma múltiplo |
| MO | medula óssea |
| NAD | nicotinamida-adenina-dinucleotídeo |
| NF-kB | fator de transcrição nuclear kappa B |
| NK | <i>natural killer</i> |
| PAMPs | padrões moleculares associados a patógenos |
| PDGF | fator de crescimento derivado de plaquetas |
| RANKL | receptor do ligante de NF-kB |
| SDF | fator derivado do estroma |
| SMM | <i>smoldering</i> mieloma múltiplo – mieloma múltiplo indolente |
| TGF- β | fator de transformação do crescimento beta |
| Th | <i>T helper</i> |
| TLRs | receptores <i>Toll-like</i> |
| TNF- α | fator de necrose tumoral alfa |
| TRAIL | indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral |
| Tregs | células T regulatórias |
| VCAM | molécula de adesão vascular |
| VEGF | fator de crescimento do endotélio vascular |
| VLA | antígeno de ativação muito tardia |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 | EPIDEMIOLOGIA DO MM | 12 |
| 1.2 | ETIOLOGIA DA DOENÇA E CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS PLASMÁTICAS | 13 |
| 1.3 | CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO | 13 |
| 1.4 | INTER-RELAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE E O MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA | 16 |
| 1.5 | PROCESSO APOPTÓTICO E CASPASES | 19 |
| 1.6 | SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E O SISTEMA IMUNE | 21 |
| 1.6.1 | Nucleotídeos e nucleosídeo de adenina | 22 |
| 1.6.2 | Receptores purinérgicos | 24 |
| 1.6.3 | Ectoenzimas | 25 |
| 1.6.4 | Via alternativa de formação da adenosina | 28 |
| 1.7 | DANOS ORGÂNICOS RELACIONADOS E MEDIDAS DE SUPORTE | 30 |
| 1.8 | TRATAMENTOS ESPECÍFICOS | 31 |
| 1.9 | OBJETIVOS | 34 |
| 1.9.1 | Objetivo Geral | 34 |
| 1.9.2 | Objetivos Específicos | 34 |
| 2 | MANUSCRITO 1 - ALTERATIONS OF SERUM NUCLEOTIDASES AND ADA ACTIVITIES ARE INTERCONNECTED WITH CYTOKINES SECRETION AND CASPASES ACTIVITIES IN MULTIPLE MYELOMA PATIENTS | 36 |
| 3 | MANUSCRITO 2 - EVALUATION OF E-ADA AND E-NTPDASE ACTIVITIES AND CD39-CD73 EXPRESSIONS IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH MULTIPLE MYELOMA | 58 |
| 4 | DISCUSSÃO | 68 |
| 5 | CONCLUSÕES | 73 |
| 6 | PERSPECTIVAS | 74 |
| | REFERÊNCIAS | 75 |
| | ANEXO A | 88 |

1 INTRODUÇÃO

O mieloma múltiplo (MM) é uma neoplasia hematológica caracterizada pelo acúmulo de plasmócitos malignos na medula óssea (MO), presença de imunoglobulinas anômalas monoclonais ou fragmentos destas, chamadas de proteína M, no soro ou urina, lesões ósseas, doença renal e imunodeficiência (KYLE & RAJKUMAR, 2009). As manifestações clínicas surgem em decorrência de infiltração de plasmócitos neoplásicos nos órgãos, principalmente nos ossos (mais de 80% dos casos), de produção de imunoglobulinas em excesso e da supressão da imunidade humoral. Como consequência, observa-se falha da hematopoiese normal, lesões osteolíticas, insuficiência renal, infecções recorrentes e desequilíbrio homeostático (ANGTUACO et al., 2004; BACAL et al., 2005; PILARSKI et al., 1984).

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO MM

O MM é o segundo tumor hematológico mais comum e representa 2% de todas as malignidades recém-diagnosticadas nos Estados Unidos (SIEGEL et al., 2014). É predominantemente uma doença dos idosos, com idade média ao diagnóstico de 69 anos, e as taxas de incidência para homens e mulheres são 7,7 e 4,9 casos por 100.000 pessoas por ano, respectivamente. Comparado com brancos, os negros são afetados de 2 a 3 vezes mais frequentemente, enquanto a doença é menos comum em asiáticos americanos/Ilhas do Pacífico e intermediário para os índios americanos/nativos do Alasca e hispânicos (SEER, 2014). No Brasil, em levantamento que envolveu 16 centros e 1112 pacientes, foi encontrada mediana de idade de 60,5 anos, com predomínio de acometimento do sexo masculino (HUNGRIA et al., 2008). As taxas de mortalidade são também 2 a 3 vezes superiores em negros comparados com os brancos, com taxas de 7,9 por 100.000 homens e 5,4 por 100.000 mulheres na população negra versus 4,0 por 100.000 homens e 2,5 por 100.000 mulheres na população branca (SEER, 2014). Os mecanismos etiopatogênicos exatos que levam a MM são desconhecidos, mas vários fatores de risco foram identificados. Em termos de exposições ambientais e ocupacionais, radiação, pesticidas e produtos petrolíferos nucleares são reconhecidos como fatores de risco, dada a maior incidência de MM em agricultores e fabricantes de utensílios de madeira e couro (GREENBERG et al., 2012).

1.2 ETIOLOGIA DA DOENÇA E CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS PLASMÁTICAS

Acredita-se que o MM inicia a partir da transformação de plasmócitos de vida longa, um subconjunto de plasmócitos produtores de anticorpos que se abrigam na MO e sobrevivem por anos, contribuindo para a memória imunológica (ANDERSON & CARRASCO, 2011; HAUSER et al., 2003). A análise imunológica do perfil antigênico e sequenciamento da imunoglobulina da região variável mostrou que as células plasmáticas do MM (CPs) evoluem a partir de um centro de pós-germinativo, de um progenitor comum com mutações genéticas que ocorrem no início do estágio pré-B, e eventos oncogênicos posteriores que ocorrem já no estágio de células plasmáticas (BERGSAGEL et al., 1996; SAHOTA et al., 1997).

Do ponto de vista estrutural, as imunoglobulinas normais são compostas de cadeias pesadas e cadeias leves. Cada plasmócito produz um único tipo de cadeia pesada e um tipo de cadeia leve. As cadeias pesadas e leves são produzidas separadamente dentro dos plasmócitos e são montadas para formar uma imunoglobulina inteira (intacta). Quando as cadeias leves não são ligadas às cadeias pesadas, elas são chamadas “cadeias leves livres”. Os plasmócitos no MM produzem tipicamente mais cadeias leves do que o necessário para criar imunoglobulinas inteiras ou proteínas monoclonais e o excesso dessas cadeias entra na corrente sanguínea. A quantidade de cadeias leves livres produzida está ligada à atividade do crescimento da célula do mieloma: quanto mais células do mieloma, maior a produção de proteína monoclonal (INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION, 2015).

A avaliação por citometria de fluxo determina presença ou ausência de marcadores típicos e/ou aberrantes de plasmócitos normais e malignos, e pode ser utilizada como fator prognóstico. CD38 e CD138 são marcadores presentes em ambos, plasmócitos malignos e normais. Plasmócitos malignos expressam fenótipos aberrantes com expressão de CD56 e ausência do CD19 (BATAILLE et al., 2006).

1.3 CRITÉRIOS PARA DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DE PROGNÓSTICO

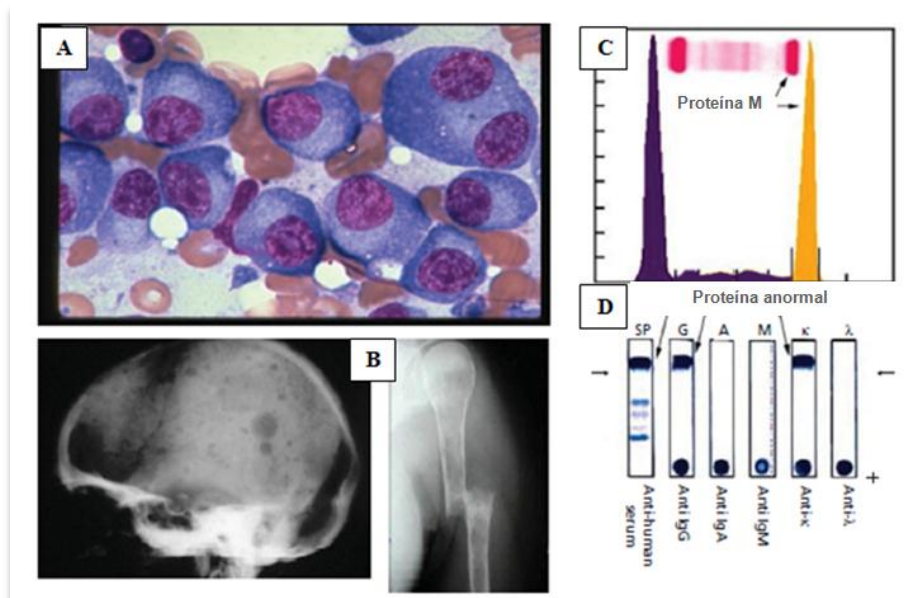
A maioria dos casos evolui de uma condição pré-maligna, assintomática, a gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI), caracterizada pela presença de um componente monoclonal sérico (imunoglobulina) de valor inferior a 3g/dL e plasmocitose medular menor que 10% da celularidade da MO, sem danos nos órgãos-alvos (caracterizados por anemia, insuficiência renal, hipercalcemia, lesões ósseas relacionadas à proliferação plasmocitária). A GMSI está presente em mais de 3% da população acima de 50 anos, e tem

uma taxa de progressão para MM de cerca de 1% ao ano (LANDGREN et al., 2009; WEISS et al., 2009).

Alguns pacientes desenvolvem estágio intermediário com critérios que compõem diagnóstico para MM (plasmocitose medular ≥ 10 e $< 60\%$ e/ou componente monoclonal sérico $\geq 3\text{g/dL}$), na ausência de lesões em órgãos-alvo. Esta condição, denominada mieloma múltiplo indolente (*smoldering* MM – SMM), apresenta taxa de progressão para MM de cerca de 10% ao ano nos primeiros cinco anos (RAJKUMAR et al., 2014).

Segundo a nova definição de MM, somando-se aos critérios já estabelecidos (presença de danos orgânicos), o diagnóstico baseia-se na identificação da plasmocitose medular $\geq 60\%$, *free light chains ratio* (razão de cadeias leves livres - FLC *ratio*) > 100 e mais de uma lesão óssea em ressonância nuclear magnética. Para diagnóstico e seguimento desses pacientes, eletroforese de proteínas, imunofixação e FLC *ratio* são os exames fundamentais (RAJKUMAR et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 – Principais critérios avaliados para identificação do mieloma múltiplo. (A) Células plasmáticas do MM na medula óssea (B) Lesões e fraturas ósseas (C) Eletroforese de proteínas séricas (D) Imunofixação.

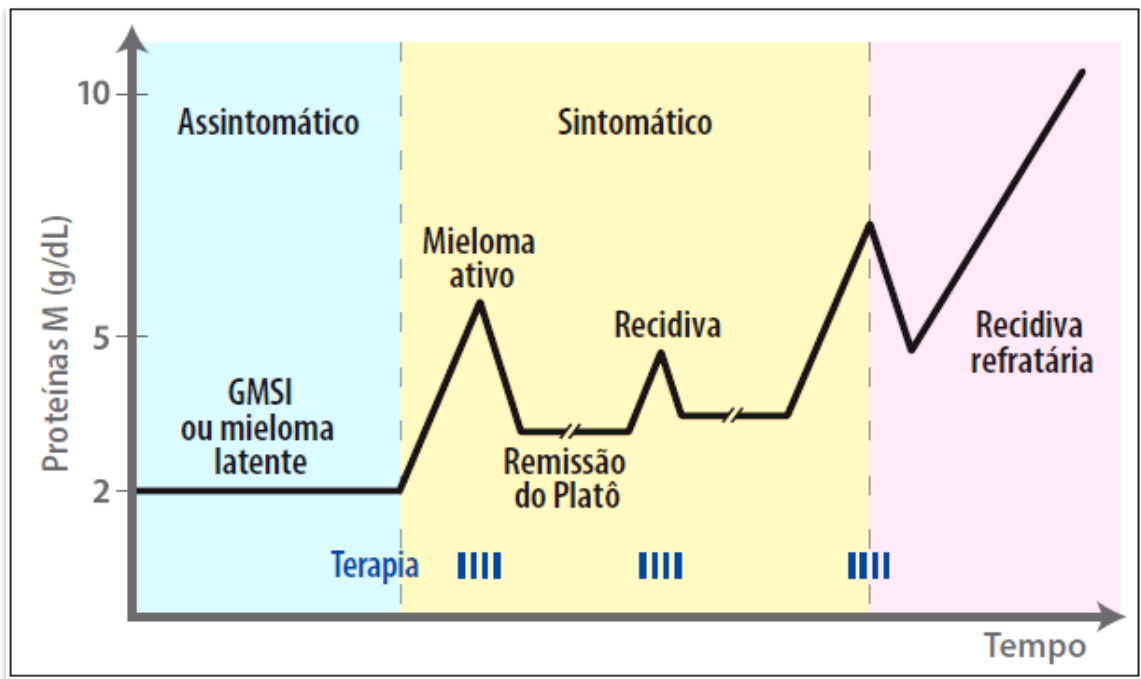


Fonte: Adaptado de HOFFBRAND et al., 2011.

O MM é caracterizado por diferentes estágios da doença (Figura 2), entre elas, a doença ativa, a fase de platô, recaída da doença, e finalmente, a resistência da doença (ABDI et al., 2013).

Após a confirmação do diagnóstico de MM (doença ativa), para melhor entendimento sobre a doença, identificação de grupos de risco e otimização terapêutica, faz-se necessário o conhecimento de fatores prognósticos (GREIPP et al., 2005).

Figura 2 – Fases do mieloma múltiplo



Fonte: Revisão Concisa das Opções e Tratamento de Doenças - Edição 2015 - Publicado pela INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION - Latin America em <http://www.mielomabrasil.org/publicacoes.php>. Acesso em 13 de agosto de 2016.

O curso clínico do MM é muito heterogêneo, e a sobrevida dos pacientes varia de poucos meses até mais de 10 anos, com mediana entre três e cinco anos (KYRTSONIS et al., 2009). O prognóstico em MM é afetado por fatores do hospedeiro, estágio da doença, a biologia da doença e resposta à terapia (PALUMBO et al., 2015; RUSSELL & RAJKUMAR, 2011). Os principais fatores prognósticos relacionados ao paciente são a idade, comorbidades e *performance status* (medida relacionada à tentativa de quantificar o bem-estar geral dos pacientes). Dentre os fatores relacionados à pior evolução nos pacientes mais idosos, encontra-se a presença de comorbidades, fragilidade, pior tolerância aos fármacos e elevadas taxas de descontinuação do tratamento (VAN DE DONK & SOONENVELD, 2014).

Existem ainda muitos subtipos moleculares de MM, associados com diferentes apresentações e prognóstico da doença, as quais estratificam os tipos de riscos com as anormalidades genéticas apresentadas (KUMAR et al., 2012). Assim, considerando os

critérios mencionados, existem dois grandes grupos de pacientes: aqueles que são considerados candidatos à consolidação com altas doses de quimioterapia seguidas de transplante de células-tronco hematopoiéticas, e um segundo grupo de pacientes, não elegíveis ao transplante de células-tronco hematopoiéticas (KYLE & RAJKUMAR, 2004).

1.4 INTER-RELAÇÃO DAS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE E O MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA

O MM possui uma característica bem reconhecida que é a presença de uma relação íntima entre as CPs e o microambiente da MO, onde as CPs são hospedadas em nichos especiais. Assim, como ocorre em outros tipos de cânceres, o sistema imunológico do hospedeiro e o microambiente têm um papel fundamental no crescimento de CPs, proliferação, sobrevivência, migração, efeito protetor sobre a apoptose induzida por fármacos levando à resistência, e são responsáveis por algumas manifestações clínicas do MM (ROMANO et al., 2014).

Além do componente celular representado por células hematopoiéticas, o microambiente é composto por células estruturais da MO (células estromais, osteoblastos, osteoclastos e adipócitos) e células endoteliais. As CPs interagem com a matriz extracelular (tais como laminina e fibronectina), moléculas de adesão (incluindo sindecan 1, molécula de adesão vascular-VCAM1 e antígeno de ativação muito tardia 4- VLA4), citocinas e fatores de crescimento [os mais estudados sendo interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de transformação de crescimento (TGF- β), fator derivado do estroma (SDF-1), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF)], produzidos por ambas as células estromais e próprias CPs. Todos estes componentes são capazes de proteger as CPs de efeitos citotóxicos da quimioterapia e radioterapia (FOWLER et al., 2014; NEFEDOVA et al., 2003).

Os progenitores hematopoiéticos normais residentes na MO utilizam sua adesão às células estromais e produção de citocinas para diferenciação em células sanguíneas maduras, enquanto as células do MM capitalizam estes mesmos estímulos, não para promover a diferenciação, e sim sua proliferação e resistência a vários estímulos pró-apoptóticos (MITSIADES et al., 2004).

Os mecanismos autócrinos e parácrinos e a adesão célula-célula regulam a produção de citocinas e fatores de crescimento pelas CPs dentro do microambiente da MO. Tem sido amplamente descrito que o fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB) desempenha um

papel chave na patogênese do MM dentro do microambiente da MO em que há um aumento da expressão e ativação de moléculas envolvidas em ambas as vias canônicas e não-canônicas do NF- κ B (HIDESHIMA, et al., 2002; 2009). Essas vias de sinalização do NF- κ B desempenham um papel importante não só para células do MM, mas também para muitos outros tipos de células do estroma por induzir a produção de citocinas que favorecem a sobrevivência, tais como IL-6, fator de ativação do linfócito B (BAFF) e fator de ligação proliferativo (APRIL) (MOREAUX et al., 2004).

A homeostase dos ossos é normalmente mantida pela atividade dos osteoblastos e osteoclastos. As CPs da MO induzem a osteoclastogênese e inibem a construção óssea por osteoblastos, alterando assim a homeostase e levando ao dano ósseo. Quando as CPs aderem às células do estroma, elas induzem a expressão do receptor do ligante de NF- κ B (RANKL) por células estromais, assim promovendo a ativação e diferenciação de osteoclastos (ZIPORI, 2010). A reabsorção óssea aumentada por osteoclastos é mediada por uma variedade de fatores de ativação de osteoclastos, como IL-6, proteína inflamatória de macrófagos 1 α (MIP-1 α), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), TNF- α , IL-1 β e HGF, e, produzida tanto pelas células tumorais, quanto pelas células estromais.

A angiogênese no MM é resultado de fatores físicos como hipóxia e substâncias químicas como fatores indutores de hipóxia (HIFs), VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento endotelial (EGF) (DI RAIMONDO et al., 2000).

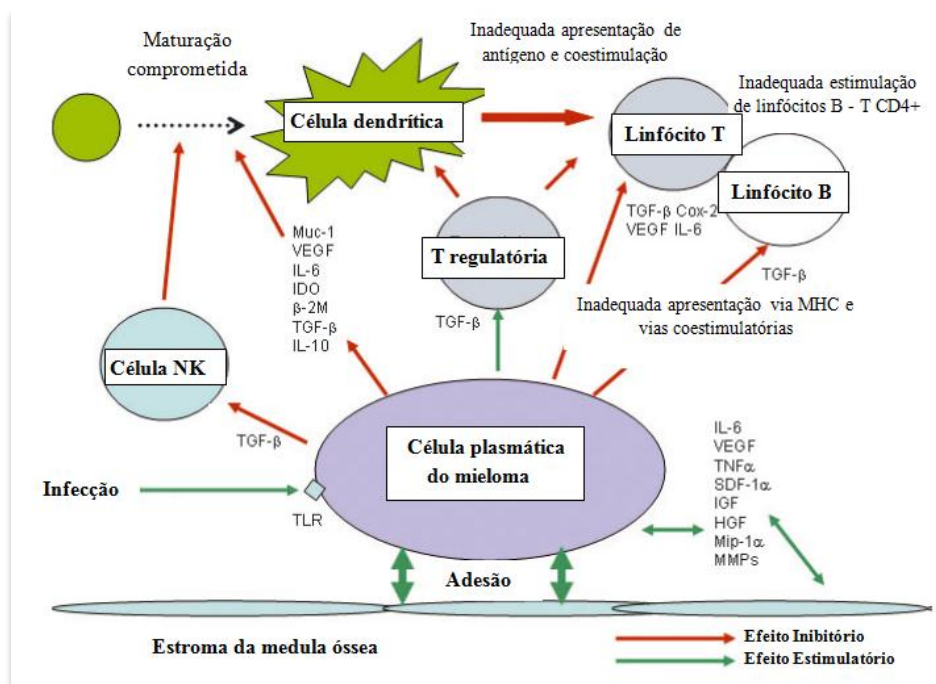
A disfunção imunitária relacionada ao MM também é capaz de modelar a atividade das CPs e a capacidade de dano (ROSSI et al., 2013). Assim, os pacientes com MM tem uma maior suscetibilidade a infecções e malignidades secundárias e esta é a contrapartida clínica de uma intrincada interação celular envolvendo os clones de CPs e o microambiente da MO.

Vários mecanismos em resposta às citocinas secretadas podem contribuir para a tolerância de células do MM, como a inadequada apresentação de antígeno (BRIMNES et al., 2006), resistência à lise pelas células NK e células T, B e NK defeituosas (BROWN et al., 2001; SMYTH et al., 2001) (Figura 3). O comprometimento da imunidade humoral e celular em MM está associada com problemas de diferenciação de células B e de respostas de anticorpos (BROWN et al., 2001; RAWSTRON et al., 1998), razão anormal de células T *helper* (Th)1/Th2 CD4⁺ (OGAWARA et al., 2005), e função prejudicada das células dendríticas (BROWN et al., 2001). Frequentemente existe uma menor contagem absoluta de T CD4⁺, associadas com uma significativa diminuição da razão de células T CD4/CD8, particularmente evidentes em pacientes com doença progressiva (KAY et al., 1999). O

equilíbrio Th1/Th2 é alterado com a redução de citocinas Th1 (como IL-2 e interferon IFN- γ) e com a superprodução de citocinas Th2 (IL-10 e IL-4) (SHARMA et al., 2010).

Uma subclasse de células T CD4⁺, as células T regulatórias (Tregs), foi relacionada com o desenvolvimento da doença. Estas células regulatórias exercem suas funções através da liberação de citocinas, principalmente IL-10 e TGF- β (BLUESTONE & ABBAS, 2003), e são capazes de controlar a resposta imune agindo direta ou indiretamente na apresentação de antígenos bem como na função efetora de células T, B e NK (O’GARRA & VIEIRA, 2004; SAKAGUCHI, 2005; VON BOEHMER, 2005). Uma atividade anormal de Tregs pode contribuir para a disfunção do sistema imune no MM.

Figura 3 – Interação entre a célula plasmática do mieloma múltiplo, o microambiente e o sistema imune



MHC - complexo principal de histocompatibilidade
Fonte: Adaptado de PRATT et al., 2007

Existe um grande interesse no potencial envolvimento de infecções na estimulação do crescimento e sobrevivências de células do MM (BOHNHORST et al., 2006; JEGO et al., 2006). Microrganismos apresentam estruturas altamente conservadas, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são reconhecidos pelos receptores Toll-like (TLRs) presentes em células imunitárias, desencadeando uma resposta imune inata. Bohnhorst et al. (2006) e Jego et al. (2006) que as células do MM expressam uma ampla gama

de TLRs e que a ativação de TLR7 e TLR9 por PAMPs induz o crescimento de células tumorais e previne a apoptose induzida por quimioterapia por ativação de via autócrina relacionada a IL-6.

Assim, o aumento da suscetibilidade de pacientes com MM a infecções resulta da interação entre terapias antineoplásicas, complicações relacionadas com a idade e da cumulativa imunossupressão resultante da própria doença, expandindo o espectro de potenciais patógenos nesta população (NUCCI & ANAISSIE, 2009). As infecções permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com MM (PRATT et al., 2007).

1.5 PROCESSO APOPTÓTICO E CASPASES

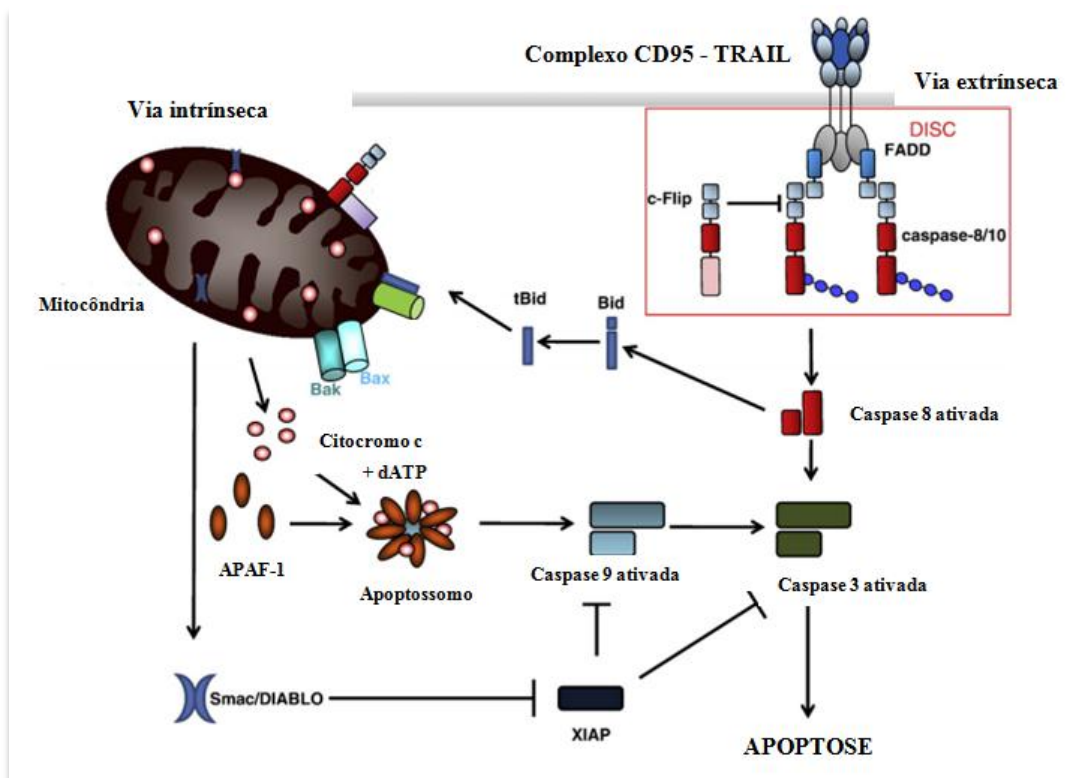
A análise do processo de tumorigênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos. Entre estes mecanismos está a resistência à morte por apoptose em células que escaparam do controle do crescimento e da diferenciação normais exercidos por fatores solúveis ou por contatos célula-célula ou célula-matriz extracelular até aquela induzida por lesões no DNA, por hipóxia ou por espécies reativas do oxigênio (EROS) (ZORNIG et al., 2001).

Os variados protocolos de tratamento de diversos tipos de cânceres recomendam uma combinação de fármacos que tem a função de inibir a proliferação, a diferenciação, a divisão e os processos de biossíntese de compostos, facilitando a morte das células malignas (MATHISEN et al., 2012), processos estes que estão desregulados no MM. A indução à apoptose foi identificada como um evento comum de diferentes classes de agentes anticâncer, sendo que a interrupção destes mecanismos pode levar à resistência a múltiplas drogas (JOHNSTONE et al., 2002). A apoptose é um processo de morte celular altamente regulado, fundamental para o controle da fisiologia celular e dos tecidos, em resposta a estímulos internos e externos, os quais levam à morte celular em poucas horas (KERR et al., 1972). Os mecanismos que regulam a apoptose são complexos e consistem na ativação de numerosas sinalizações e de componentes inibitórios (proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas, caspases), que compõem vários sistemas paralelos ou interrelacionados, os quais culminam na autodestruição celular. Quando esses mecanismos são alterados, em favor da sobrevivência das células, eles contribuem para o desenvolvimento e persistência do câncer (REED, 2000).

As caspases têm sido relacionadas como os principais mediadores da apoptose (FERRARI et al., 1998). Elas sinalizam para a apoptose clivando substratos que possuam

resíduos de aspartato, levando à condensação e fragmentação celular com externalização dos fosfolipídios de membrana, promovendo a fagocitose das células pelos macrófagos (BOATRIGT & SALVESEN, 2003; NICHOLSON & THORNBERRY, 1997). A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (Figura 4).

Figura 4 – Diagrama esquemático das vias de ativação da apoptose



c-FLIP- inibidor de FADD-ICE; XIAP - proteína inibidora da apoptose

SMAC/Diablo - segundo ativador mitocondrial de caspase/proteína de ligação direta ao IAP com baixo ponto isoelétrico

Fonte: Adaptado de KANTARI & WALCZAK, 2011

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral, dentre eles o Fas/CD95 e indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL) (FULDA & DEBATIN, 2006). A ligação de CD95 ou TRAIL aos seus respectivos receptores leva à trimerização do receptor e a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A proteína adaptadora FADD (domínio de morte associado ao Fas) é recrutada para o DISC onde os domínios de morte de ambas as proteínas interagem e disparam a enzima

conversora de interleucina-1 β (ICE; caspase-1) ou proteases ligadas a ICE (ENARI et al., 1995). FADD tem a capacidade de recrutar a caspase-8 e -10 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001). Caspase-8 também cliva a proteína Bid que inicia a cascata da apoptose via mitocondrial levando à liberação do citocromo c (LI et al., 1998).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes e pode ser regulada por proteínas da família Bcl-2 (bcl-2 e bcl-XL- repressoras ou Bax, Bid e Bak- indutoras da apoptose). O processo se inicia com a associação da proteína Bax à bcl-2, e assim ocorre a ativação das caspases (HENGARTNER, 2000).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial. Ocorre ainda a ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (liberação de citocromo c e SMAC/Diablo) (LOEFFLER & KREMER, 2000; GUPTA, 2003), perda da homeostasia celular, interrupção da síntese de ATP e aumento da produção de EROS (KROEMER & REED, 2000). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose (GOTTLIED, 2001). Quando no citosol, o citocromo c, juntamente com ATP, forma um complexo com o fator de ativação de protease apoptótica 1 (APAF-1) e a pró-caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (BUDIARDJO et al., 1999). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (RUPNARAIN et al., 2004; PETROS et al., 2004).

O estabelecimento de uma neoplasia envolve a proliferação celular desordenada e a supressão dos processos apoptóticos. A família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) desempenha um importante papel na oncogênese, por meio da inibição direta das caspases e pró-caspases e modulação do fator de transcrição NF-kB, levando à supressão efetiva da apoptose (HUNTER et al., 2007; ONCOBIOLOGIA, 2012).

1.6 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA E O SISTEMA IMUNE

A interação entre os vários componentes do sistema imunitário durante a ativação é realizada por múltiplas moléculas de sinalização. Estas moléculas, que podem ser liberadas em resposta à lesão tecidual ou de agentes patogênicos exógenos, sinalizam perigo para o hospedeiro e são necessários para iniciar respostas imunológicas primárias, bem como para

controlar o curso e resolução dos processos inflamatórios concomitantes (GALLUCCI & MATZINGER, 2001; SKOBERNE et al., 2004). Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares foram identificados como mediadores cruciais de sinalização endógena no microambiente tumoral e são conhecidos por interagir especificamente com os receptores purinérgicos. Estes processos de ativação celular utilizam diferentes vias de transdução da sinalização intracelular, denominadas como "sinalização purinérgica" (FENG et al., 2011). A sinalização purinérgica tem sido relacionada com muitos processos fisiológicos e patológicos, regulação do crescimento celular, metabolismo, angiogênese, inflamação e na imunidade (FENG et al., 2011).

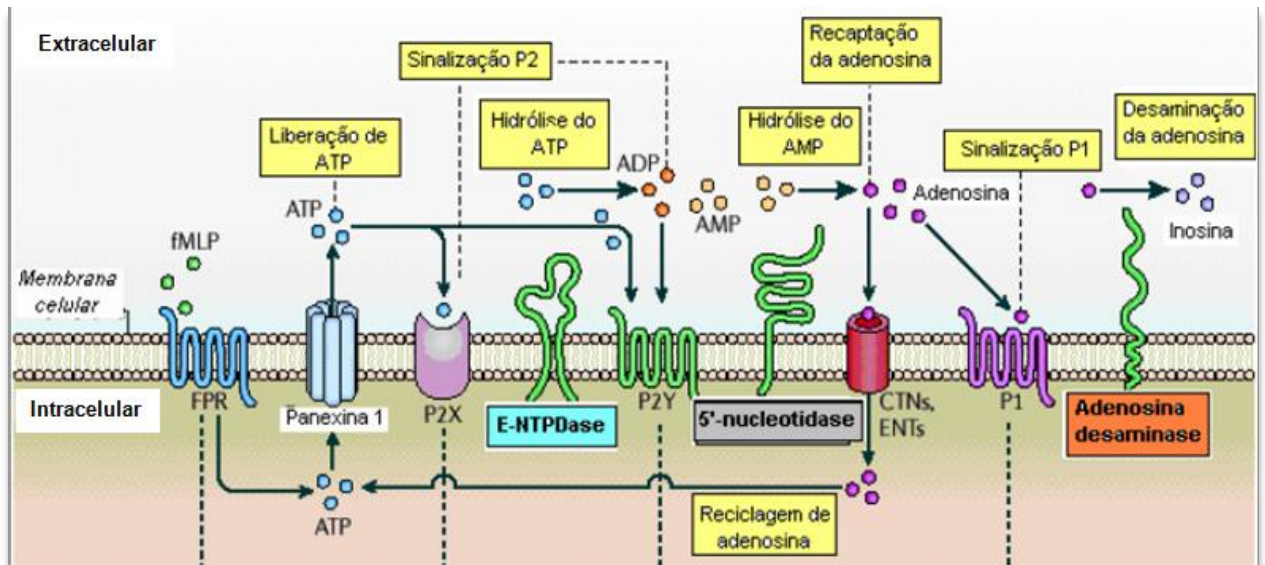
A sinalização purinérgica envolve três principais componentes (ATKINSON et al., 2006): (a) nucleotídeos (adenosina trifosfato – ATP, adenosina difosfato – ADP, adenosina monofosfato - AMP) e nucleosídeos extracelulares (adenosina e inosina), que são as moléculas mediadoras da sinalização; (b) receptores purinérgicos específicos (P2X, P2Y e P1), através dos quais os nucleotídeos e nucleosídeos exercem seus efeitos; c) as ectoenzimas, proteínas responsáveis pelo controle dos níveis dos mediadores no meio extracelular. Os componentes estão representados na Figura 5.

Diferentes tipos celulares, como plaquetas, linfócitos, neutrófilos, células endoteliais, entre outros, expressam distintos conjuntos de componentes de sinalização purinérgica, permitindo a formação de complexos personalizados de sinalização purinérgica (JUNGER, 2011).

1.6.1 Nucleotídeos e nucleosídeo de adenina

Os nucleotídeos da adenina (ATP, ADP e AMP) e seu nucleosídeo, adenosina, constituem uma classe de moléculas extracelulares que desempenha papel fundamental na modulação da resposta imune. Em condições fisiológicas, os nucleotídeos e o nucleosídeo adenosina encontram-se em baixas concentrações no meio extracelular (DI VIRGILIO et al., 2001). Quando em altas concentrações, o ATP pode atuar como molécula citotóxica e levar à morte celular, pela formação de grandes poros na membrana plasmática (PODACK et al., 1985; YOUNG et al., 1986).

Figura 5 – Representação dos componentes do sistema purinérgico. A ativação de um receptor (por exemplo, FPR por fMLP) na membrana conduz à abertura de hemicanais de panexina para que ocorra a liberação de ATP da célula. A liberação de ATP promove a ativação autócrina de receptores P2 (P2X e P2Y). Ectonucleotidases (tais como E-NTPDase e E-5'-NT) promovem a hidrólise de ATP, ADP e AMP até a formação de adenosina, que por sua vez, ativa os receptores P1. A adenosina é "neutralizada" pela E-ADA, que converte adenosina em inosina, ou é "reciclada" através de CNTs ou ENTs.



CNTs – Transportadores concentrativos de nucleosídeo ENTs- Transportadores equilibrativos de nucleosídeo
fMLP - n-formil-metionil-leucil-fenilalanina FPRs - Receptores de Formil Peptídeo

Fonte: Adaptado de JUNGER, 2011

A liberação de ATP pode ocorrer virtualmente em todos os tipos de células e esses mecanismos são ativados através do estímulo por meio de fatores estressantes ou dano celular, sejam esses bem regulados ou não controlados (SAVE & PERSSON, 2010). As formas conhecidas de liberação de ATP incluem: co-liberação de ATP em vesículas sinápticas e neurotransmissores mediante fusão com a membrana celular (MACDONALD et al., 2006), mediação lisossômica de liberação de ATP por meio de exocitose (BURNSTOCK, 2007; ZHANG et al., 2007); as células inflamatórias ou apoptóticas liberam ATP através de vários tipos de canais de membrana/vias de efluxo, incluindo hemicanais de conexinas e panexinas (HUANG et al., 2007; KANG et al., 2008), canais aniônicos regulados por volume (KOYAMA et al., 2009) e receptores purinérgicos do tipo 2 (P2) como P2X4 e P2X7 (SUADICANI et al., 2006). Finalmente, o escape direto e descontrolado de ATP pode ocorrer em centros de tumores que proliferam rapidamente assim que as células tornam-se necróticas (ao ultrapassar o seu fornecimento vascular) ou através de membranas rompidas de células tumorais mortas quando tratadas com radioterapia ou quimioterapia (ELTZSCHIG, 2009;

SELZNER et al., 2004).

Extracelularmente, o ATP participa de uma série de processos biológicos como: neurotransmissão, contração muscular, função cardíaca, agregação plaquetária, metabolismo do glicogênio hepático, processos inflamatórios e tumorais (TORRES et al., 2002). O ATP é capaz de estimular a produção de várias citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , estimular a proliferação de linfócitos e promover a inibição da agregação plaquetária (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998; SLUYTER et al., 2001). Porém, em baixas concentrações ou quando gerado cronicamente, ATP pode ter efeitos anti-inflamatórios (BOEYNAEMS & COMMUNI, 2006; DI VIRGILIO, 2005). O ADP não possui um papel definido nos linfócitos (DI VIRGILIO et al., 2001), porém, nas plaquetas, ele age como um importante mediador da agregação plaquetária e da tromborregulação, podendo ser liberado na circulação sanguínea após danos teciduais (ZIMMERMANN, 1999a). Já o AMP é um metabólito intermediário da hidrólise do ATP (BARSOTTI & IPATA, 2004) que exerce a função de sinalizador em situações de desequilíbrio no metabolismo, servindo também como substrato para a formação da adenosina (CUNHA, 2001; LATINI & PEDATA, 2001).

Quando presente no meio extracelular, o nucleosídeo adenosina protege células e tecidos da excessiva inflamação (propriedades anti-inflamatórias) e danos mediados por células imunes enquanto promove o processo de reparo. A adenosina também suprime respostas imunes, como ocorre em microambientes tumorais, promovendo a angiogênese e evasão tumoral (LONGHI et al., 2013). A inosina é outro nucleosídeo endógeno que tem propriedades anti-inflamatórias e é capaz de diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios (HASKÓ et al., 2000).

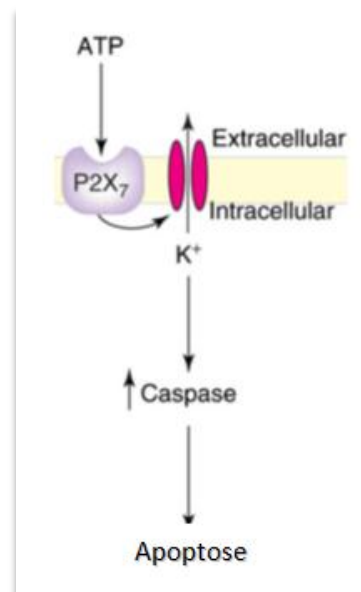
1.6.2 Receptores purinérgicos

Os nucleotídeos extracelulares não atravessam a membrana plasmática, mas exercem suas ações biológicas através de receptores específicos presentes na superfície celular (DI VIRGÍLIO et al., 2001). Os receptores purinérgicos são divididos conforme suas propriedades farmacológicas e estruturais em três principais famílias: receptores P2X, receptores P2Y e receptores P1, constituindo um total de 19 subtipos diferentes (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). O ATP extracelular e seus metabólitos são reconhecidos por duas famílias de receptores purinérgicos, P1 e P2, presentes na superfície de diversas células cujos membros são ativados pela adenosina e por ATP e ADP, respectivamente (BURNSTOCK, 2007). Os receptores P1 são acoplados à proteína G (metabotrópicos) e representados por A1, A2A,

A2B e A3. Os purinorreceptores P2 podem ainda ser divididos em duas subclasses: acoplados à proteína G, chamados de P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14), e os ligados a canais iônicos, designados P2X (P2X1-7) (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998, DI VIRGÍLIO et al., 2001).

A liberação de grande quantidade de ATP intracelular durante o processo inflamatório aumenta a sinalização purinérgica principalmente através da ativação do receptor P2X7 desencadeando eventos pró-inflamatórios. Neste processo, o aumento de ATP dentro do microambiente tumoral é crucial, já que ATP estimula o receptor P2X7 de células dendríticas para dirigir a secreção da citocina pró-inflamatória chave IL-1 β . Esta citocina potencializa a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4⁺, aumentando assim a resposta imune antitumoral (BURNSTOCK & DI VIRGILIO, 2013). Além disso, a ação antineoplásica de ATP é devida a inibição da proliferação celular, promoção da diferenciação e/ou morte celular, e estes efeitos resultam da estimulação de um ou mais subtipos de receptores P2, sendo o P2X7 o mais relatado por ativar a apoptose via cascata das caspases (MARTINS et al., 2009) (Figura 6).

Figura 6 – Estimulação do receptor P2X7 na ativação da apoptose



Fonte: Adaptado de BURNSTOCK & DI VIRGILIO, 2013

1.6.3 Ectoenzimas

O controle dos níveis extracelulares dos nucleotídeos de adenina e adenosina, assim como da ativação dos receptores purinérgicos é fundamental na manutenção dos processos

(ENJYOJI et al., 1999; ZIMMERMANN, 1999b), e nestes tecidos está principalmente associado com as células endoteliais e as populações de células imunitárias, tais como células B, células NK, células dendríticas, células de Langerhans, macrófagos, células mesangiais, neutrófilos e células Tregs (DWYER et al., 2007). A expressão de CD39 é regulada por várias citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia (DEAGLIO & ROBSON, 2011; ELTZSCHIG et al., 2009) para desempenhar importante controle da função dos linfócitos, como o reconhecimento de antígenos, a ativação de funções efetoras das células T citotóxicas e a capacidade de gerar sinais que amplificam interações célula-célula (KACSMARECK et al., 1996; FILIPPINI et al., 1990). Foi demonstrada a circulação de uma forma cataliticamente ativa solúvel de CD39 no sangue humano (YEGUTKIN et al., 2012).

5'-NT (CD73) é responsável pela desfosforilação de ribo- e desoxirribonucleossídeos 5'-monofosfatados como AMP, CMP, UMP, IMP e GMP, porém com uma maior afinidade pelo AMP, sendo por isto considerada a principal enzima responsável pela formação de adenosina (ZIMMERMANN et al., 2012). Uma forma solúvel de CD73 pode ser liberada a partir da membrana através de clivagem proteolítica ou da hidrólise de glicosilfosfatidilinositol (GPI) da membrana por GPI-fosfolipase específica (HEUTS, 2012; YEGUTKIN, 2008). Há evidências de que a expressão e a função desta enzima são reguladas positivamente pela presença de vários mediadores pró-inflamatórios, tais como TGF- β , IFNs, TNF- α , IL-1 β e prostaglandina E2 (BEAVIS et al., 2012; REGATEIRO et al., 2011). Assim como CD39, ela é amplamente encontrada em uma variedade de tecidos e células (COLGAN et al., 2006).

As NPPs hidrolisam ligações pirofosfato ou fosfodiéster em uma ampla variedade de substratos, como nucleotídeos, ácidos nucleicos, fosfoésteres de colina e fosfolipídeos, resultando na liberação de 5'-monofosfatatos (BOLLEN et al., 2000; GODING et al., 2003; STEFAN et al., 2005), porém as diferentes isoformas apresentam especificidade por determinados substratos (STEFAN et al., 2006). As NPPs regulam processos intra e extracelulares, incluindo reciclagem de nucleotídeos, modulação da sinalização dos receptores purinérgicos, regulação dos níveis de pirofosfato extracelular, diferenciação celular, estimulação da motilidade celular, atividade das ecto-quinases e provavelmente, regulação do receptor de insulina (BOLLEN et al., 2000).

A ADA é responsável pela desaminação irreversível da adenosina e 2'-deoxiadenosina em inosina e 2'-deoxinosina, respectivamente (RESTA et al., 1998; ROBSON et al., 2006). Em humanos existe na forma de duas isoenzimas classificadas como ADA1 e ADA2, cada uma com suas particulares propriedades bioquímicas (SHAROYAN et al., 2006). A ADA1 é

uma isoenzima encontrada em todas as células e tecidos humanos, cuja localização é principalmente citosólica. Apresenta alta atividade em linfócitos, sendo que quase toda atividade da ADA humana é atribuída a esta isoenzima (ZAVIALOV; ENGSTROM, 2005). Além disso, apesar de sua localização intracelular, ADA1 pode estar combinada com uma proteína combinante, formando um complexo que constitui uma ecto-ADA, localizada na superfície celular (TSUBOI et al., 1995). Já a ADA2 apresenta diferenças tanto estruturais quanto cinéticas e é encontrada predominantemente no soro de indivíduos normais (UNGERER et al., 1992). Estudos têm sugerido que ADA2 no plasma humano pode ser secretada por monócitos ativados em processos inflamatórios, tendo a habilidade de regular a proliferação celular (IWAKI-EGAWA et al., 2006). A ADA desempenha um papel chave no sistema imune, uma vez que está diretamente relacionada com a proliferação, a maturação e a função destas células (GORELL et al., 2001).

1.6.4 Via alternativa de formação da adenosina

Adenosina pode ser gerada por outras rotas como a que utiliza nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) através da coordenada ação de CD38 (NAD glicohidrolase) que gera ADP ribose, e E-NPP1 (também conhecida como PC-1 ou CD203a), gerando AMP. Devido à sua grande expressão na superfície das células no MM, CD38 pode representar um controlador dos níveis de NAD⁺ (forma oxidada de NAD) no interior do nicho onde as CPs crescem. Como consequência, as atividades enzimáticas desse ambiente podem conduzir a uma produção significativa de adenosina gerando um ambiente que é extremamente favorável para a sobrevivência de tumores em áreas que são de difícil alcance por fármacos. Este resultado pode também ser consequência da cooperação entre as diferentes células que compõem o microambiente (HORENSTEIN et al., 2015), já que adenosina é um fator de crescimento para osteoblastos e osteoclastos, células que estão intimamente ligadas à patogênese do MM e expressam também PC-1/CD203a e CD73, respectivamente (TAKEDACHI et al., 2012).

Ainda existe a hipótese de que o metabolismo da adenosina via NAD⁺ pode influenciar o fenótipo e função de células Tregs, contribuindo assim para o silenciamento dos efetores imunitários (HUBERT et al., 2010), através da regulação das células supressoras de origem mieloide (MDSCs). As MDSCs estão significativamente aumentadas em pacientes com MM, induzindo o crescimento de CPs, enquanto suprimem as respostas mediadas por células T e regulam positivamente as células Tregs (FAVALORO et al., 2014).

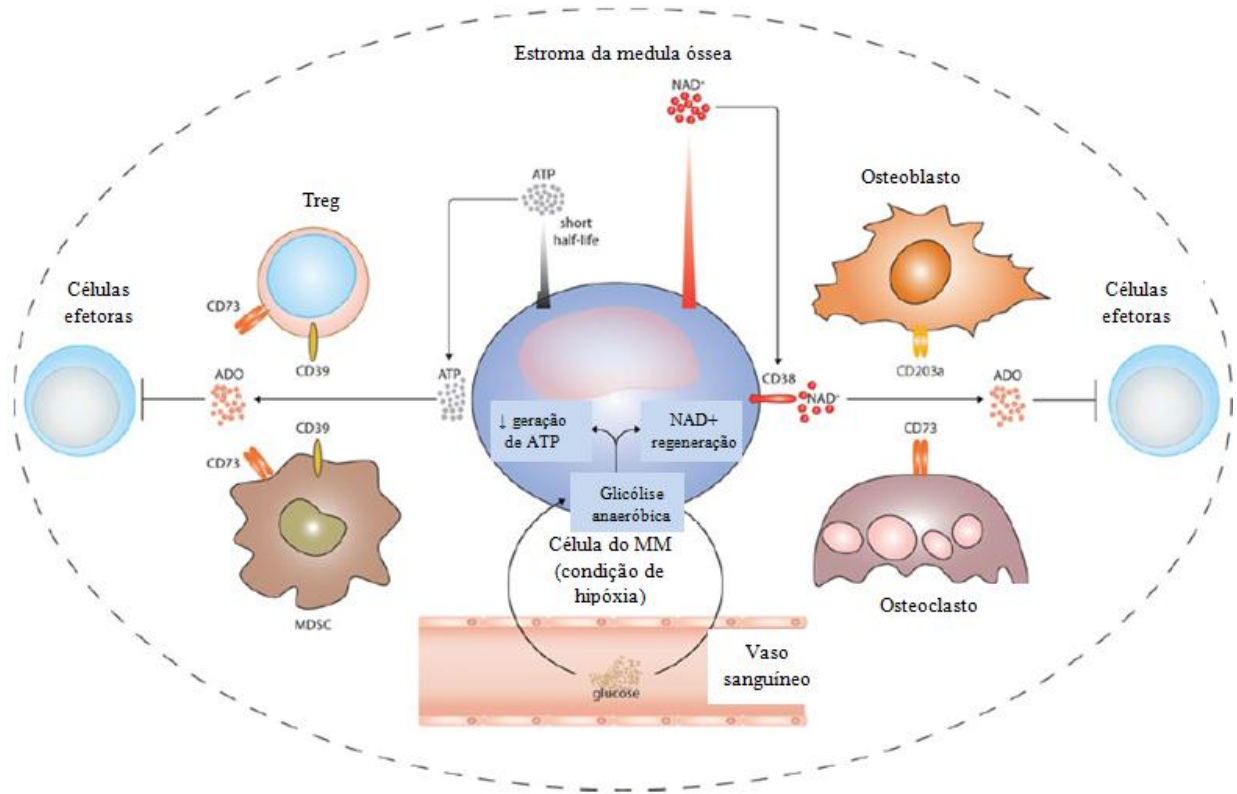
NAD, assim como ATP, é liberada em sítios de tecidos danificados ou inflamação e degradado em compartimentos extracelulares. No espaço extracelular, NAD⁺ pode ligar-se a receptores purinérgicos P2 ou servir como substrato para uma cadeia de ectoenzimas. Como substrato, é convertido em adenosina e, em seguida, absorvido pelas células, onde é transformado e reincorporado aos nucleotídeos intracelulares (HORENSTEIN et al., 2015). NAD⁺/CD38 parece representar um elemento crítico no sistema imune influenciando múltiplos processos (HAAG et al., 2007; LONGHI et al., 2013).

A hipóxia, resultante da desorganização vascular frequentemente presente nas massas tumorais (ROH et al., 2009) é responsável por, nesse microambiente, promover o aparecimento de importantes alterações da expressão gênica mediadas, sobretudo, por HIF-1 α e HIF-2. Ocorre uma sequência de mecanismos adaptativos do metabolismo celular à hipóxia, nomeadamente a substituição de fosforilação oxidativa para o metabolismo glicolítico que promove a acidose (devido à produção de grandes quantidades de ácido láctico) (SEMENZA, 2009), a promoção da angiogênese, favorecendo o crescimento tumoral (LIAO & JOHNSON, 2007) e, ainda, a promoção da fuga celular à hipóxia estimulando a capacidade metastática das células malignas (FERRER et al., 2010) através do aumento da produção de adenosina no microambiente hipóxico. Assim, a hipóxia é considerada como um dos mecanismos mais importantes no desenvolvimento da agressividade tumoral, da metastização e do prognóstico desfavorável (SATO et al., 2013).

CD38 está relacionado com a patogênese de diferentes doenças, predominantemente as que afetam a linhagem hematopoiética (MALAVASI et al., 2011). A atividade enzimática de CD38 é altamente dependente do pH. A redução de pH que ocorre durante a glicólise anaeróbica com redução da produção de ATP e aumento simultâneo da geração de NAD⁺ é seguida por uma marcada inibição da atividade de CD73/5'-NT (YEGUTKIN, 2014). O efeito é a redução da produção de adenosina sob tais condições. Em tal situação, acredita-se que uma fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) – uma nucleotidase ativa em ambiente ácido - pode eficientemente cooperar na produção adenosina. Em ambiente de reabsorção óssea típica do nicho da MO no MM, as condições ácidas estão relacionadas a presença de osteoclastos (CD38⁺/CD203a⁺/ CD73⁺/TRAP⁺) que são capazes de metabolizar NAD⁺ em pH 5,5 gerando AMP e adenosina (HORENSTEIN et al., 2015).

Essa rota alternativa de formação de adenosina foi demonstrada por Quarona et al. (2015) e Horenstein et al. (2015) em células do MM para escapar da intrincada rede de defesa imune subvertendo mecanismos fisiológicos normais, como demonstrado na Figura 8.

Figura 8 – Geração de adenosina via NAD^+ /CD38 em células do mieloma múltiplo. As condições de hipóxia desencadeiam a glicólise anaeróbica, com redução da produção de ATP e aumento simultâneo da geração de NAD^+ . NAD^+ é o substrato de CD38 para ativação da via alternativa com formação de adenosina como produto final, através de PC-1/CD73.



ADO – adenosina MDSCs - células supressoras de origem mieloide
 Fonte: Adaptado de QUARONA et al., 2015.

1.7 DANOS ORGÂNICOS RELACIONADOS E MEDIDAS DE SUPORTE

Todos os processos descritos anteriormente identificados no MM culminam na apresentação clínica de sintomas característicos. A presença de danos orgânicos é considerada um dos critérios básicos para identificação da doença. Os principais sintomas referem-se à anemia, insuficiência renal, hipercalcemia e lesões líticas.

O MM pode causar anemia de doença crônica, devido à excessiva produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-1, IL-6 e TNF, que suprimem a eritropoiese e a insuficiência renal reduz a produção de eritropoietina (MITTELMAN, 2003). Além disso, existe ainda o efeito mielossupressivo e nefrotóxico dos quimioterápicos. Transfusões sanguíneas e uso de eritropoietina são indicados (BARLOGIE et al., 2004).

O dano renal ocorre secundário a deposição de cadeias leves monoclonais no glomérulo, causando proteinúria e progressão lenta da insuficiência renal e efeitos

nefrotóxicos dos quimioterápicos (FAIMAN et al., 2011). É indicada a reposição salina com furosemida, plasmaférese e hemodiálise (MAIOLINO & MAGALHÃES, 2007).

A hipercalcemia é originada da atividade aumentada dos osteoclastos que causam reabsorção óssea elevando o cálcio sérico. É característica de doença avançada e grande volume tumoral (OYAJOB, 2007). É indicada a reposição salina com furosemida, uso de bifosfonatos e calcitonina (ROSEN et al., 2001).

A doença óssea no MM é causada pelas interações celulares dentro da MO e pode causar dor óssea severa, compressão espinhal, osteoporose difusa, hipercalcemia e fraturas patológicas (BIRD et al., 2011). As fraturas ocorrem em aproximadamente 40% dos pacientes com MM, comprometendo a mobilidade, independência e qualidade de vida (SONMEZ et al., 2008). Neste caso são indicados os fármacos inibidores de osteólise (pamidronato e ácido zoledrônico).

1.8 TRATAMENTOS ESPECÍFICOS

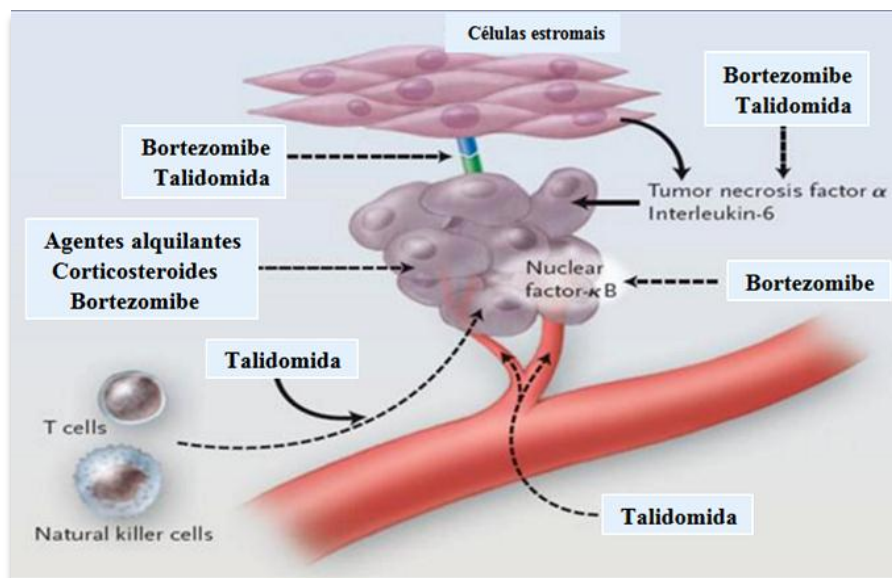
A plasticidade com que as células tumorais respondem aos tratamentos afeta o seu crescimento e sobrevivência, e assim são recomendados protocolos utilizando terapias multialvos. As células cancerosas têm menos oportunidade de se adaptar e a sinergia de drogas são mais eficazes na redução da carga tumoral (LEHÁR et al., 2009). Para o MM existem inúmeros protocolos preconizados os quais utilizam as informações relativas ao paciente (idade, comorbidades e *performance status*) para escolha da melhor combinação terapêutica, além de avaliação dos critérios de resposta às terapias, de recidiva e resistência.

Com a introdução de novos agentes (talidomida e bortezomibe), as terapias convencionais passaram a ser utilizadas geralmente em associação com estes (Figura 9). A ciclofosfamida, um agente alquilante que exerce seus efeitos citotóxicos ao reagir com o nitrogênio das bases do DNA (COLVIN, 2003), é utilizada principalmente em combinação com bortezomibe e dexametasona. A capacidade de induzir apoptose na linhagem hematopoiética linfóide torna atraente a inclusão dos corticosteroides nas linhas terapêuticas para doenças linfoproliferativas como o MM (GREENSTEIN et al., 2002), sendo muito comum o uso de prednisona ou dexametasona associados às demais terapias.

A talidomida, um fármaco imunomodulador, foi o primeiro tratamento capaz de agir sobre as células do MM e do microambiente ao mesmo tempo. Seu mecanismo de ação inclui inibição direta dos plasmócitos malignos via imunomodulação de células T e aumento da atividade das células NK (DAVIES et al., 2001). Também afeta as células estromais através da

redução da expressão de fatores angiogênicos (IL-6, TNF- α , FGF, VEGF) via modulação gênica nas células endoteliais (VACCA et al., 2005). A talidomida pode induzir *in vitro* a parada de crescimento durante a fase G1 do ciclo celular e induzir a apoptose através da ativação da caspase 8 e/ou o aumento a sensibilidade de células MM a apoptose induzida por Fas (HIDESHIMA et al., 2000; MITSIADES et al., 2002b).

Figura 9 – Mecanismo de ação proposto dos fármacos utilizados no mieloma múltiplo. Em células do mieloma, agentes alquilantes, corticosteroides e bortezomibe inibem o crescimento celular e induzem a apoptose. O efeito do bortezomibe em células do mieloma é mediado em parte pela inibição do fator nuclear- κ B. Talidomida e bortezomibe inibem a interação entre as células do mieloma e células do estroma, bem como a produção de citocinas (fator de necrose tumoral- α e IL-6). Talidomida inibe a angiogênese e estimula as propriedades imunoprotetoras de células T e células NK.



Setas preenchidas - indicam estímulo ou secreção e setas tracejadas indicam inibição.
Fonte: Adaptado de KYLE & RAJKUMAR, 2004.

O bortezomibe foi o primeiro inibidor de proteassoma a ser testado em estudos clínicos. O seu efeito terapêutico é, provavelmente, resultado da citotoxicidade direta e dos efeitos no microambiente da MO (MITSIADES et al., 2002a; HIDESHIMA et al., 2003). Uma das consequências da inibição do proteassoma é o acúmulo do inibidor kappa B, um inibidor de NF- κ B (PALOMBELLA et al., 1994). A inibição do NF- κ B leva a uma diminuição da expressão das moléculas de adesão e de vários fatores de proliferação, sobrevivência e angiogênicos. Causa também uma diminuição das proteínas que inibem a apoptose (MITSIADES et al., 2002a).

Equilibrar a reabsorção óssea é uma das formas de tratar as complicações do MM. Os

melhores inibidores da atividade osteoclástica são os bisfosfonatos (pamidronato e ácido zoledrônico) (HUNGRIA, 2007b). Os inibidores de osteólise possuem a capacidade de bloquear os osteoclastos, impedindo sua ação osteolítica e desencadeando sua apoptose (DIAZ et al., 2004). O efeito antitumoral pode ocorrer por efeito direto nas células do mieloma ou por efeito indireto, isto é, a inibição da reabsorção óssea levaria a alterações do microambiente, tornando-o menos favorável à proliferação das células do mieloma (HUNGRIA, 2007b). Tomando como protótipo o pamidronato ocorre uma ação antitumor através da inibição da IL-6 (BITTENCOURT, 2007).

Apesar dos progressos no tratamento do MM, com aumento da sobrevida livre de progressão observada principalmente em pacientes abaixo de 65 anos, o mieloma ainda é uma doença incurável e a maioria dos pacientes recidivará. O padrão da recidiva é muito heterogêneo, podendo evoluir com comportamento indolente ou agressivo. Enquanto alguns pacientes apresentam recidiva precoce, com pior prognóstico, e provavelmente responderão mal ao tratamento, outros apresentam recidiva após um longo período de platô e provavelmente atingirão uma melhor resposta à terapia (HUNGRIA, 2007a). O escape da fase de platô não é bem compreendido, quase todos os pacientes recidivarão dentro de meses ou anos, apresentando doença clinicamente ativa em pacientes que receberam uma ou mais terapias anteriores (ANDERSON et al., 2008), podendo ainda tornar-se resistentes a essas terapias.

Modificações nos componentes da sinalização purinérgica, mediante alterações na secreção de citocinas e atividade das caspases, podem favorecer ou inibir as respostas imunes necessárias para controle da doença e eventos relacionados, o que pode ser promissor no estudo de novas terapias para o MM.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a sinalização purinérgica em pacientes com mieloma múltiplo, investigando a modulação da resposta imune frente a esta doença.

1.9.2 Objetivos específicos

Em pacientes com mieloma múltiplo sem tratamento e em pacientes com uso de medicamentos indicados para essa doença, pretende-se:

- avaliar a atividade das enzimas NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA no soro;
- determinar os níveis séricos de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF, INF- γ);
- determinar as atividades das caspases 1, 3 e 8 de células mononucleares de sangue periférico;
- correlacionar as atividades de NTPDase, 5'-nucleotidase e ADA com a atividade das caspases;
- avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase e E-ADA em linfócitos;
- determinar o percentual de linfócitos CD39⁺ e CD73⁺.

APRESENTAÇÃO

Os resultados desta tese estão apresentados sob a forma de dois manuscritos submetidos, os quais se encontram nos itens “**MANUSCRITO 1 e MANUSCRITO 2**”. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais a respeito dos resultados apresentados nos manuscritos. Nos itens **LISTA DE ABREVIATURAS** e **REFERÊNCIAS** encontram-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

2 MANUSCRITO 1

Alterações nas atividades séricas das nucleotidasas e ADA estão interconectadas com a secreção de citocinas e atividade das caspases em pacientes com mieloma múltiplo

Alterations of serum nucleotidasas and ADA activities are interconnected with cytokines secretion and caspases activities in multiple myeloma patients

Pâmela de B. Soares, Pedro H. Doleski, Lívia G. Castilhos, Liliane Z. de Oliveira, Marta M. M. F. Duarte, Stephen A. Adefegha, Daniela B. R. Leal, José E.P.da Silva

Submetido na revista “Clinica Chimica Acta” - Full-length research article

Alterations of serum nucleotidases and ADA activities are interconnected with cytokines secretion and caspases activities in multiple myeloma patients

Pâmela de Brum Soares^{a,b}, Pedro Henrique Doleski^{a,c}, Livia Gelain Castilhos^{a,c}, Liliane Zimmermann de Oliveira^{a,b}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte^d, Stephen Adeniyi Adefegha^{c,e}, Daniela Bitencourt Rosa Leal^{a,b,c}, José Edson Paz da Silva^{b,f*}

^a Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

^d Universidade Luterana do Brasil, BR 287, Km 252, Trevo Maneco Pedroso, Boca do Monte, 97020-001, Santa Maria-RS, Brazil

^e Department of Biochemistry, Federal University of Technology, P. M. B. 704, Akure, Nigeria

^f Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil

* Corresponding author at: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/CCS/UFSM, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Prédio 26 – Sala 1357, Tel.: +55 55 32208940. E-mail address: jepazdasilva@gmail.com (J.E.P da Silva).

Highlights

Serum nucleotidases activities are reduced in multiple myeloma (MM) patients

Serum ADA activity is elevated in MM patients.

Treated and untreated MM patients present high levels of IL-6 and IL-10.

Caspases 1, 3 and 8 activities are decreased in untreated and treated MM patients.

Caspases activities are positively correlated with the nucleotidases activities.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a disorder characterized by the accumulation of clonal population of plasma cells in bone marrow. The nucleotidases NTPDase and 5'-nucleotidase (5'-NT), as well as adenosine deaminase (ADA) may exhibit possible influence on tumor growth via multiple purinergic mechanisms, caspase activation and cytokine secretion. Thus, this study investigated the serum NTPDase and ADA activities in untreated and treated MM patients, their relation with caspases as well as cytokine secretion. Our results showed a significant decrease in the activities of nucleotidases in both treated and untreated MM patients when compared to control individuals, and this reduction was higher in untreated patients. ADA activity was increased in both groups of MM patients. In addition, IL-6 and IL-10 levels were approximately 80% and 100% higher in untreated and treated MM patients, respectively. Furthermore, caspases 1, 3 and 8 activities were significantly reduced in both treated and untreated MM patients. The observed increase in anti-apoptotic effects as typified by reduced caspases activity was positively correlated with the nucleotidases activities in MM patients. These results may suggest impaired immune response, high susceptibility to infections and difficulty in controlling the disease progression in MM patients.

Keywords: Multiple myeloma; NTPDase; 5'-NT; ADA; Cytokines; Caspases.

1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a haemopoietic tumour characterized by the patchy accumulation of malignant plasma cells that secrete monoclonal antibodies within the bone marrow (BM) microenvironment [1]. It impedes the production of normal blood cells leading to variable anaemia, bone pain, renal impairment, hypercalcaemia and infections [2]. Infections remain a major cause of morbidity and mortality and are linked to multiple defects within the immune system [1,2].

The increased susceptibility of patients with myeloma to infection results from the interplay between antineoplastic therapies, age- and disease-related complications [3]. Myeloma-related innate immunodeficiency involves various arms of the immune system and includes B cell dysfunction (hypogammaglobulinemia), numerical and functional abnormalities of dendritic cells and T cells (inversion of CD4:CD8 ratio, abnormal Th1/Th2

CD4⁺ ratio, and severe disruption of global T cell diversity, and dysfunction of natural killer cells [3-5].

Increasing evidence suggests that interaction between tumor cells and their microenvironment through cytokine networks are essential for tumorigenesis [6]. Within the neoplastic milieu, cancer and immune cells closely interact to generate an immunosuppressive environment by releasing immunomodulatory factors, which supports neoplastic growth [7]. The naturally occurring nucleotide, adenosine 5'-triphosphate (ATP) and its metabolite adenosine (Ado) constitute an intrinsic part of this extensive immunological network through purinergic signaling by their cognate receptors [P2X receptors (mainly P2X7 for ATP) and P1 (particularly A2A for Ado)], which are widely expressed for different cell types such as platelets, lymphocytes, macrophages, endothelial cells and among others [8]. Concentrations of ATP and Ado in the extracellular compartment are controlled by enzymes catalyzing their conversion. They are located on cell surfaces of several tissues or may be found in soluble form in the interstitial medium in body fluids [8,9].

Purinergic mediators, such as ATP, ADP, AMP and Ado, are released into the extracellular space in response to metabolic disturbances or other types of insults [10], and operate both as sensory and efferent signals to shape immune responses. ATP is released either by non-lytic and cell lysis mechanisms [11], even during treatments that promote cell death.

The blood serum enzyme nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase; EC 3.6.1.5, CD39) catalyses the sequential hydrolysis of ATP nucleotides to ADP and AMP, 5'-nucleotidase (5'-NT; EC 3.1.3.5, CD73) catalyses the hydrolysis of AMP to Ado, and adenosine deaminase (ADA, EC 3.5.4.4) catalyses the irreversible deamination of Ado to inosine [9, 12]. Several studies have pointed to the critical task carried out by NTPDase, 5'-NT and ADA in generating this immunosuppressed environment, which promotes the development and progression of cancer [13], as well as susceptibility to infections.

Due to the numerous disorders in MM immune cells, it may contribute to expansion of myeloma clones by inhibiting apoptotic death, and this process also seems to be associated with certain cytokines secreted in the MM milieu [14]. Studies showed that high levels of exogenous purines, including ATP, ADP, and Ado, may effectively and dose-dependently inhibit cell proliferation and induce apoptotic/necrotic cell death [15]. Most pro-apoptotic stimuli induce the activation of a family of intracellular cysteine proteases called caspases [16]. These proteases are synthesized as inactive proenzymes, which, upon proteolytic cleavage at aspartate residues, form an active complex. Caspases lead to the proteolysis of a

number of cellular substrates, a process that finally results in the apoptotic collapse of the cell [17].

NTPDase, 5'-NT, and ADA activities may dynamically change the pathophysiology of several diseases and it is becoming increasingly appreciated that altering this catabolic machinery can change the course or dictate the outcome of several events. This suggests that these enzymes are novel therapeutic targets for managing a variety of disorders [18], including MM. Considering that MM is characterized by the prejudiced response of immune system, this study was convened to investigate the activity of NTPDase, 5'-NT and ADA, their correlation with caspases activities as well as the microenvironment influence through the concentration of cytokines, in a bit to achieve better comprehension of the immune status of untreated and treated MM patients.

2. Material and methods

2.1 Chemicals

The substrates ATP, ADP, AMP, adenosine, Ficoll histopaque, Coomassie brilliant blue G and bovine serum albumin were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). The RPMI 1640 medium culture and fetal calf serum were obtained from Gibco/Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). All the other chemicals used in this experiment were of the highest purity.

2.2 Patients

The sample consisted of 31 MM patients and 30 apparently healthy subjects as a control group, of both genders. The MM patients were divided into two; the treated group (n=22) that are currently receiving medications including bortezomib, thalidomide, cyclophosphamide, dexamethasone, pamidronate or zoledronic acid based on physician's prescription for the treatment of MM while the other group (untreated group, n=9) are patients that were not using any treatment in the last 90 days (in plateau phase). The subjects gave written informed consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the protocol under number 24833313.5.0000.5346.

2.3 Separation of blood serum

The 4mL blood samples were collected in tubes without anticoagulant and after the clot formation they were subsequently centrifuged at 1400 g for 15 min at room temperature. The resultant serum samples were placed in microtubes and stored at -20°C for NTPDase, 5'-NT and ADA assays, and cytokines mensuration.

2.4 Protein determination

Protein concentration of samples was determined by the Coomassie Brilliant Blue method according to Bradford (1976) [19], using bovine serum albumin as the standard.

2.5 Seric NTPDase and 5'-NT activities

NTPDase and 5'-NT activity in serum were determined as previously described by Oses et. al (2004) [20]. The reaction mixture for the NTPDase activity contained 3mM of ATP or ADP as substrate and 112.5 mM Tris-HCl (pH 8.0). The reaction mixture for the 5'-nucleotidase activity was composed of 3 mM of AMP as substrate and 100 mM Tris-HCl (pH 7.5). The reaction mixtures were incubated with approximately 1.0 mg of homogenized protein at 37°C for 40 minutes in a final volume of 0.2mL. The reaction was stopped by the addition of 0.2 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA). All samples were centrifuged at 5000 g for 5 minutes to eliminated precipitated protein and the supernatant was used for the colorimetric assay. The samples were chilled on ice and the amount of inorganic phosphate (Pi) liberated was measured by the method of Chan et al. (1986) [21]. In order to correct non-enzymatic hydrolysis, we performed controls by adding the serum after the reaction was stopped with TCA. Enzyme activities were expressed as nanomoles of Pi released per minute per milligram of protein (nmol of Pi/min/mg protein).

2.6 Seric ADA activity

ADA activity in serum was measured by spectrophotometric method of Giusti and Gakis (1971) [22]. Twenty-five microliters of serum were used. The reaction was started by addition of 475 μL of 21 mM adenosine as substrate and incubated for 1 h at 37°C . The reaction was stopped by adding 1.5 mL of 106/0.16 mM phenol–nitroprusside to the reaction mixture, which was immediately mixed with 1.5 mL of 125/11 mM alkaline hypochlorite (sodium hypochlorite). The ammonia released reacts with alkaline-hypochlorite and phenol in the presence of a catalyst – sodium nitroprusside – to produce indophenol (a blue color). The

concentration of ammonia is directly proportional to the indophenol and the absorbance was read at 650 nm. Seventy-five micromolar of ammonium sulfate was used as ammonium standard. The values of ADA activity in serum were expressed as U/L. The measurement was performed in duplicate and the mean was used for measurement.

2.7 Cytokines measurement

Serum cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN-gamma and TNF) were simultaneously measured by Cytometric Bead Array. The human Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was applied following the manufacturer instructions. Quantitative results were generated using BD Accuri™ C6 Flow Cytometer, FCAP Array software was used for the data analysis and the results were expressed in pg/mL.

2.8 Culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

The 4 mL blood samples were collected by venipuncture using tubes containing 7.2 mg dipotassium EDTA anticoagulant and then transferred to tubes with Ficoll histopaque (1:1). The tubes were centrifuged for 30 min at and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were positioned in the interphase, PBMCs were centrifuged again (10 minutes at 252 g) and transferred to culture medium containing 1 mL RPMI 1640 with 10% fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. Culture plates for each subject were prepared at a final concentration of 1×10^6 cells/mL. The PBMCs culture plates were incubated at 37°C and 5% CO₂ for 24 h before the determination of caspases.

2.9 Caspases 1, 3 and 8 activities

Caspases 1, 3 and 8 activities were determined by Fluorimetric Assay Kits (BioVision, Mountain View, CA) in the cell culture supernatants, according to the manufacturer's instructions. The Caspases fluorometric assay kit provides a means for assaying the activity of caspases that recognize the sequence YVAD. The assay is based on detection of cleavage of substrate YVAD-AFC (AFC: 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin). YVAD-AFC emits blue light ($\lambda_{max} = 400$ nm); upon cleavage of the substrate by caspases, free AFC emits a yellow green fluorescence ($\lambda_{max} = 505$ nm), which can be quantified using a fluorometer (Perkin-Elmer LS55, Boston, MA, USA). Comparison of the fluorescence of AFC from a treated sample with an untreated control allows determination of the fold increase in caspase activity. The activity of caspases were calculated as fluorescence intensity (FI)/min/mL = $\Delta FI / (t \times$

v), where ΔFIt = difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t = reaction time in min, and v = volume of sample in mL. Caspases activities were expressed as U/mg of protein.

2.10 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm Standard Error of Mean (SEM). For statistical analysis, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with the Tukey *post hoc* test. Correlations analyses were carried out using the Pearson's correlation coefficient. *P* values < 0.05 were considered statistically significant. The calculations and graphs were performed and generated using the program GraphPad Prism 6.

3. Results

3.1 General characteristics of the control group and MM patients

The characteristics of the MM patients and the control group were showed in Table 1. There was no significant difference in the ages of MM patients and control group.

3.2 NTPDase, 5'-NT and ADA activities in serum

The NTPDase and 5'-NT activities in serum were evaluated and the results obtained are shown in Figure 1. The ATP hydrolysis (NTPDase activity) was significantly lower in untreated MM patients (0.36 ± 0.05 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$) and MM treated patients (0.84 ± 0.08 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$) when compared to the control group (2.44 ± 0.06 nmol Pi/min/mg) (figure 1A). In a similar manner, significant reduction in NTPDase activity (ADP hydrolysis) was observed in untreated MM patients (0.99 ± 0.13 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$) and treated patients (1.45 ± 0.07 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$); compared to the control group (2.5 ± 0.10 nmol Pi/min/mg) (figure 1B). The serum activity of 5'-NT (AMP hydrolysis) was significantly decreased in untreated patients (0.52 ± 0.03 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$) and treated patients (0.68 ± 0.02 nmol Pi/min/mg, $P < 0.001$) in relation to the control group (0.87 ± 0.02 nmol Pi/min/mg) (figure 1C). Considering ATP, ADP and AMP hydrolysis, the MM group demonstrate difference between treated and untreated patients ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Furthermore, the activity of ADA (figure 1D) was significantly increased in untreated MM patients (56.1 ± 9.2 U/L; $P < 0.05$) and treated MM patients (48.5 ± 3.5 U/L; $P < 0.05$) when compared to control group (34.6 ± 1.8 U/L). However, there was no significant ($P > 0.05$) difference in ADA activity between treated and untreated MM patients.

3.3 Cytokines measurement

As shown in Figure 2, there was no significant ($P>0.05$) difference in the average serum levels of cytokines (IL-2, IL-4, TNF, INF-gamma and IL-17) between control group and untreated or treated MM patients. However, an increase of 82% and 81% in IL-6 levels was detected in the serum of untreated (4.86 ± 0.84 pg/mL; $P<0.05$) and treated MM patients (4.82 ± 0.54 pg/mL; $P<0.05$) respectively, when compared to the control group (2.66 ± 0.28 pg/mL). Furthermore, IL-10 was approximately 125% and 99% higher in MM untreated (2.1 ± 0.26 pg/mL; $P<0.05$) and treated patients (1.81 ± 0.24 pg/mL; $P<0.05$) in comparison to the control group (0.91 ± 0.13 pg/mL).

3.4 Caspases activities

The results of caspases activities are presented in Figure 3. The activity of caspase 1 was approximately 60% lower in untreated MM patients and 68% lower in treated MM patients when compared to control group (control: 37.8 ± 6.4 U/mg protein; untreated MM patients: 15.1 ± 4.0 U/mg protein and treated MM patients: 12.3 ± 1.1 U/mg protein, $P<0.001$). Similar trend was observed in the activity of other caspases. Caspase 3 activity was significantly reduced in untreated MM patients (16.8 ± 4.5 U/mg protein; $P<0.001$) and treated MM patients (14.4 ± 1.2 U/mg protein; $P<0.001$) by 60% and 70% respectively, when compared to the control (42.9 ± 6.5 U/mg protein). The reductions of 58% and 64% respectively in caspase 8 activity were observed in untreated MM patients (19.4 ± 5.4 U/mg protein; $P<0.001$) and treated MM patients (17.0 ± 1.4 U/mg protein; $P<0.001$) in comparison to the control group (46.8 ± 6.6 U/mg protein).

3.5 Correlation of caspases and nucleotidases activities

Statistical analyses revealed that all tested caspases (1, 3 and 8) were positively correlated with the enzymes that hydrolyze nucleotides (ATP, ADP and AMP) (Table 2). ADA activities showed no significance in correlation with activity of caspases ($P>0.05$, data no showed).

4. Discussion

Multiple myeloma (MM) is an incurable haematological disorder of B-cell malignancy, characterized by accumulation of clonal plasma cells in the BM, osteolytic bone lesions and immunodeficiency, with alterations in many cytokines involved in the growth and survival of these tumour cells [23,24].

The effectiveness and good tolerability of novel agents for MM (proteasome inhibitors – bortezomib and immunomodulatory agents - thalidomide) may allow their combinatorial usage with osteolysis inhibitors (pamidronate and zoledronic acid) as well as classical agents (cyclophosphamide and dexamethasone) in the management and treatment of MM [25]. For patients who have reached the plateau phase, depending on the patient's performance status and comorbidities, close medical follow-up with routine ambulatory visits and laboratory analysis are recommended without the use of drugs.

In response to tissue damage and cellular stress, apoptotic or inflammatory cells release ATP. Even small amounts released of ATP from the intracellular space elicit an elevation of extracellular ATP concentration and therefore activates the purinergic signaling [26]. Accumulated pericellular ATP levels within the tumor site functions to attract and recruit virtually all innate immune cells towards the tumor cells, and subsequently induce pro-inflammatory cytokine release. Furthermore, chemotherapy-induced ATP release by tumor cells is also able to trigger immunogenic cell death [27].

Sequel to this information, we investigated the activities of nucleotidases (NTPDase and 5'-NT) in serum of treated and untreated patients with MM in comparison with apparently healthy control individuals (control group). The results showed a lower activity in ATP, ADP and AMP hydrolysis in MM patients when compared to healthy individuals. The decreased serum nucleotidases activity may indicate a lower concentration of nucleotides present in the extracellular medium, which may negatively modulate these activities. ATP is required for the maintenance of immune response, cytotoxicity and production of major cytokines secreted by T CD4⁺ lymphocytes [28]. Thus, when at low concentrations, extracellular ATP may play an additional role as negative modulator of immunity [29]. This may however favor the triggering of recurrent infections and tumorigenic activity, as observed in MM patient. Furthermore, increased serum ADA activity observed may suggest elevated available adenosine level in MM patients, resulting in the deamination to inosine. It is known that adenosine accumulates in tumors at high concentrations, stimulates tumor growth and angiogenesis, inhibits cytokine synthesis, adhesion of immune cells to the endothelial wall,

and the function of T-cells, macrophages as well as natural killer cells [30]. Although, the adenosine was not quantified in the serum of these patients, we suggest that increased ADA activity observed in treated and untreated MM patients may be a response in an attempt to decrease the adenosine concentrations. The increase in adenosine may be responsible for suppression of the immune response found in MM patients.

Adenosine levels may be increased from routes other than NTPDase/5'-NT, since in the patients studied, the activity of enzymes were decreased. Alternatively, adenosine can be generated from NAD^+ through a coordinated action of CD38 (NAD glycohydrolase), which gives ADP ribose, and E-NPP1 (also known as PC-1 ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1), which produces AMP [31], that could justify their increase without specifically changing the NTPDase/5'-NT activities. This alternative model of adenosine generation was reported by Horenstein et al. (2015) [31] and Quarona et al. (2015) [32]. It was observed that the reduction in pH which may occur in tumor hypoxia conditions, could reduce ATP production and simultaneously increase the generation of NAD^+ via alternative route $\text{NAD}^+/\text{CD38}$, as well as partial inhibition of 5'-NT in certain cells [33]. The resultant effect is the reduction of adenosine production under such conditions. In such a situation, it may be reasonable to speculate that a tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) - nucleotidase on an active acid environment- can efficiently cooperate in adenosine production.

The evaluation of the action of each drug alone is not possible because most of them are associated. Although the two MM groups have nucleotidases (NTPDase and 5'-NT) activities much lower than control group, the activities were significantly decreased in the untreated group compared to the group treated. ATP and its metabolites exert a pro-inflammatory action, Th-cell differentiation and activation of the others cells involved, thus augmenting antitumoral properties. The treated group seems to have better antitumor immune response, represented by the highest nucleotidases activities, and possibly increased amount of extracellular ATP in relation to untreated patients, and this may be a positive consequence of treatment.

Almost all patients often relapse within months or years, presenting clinically active disease in patients who have received one or more prior therapies [34]. It is possible that untreated patients may be in stable phase, have lower proinflammatory action and reduced tumor control. This can be a sign of relapse, as observed by the decreased nucleotidases activities compared to patients under treatment. Assessing serum ADA activity, both treated and untreated MM patients possess similar activities, possibly with elevated adenosine.

Adenosine may promote an immunosuppression that may favor relapse in untreated patient and drug resistance in treated patients.

It is important to understand the quantitative changes in enzymes activity could be linked to the external regulation and amplified in the myeloma niche. Cytokines are the soluble factors that may directly (positively or negatively) influence the multiples responses in MM [32]. The adhesion of myeloma cells to hematopoietic and BM stromal cells induces the secretion of cytokines and growth factors by cells in the BM microenvironment, including myeloma cells [35]. We observed an increased release of IL-6 and IL-10, without significant changes in serum levels of other cytokines (IL-2, IL-4, TNF, INF-gamma and IL-17). Several cytokines have been implicated in growth, progression and dissemination of MM and the role of IL-6 and IL-10 has been well established as a contributory factor in myeloma cell survival and proliferation [36, 37]. IL-6 is produced by MM cells through an autocrine mechanism, whereas a paracrine mechanism is believed to be involved in the production of IL-6 by the tumour microenvironment in the BM [24, 36]. After binding to its receptors, IL-6 triggers the activation of various signaling pathways and induces proliferation of myeloma cells via activation of RAS/Raf/MEK-ERK signaling pathway [38]. IL-10 is a critical anti-inflammatory cytokine involved in the terminal differentiation of B cells into plasma cells. IL-10 affects myeloma cell growth and survival mediated by stimulating gp130 cytokine, oncostatin M (OSM) [39] that is frequently produced by myeloma cells.

Corroborating our results, Urbańska-Ryś al. (2000) [37] found high serum levels of IL-6 and IL-10 cytokines in MM patients and Kovacs (2010) [40] reported that IL-6 may lead to a marked production of IL-10; this cytokine may be an IL-6 related growth factor for MM cells and could be associated with high rate of infections. Regulatory T cells may also be related to the development of MM and regulation of immune response through the release of cytokines, particularly IL-10 [41].

Since the homeostasis of systemic cytokines is disrupted in MM, Zheng et al. (2013) [42] showed that cytokine profiles did not significantly change during the course of MM remained steady at the active disease levels throughout treatment into remission phases and contributed to the frequent relapse of MM. Furthermore, the study did not detect any differences in the cytokine expression as a function of the treatment regimen. These results are in agreement with our results, in that increased IL-6 and IL-10 levels in both treated and untreated patients, possibly favoring the survival and decrease of apoptosis in myeloma cells, besides relapse and drug resistance.

As demonstrated by other results, purinergic signaling and cytokine production may influence the reactions that favor cell proliferation, differentiation, and apoptosis. Ferrari et al. (1998) [17] showed that inhibition of ATP production may completely retard caspase activation after treatment of cells with anticancer drugs, thus indicating the important relationship of ATP with caspases activity in apoptosis. Apoptosis is a fundamental biological process that enables an organism to maintain normal homeostasis and manage diseased conditions such as cancer [43]. Apoptosis is dependent on tightly regulated cell death signaling pathways and caspases seem to play a key role in the activation of apoptosis [44].

Therefore, we evaluated the activity of caspases 1, 3 and 8 in the cultured PBMCs of MM patients and correlated with the activities of the caspases with that of nucleotidases (NTPDase/5'-NT) and ADA. The observed results revealed that the activities of the caspases (1, 3 and 8) were significantly lower in MM patients in comparison with healthy patients. Furthermore, the tested caspases were positively correlated with the nucleotidases activities, but not with ADA activity. Previous studies have also indicated that the apoptotic nuclear changes induced by various treatments that can cause death, are completely blocked by depletion of intracellular ATP [45]. Thus, there is a strong correlation between the decrease of ATP (marked by the large reduction in NTPDase activity) and lower activity of caspases, as seen in our patients. Data presented by Kong et al. (2005) [46] revealed that ATP and other agonists can stimulate P2X7 receptors leading to the activation of the caspases 8, 9 and 3 as well as apoptotic responses, and the decrease in ATP production can prevent this activation. Regulation of apoptosis has been reported to be involved in the proteasome pathway. Ferrari et al. (1999) [47] demonstrated that inhibitors of the proteasome (as bortezomib) decreased cell death by completely preventing ATP-induced caspase-1 activation.

The emergence of new drugs has revolutionized MM therapy. However, the biology of plateau and the escape (relapse) phases are still poorly understood. It has been shown that while chemotherapeutic agents kill cancer cells, they also trigger parallel microenvironment reaction leading to the production of cytokines, chemokines and growth factors that may provide proliferative and anti-apoptotic signals to tumor cells [48]. Impaired apoptosis may therefore account for the accumulation of myeloma cells in the BM during the stable stage of the disease and contribute to drug resistance observed in MM [49]. This could be one of the reasons why there was significant reduction in the activity of caspases in treated MM patients.

The results from this study suggest that the observed increase in anti-apoptotic effects as typified by reduced caspases activities was positively correlated with the nucleotidases activity in MM patients. Myeloma cells and microenvironment may be instrumental to tumor

immunoescape by induction of active immune tolerance mechanisms, which may predispose the MM patients to infections.

Funding

This study was supported by the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Hospital Universitário de Santa Maria – PROIC HUSM, Programa de Bolsas de Iniciação Científica ou Auxílio à Pesquisa - FIPE Sênior PRPGP/UFSM and Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) - Centro de Apoio Profissionalizante, Educacional e Social (CAPES).

Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

Table 1. General characteristics of the control group and multiple myeloma (MM) patients

| | Control Group (n=30) | Untreated MM (n=9) | Treated MM (n=22) |
|-------------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|
| Age* (years old) | 61.5±1.9 | 62.1±3.9 | 63.5±1.9 |
| Gender | 15F/15M | 5F/4M | 11F/11M |
| Treatment** | --- | --- | Z (7) [Z or P]+T (3) T (3) B (3) B+Z (3) B+C (3) |

*Age was presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

** Some treatments were associated with dexamethasone.

F – female, M- male

Z - zoledronic acid, P – pamidronate, T – thalidomide, B - bortezomib, C - cyclophosphamide

Table 2. Correlation among caspases and nucleotidases activities of untreated and treated MM patients.

| Parameters | Pearson's correlation coefficient | P |
|---------------------|--|----------|
| CASP 1 x ATP | 0.7814 | <0.001* |
| CASP 1 x ADP | 0.6753 | <0.001* |
| CASP 1 x AMP | 0.6802 | <0.001* |
| CASP 3 x ATP | 0.8294 | <0.001* |
| CASP 3 x ADP | 0.7343 | <0.001* |
| CASP 3 x AMP | 0.6651 | <0.001* |
| CASP 8 x ATP | 0.8240 | <0.001* |
| CASP 8 x ADP | 0.7474 | <0.001* |
| CASP 8 x AMP | 0.6779 | <0.001* |

CASP – caspase activity

ATP – NTPDase action in the hydrolysis of ATP nucleotide

ADP - NTPDase action in the hydrolysis of ADP nucleotide

AMP – 5'- nucleotidase action in the hydrolysis of AMP nucleotide

* P values < 0.05 were considered statistically significant

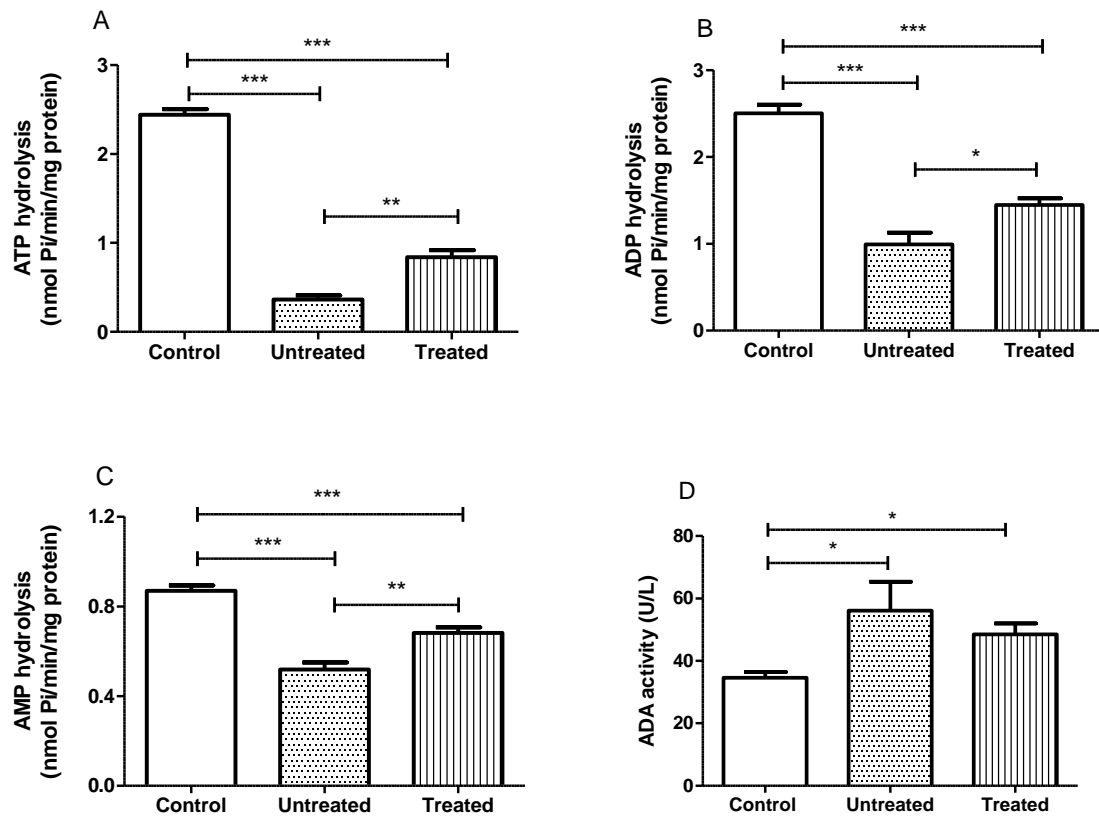


Figure 1. NTPDase activity in ATP (A) and ADP (B) hydrolysis, 5'-NT activity (C) and ADA activity (D) in serum of multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30). Bars represent mean \pm SEM. (*), (**) and (***) indicates a significant statistical difference among the groups ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) and ($P < 0.001$), respectively in ANOVA with the Tukey *post hoc* test.

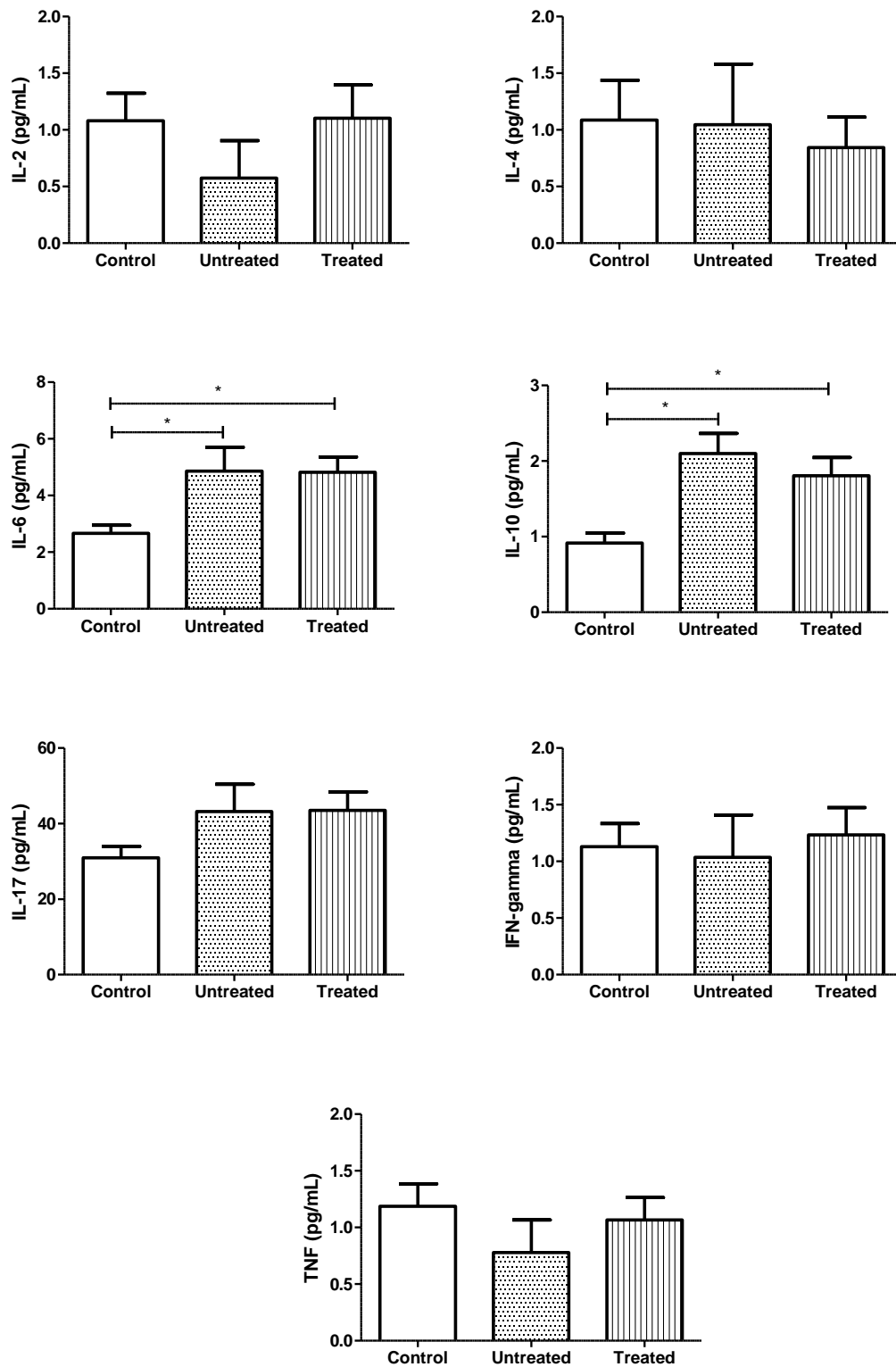


Figure 2. Serum levels of cytokines of patients with multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30). Bars represent mean \pm SEM. (*) indicates a significant statistical difference among the groups ($P < 0.05$) in ANOVA with the Tukey *post hoc* test.

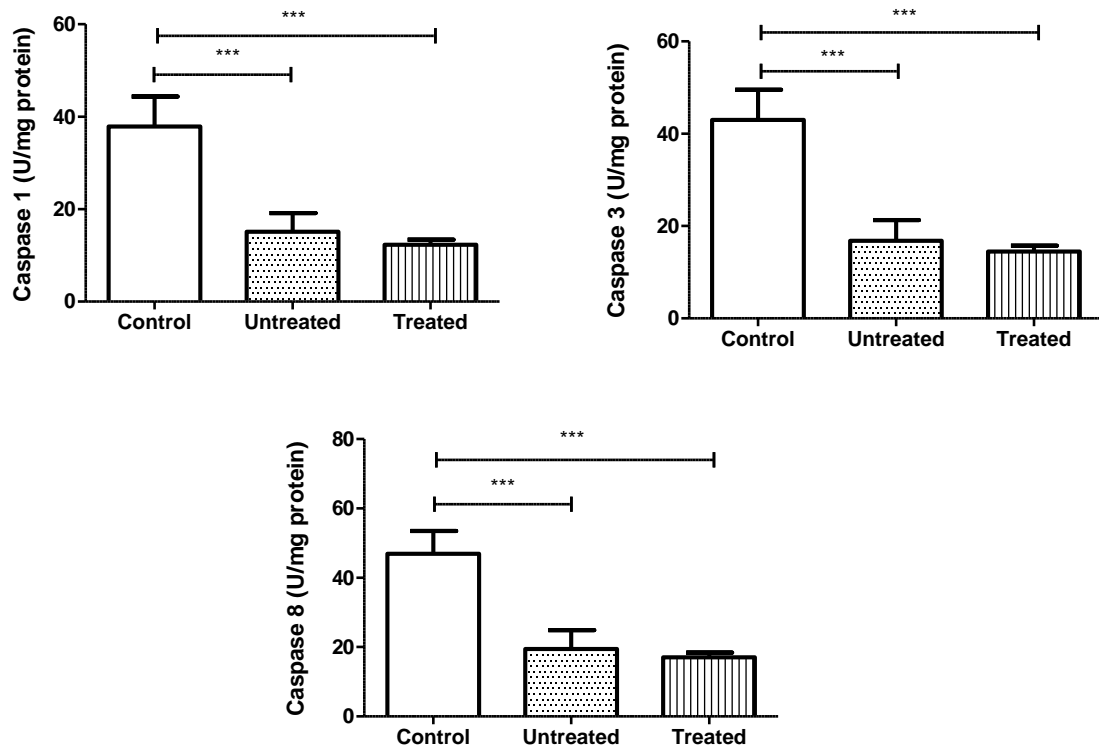


Figure 3. Caspases activities of patients with multiple myeloma (MM) untreated (n=9) and treated (n=22) and control group (n=30). Bars represent mean \pm SEM. (***) indicates a significant statistical difference among the groups ($P < 0.001$) in ANOVA with the Tukey *post hoc* test.

References

- [1] G. Pratt, O. Goodyear, P. Moss, Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma, *Br. J. Haematol.* 138 (2007) 563–579. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06705.x.
- [2] R.A. Kyle, V. Rajkumar, Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma, *Leukemia* 23 (2009) 3–9. doi:10.1038/leu.2008.291.Criteria.
- [3] M. Nucci, E. Anaissie, Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 1211–1225. doi:10.1086/605664.
- [4] K.H. Mills, J.C. Cawley, Abnormal monoclonal antibody-defined helper/suppressor T-cell subpopulations in multiple myeloma: relationship to treatment and clinical stage, *Br. J. Haematol.* 53 (1983) 271–275.
- [5] H. Ogawara, H. Handa, T. Yamazaki, T. Toda, K. Yoshida, N. Nishimoto, et al., High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma, *Leuk Res.* 29 (2005) 135–140. doi:10.1016/j.leukres.2004.06.003
- [6] V. Chew, H.C. Toh, J.P. Abastado, Immune microenvironment in tumor progression: characteristics and challenges for therapy, *J. Oncol.* 2012 (2012) ID 608406 10pg. doi:10.1155/2012/608406
- [7] S. Yaqub, E.M. Aandahl, Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis, *Crit. Rev. Oncog.* 15 (2009) 43–63.
- [8] M.J. Bours, E.L. Swennen, V.F. Di, B.N. Cronstein, P.C. Dagnelie, Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation, *Pharmacol Ther.* 112 (2006) 358–404.
- [9] R. Franco, V. Casadó, F. Ciruela, C. Saura, E.I. Canela, C. Lluís, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme, *Prog. Neurobiol.* 52 (1997) 283–294.
- [10] B. Sperlágh, P. Pacher, E.S. Vizi, P. Illes, Potent effect of interleukin-1 beta to evoke ATP and adenosine release from rat hippocampal slices. *J. Neuroimmunol.* 151 (2004) 33–39.
- [11] B.B. Fredholm, A.P. IJzerman, K.A. Jacobson, J. Linden, C.E. Müller, International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors-an update, *Pharmacol. Rev.* 63 (2011) 1–34.
- [12] H. Zimmermann, Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature, *Drug Dev Res.* 52 (2001) 44–56.
- [13] J. Bastid, A. Cottalorda-Regairaz, G. Alberici, N. Bonnefoy, J-F. Eliaou, A. Bensussan, ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology, *Oncogene* 32 (2013) 1743–1751. doi:10.1038/onc.2012.269
- [14] A. Lichtenstein, Y. Tu, C. Fady, R. Vescio, J. Berenson, Interleukin-6 inhibits apoptosis

of malignant plasma cells, *Cell Immunol.* 162 (1995) 248-255.

[15] L. Feng, X. Sun, E. Csizmadia, L. Han, S. Bian, T. Murakami, X. Wang, S.C. Robson, Y. Wu, Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia* 13 (2011) 206-216.

[16] D.N. Nicholson, N.A. Thornberry.. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) 299–306.

[17] D. Ferrari, A. Stepczynska, M. Los, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff, Differential Regulation and ATP Requirement for Caspase-8 and Caspase-3 Activation during CD95- and Anticancer Drug–induced Apoptosis, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 979-984.

[18] L. Antonioli, P. Pacher, E.S. Vizi, G. Haskó, CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol Med* 19 (2013) 355-367. doi:10.1016/j.molmed.2013.03.005.

[19] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.

[20] J.P. Oses, C.M. Cardoso, R.A. Germano, I.B. Kirst, B. Rucker, C.R. Furstenuau, M.R. Wink, C.D. Bonan, A.M Battastini, J.J. Sarkis, Soluble NTPDase: an additional system of nucleotide hydrolysis in rat blood serum, *Life Sciences* 74 (2004) 3275–3284.

[21] K.M. Chan, D. Delfert, K.D. Junger, A direct colorimetric assay for Ca²⁺ stimulated ATPase activity, *Anal. Biochem.* 157 (1986) 375–380.

[22] G. Giusti, C. Gakis, Temperature conversion factors, activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of adenosine deaminase from human serum and tissues, *Enzyme* 12 (1971) 417–425.

[23] R.A. Kyle, S.V. Rajkumar, Multiple myeloma, *Blood* 111 (2008) 2962-2972.

[24] V.M. Lauta, A review of the cytokine network in multiple myeloma diagnostic, prognostic, and therapeutic implications, *Cancer* 97 (2003) 2440–2452.

[25] G. Bianchi, K.C. Anderson, Understanding biology to tackle the disease: Multiple myeloma from bench to bedside, and back, *CA: Cancer J Clin* 64 (2014) 422–444. doi: 10.3322/caac.21252

[26] A. Trautmann, Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal", *Sci Signal* 2 (2009) pe6. doi: 10.1126/scisignal.256pe6

[27] I. Martins, A. Tesniere, O. Kepp, M. Michaud, F. Schlemmer, L. Senovilla, C.Seror, D. Metivier, J.L. Perfettini, L. Zitvogel, G. Kroemer, Chemotherapy induces ATP release from tumor cells, *Cell Cycle* 8 (2009) 3723-3728.

[28] H.P. Langston, Y. Ke, A.T. Gewirtz, K.E. Dombrowski, J.A. Kapp, Secretion of IL-2 and

- IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP, *J. Immunol.* 170 (2003) 2962–2970.
- [29] F. Di Virgilio, J.-M. Boeynaems, S.C. Robson, Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity, *Curr Opin Pharmacol.* 9 (2009) 507–513. doi:10.1016/j.coph.2009.06.021.
- [30] J. Spychala, Tumor-promoting functions of adenosine, *Pharmacol Therap* 87 (2000), 161–173.
- [31] A.L. Horenstein, A. Chillemi, V. Quarona, A. Zito, I. Roato, F. Morandi, et al., NAD⁺-Metabolizing Ectoenzymes in Remodeling Tumor–Host Interactions: The Human Myeloma Model, *Cells* 4 (2015) 520–537.
- [32] V. Quarona, V. Ferri, A. Chillemi, M. Bolzoni, C. Mancini, G. Zaccarello, et al., Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1335 (2015) 10–22. doi:10.1111/nyas.12485.
- [33] G.G. Yegutkin, Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49 (2014) 473–497.
- [34] K.C. Anderson, R.A. Kyle, S.V. Rajkumar, A.K. Stewart, D. Weber, P. Richardson, Clinically relevant end points and new drug approvals for myeloma, *Leukemia* 22 (2008) 231–239.
- [35] K. Podar, Y.T. Tai, B.K. Lin, R.P. Narsimhan, M. Sattler, T. Kijima, et al., Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation, *J Biol Chem.* 277 (2002) 7875–7881.
- [36] B. Klein, X.G. Zhang, M. Jourdan, J. Content, F. Houssiau, L. Aarden, M. Piechaczyk, R. Bataille, Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6, *Blood* 73 (1989) 517–526.
- [37] H. Urbańska-Ryś, A. Wierzbowska A, Stepień H, Robak T, Relationship between circulating interleukin-10 (IL-10) with interleukin-6 (IL-6) type cytokines (IL-6), interleukin-11 (IL-11), oncostatin M (OSM) and soluble interleukin-6 (IL-6) receptor (sIL-6R) in patients with multiple myeloma, *Eur Cytokine Netw* 11 (2000) 443–451.
- [38] T. Hideshima, C. Mitsiades, G. Tonon, P.G. Richardson, K.C. Anderson, Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets, *Nat Rev Cancer* 7 (2007) 585–598.
- [39] B. Klein, Z.Y. Lu, Z.J. Gu, V. Costes, M. Jourdan, J.F. Rossi, Interleukin-10 and Gp130 cytokines in human multiple myeloma, *Leuk Lymphoma.* 34 (1999) 63–70.
- [40] E. Kovacs, Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?, *Leuk. Res* 34 (2010) 912–916.

- [41] J.A. Bluestone, A.K. Abbas, Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3 (2003) 253-257.
- [42] M.M. Zheng, Z. Zhang, K. Bemis, A.R. Belch, L.M. Pilarski, J.E. Shively, et al., The systemic cytokine environment is permanently altered in multiple myeloma., *PLoS One*. 8 (2013) e58504. doi:10.1371/journal.pone.0058504.
- [43] C.B. Thompson, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease, *Science* 267 (1995) 1456-1462.
- [44] G. S. Salvesen, V. M Dixit, Caspases: intracellular signaling by proteolysis, *Cell* 91 (1997) 443-446.
- [45] Y. Eguchi, S. Shimizu, T. Tsujimoto, Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis, *Cancer Res*. 57 (1997) 1835-1840.
- [46] Q. Kong, M. Wang, Z. Liao, J.M. Camden, S. Yu, A.Simonyi, et al., P2X₇ nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons, *Purinergic Signal*. 1 (2005) 337–347.
- [47] D. Ferrari, M. Los, K.A.B. Manuel, P. Vandenabeele, S. Wesselborg, K. Schulze-Osthoff, P2Z purinoreceptor ligation induces activation of caspases with distinct roles in apoptotic and necrotic alterations of cell death, *FEBS Letters* 447 (1999) 71-75. doi: 10.1016/S0014-5793(99)00270-7
- [48] V. Levina, A.M. Marrangoni, R. DeMarco, E. Gorelik, A.E. Lokshin, Drug-selected human lung cancer stem cells: Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties, *PLoS One*. 3 (2008) e3077. doi:10.1371/journal.pone.0003077.
- [49] M. Romagnoli, V. Trichet, C. David, M. Clément, P. Moreau, R. Bataille, S. Barillé-Nion, Significant impact of survivin on myeloma cell growth, *Leukemia* 21 (2007) 1070–1078.

3 MANUSCRITO 2

**Avaliação das atividades de E-NTPDase e E-ADA e da expressão de CD39-CD73 em
linfócitos periféricos de pacientes com mieloma múltiplo**

**Evaluation of E-NTPDase and E-ADA activities and CD39-CD73 expressions in
peripheral lymphocytes of patients with multiple myeloma**

Pâmela de Brum Soares, Pedro Henrique Doleski, Stephen Adeniyi Adefegha, Claudia de Mello Bertoncheli, Livia Gelain Castilhos, Liliane Zimmermann de Oliveira, Daniela Bitencourt Rosa Leal, José Edson Paz da Silva

**Submetido na revista “Clinical Chemistry and Laboratory Medicine” – Letter to the
Editor**

Evaluation of E-ADA and E-NTPDase activities and CD39-CD73 expressions in peripheral lymphocytes of patients with multiple myeloma

Pâmela de Brum Soares^{a,b}, Pedro Henrique Doleski^a, Stephen Adeniyi Adefegha^{a,c}, Claudia de Mello Bertoncheli^a, Livia Gelain Castilhos^a, Liliane Zimmermann de Oliveira^a, Daniela Bitencourt Rosa Leal^a, José Edson Paz da Silva^{b*}

^aCenter of Health Sciences, Department of Microbiology and Parasitology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

^bCenter of Health Sciences, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil

^cDepartment of Biochemistry, Federal University of Technology, Akure, Nigeria

*** Corresponding author: José Edson Paz da Silva**, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1357, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil, Phone: +55 55 32208940, E-mail: jepazdasilva@gmail.com

Key words: E-NTPDase; E-ADA; CD39; CD73; multiple myeloma.

Running head: E-ADA and E-NTPDase activities and CD39-CD73 expressions in multiple myeloma

To the Editor,

Multiple myeloma (MM) is an immunoproliferative disease that is characterized by uncontrolled proliferation of plasma cells and accompanied by defects in the immune system. It has been identified to be responsible for frequent and recurrent complications associated with infections [1-2]. The multiple alterations of microenvironment within the bone marrow of MM patients lead to the suppression of the adaptive immunity; thus, bacterial infections remain the leading cause of death from MM [2], besides to favor relapse and drug resistance in these patients.

Ectoenzymes in peripheral lymphocytes may promote the production of substrates; adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) and adenosine (Ado) involved in signaling, synthesis of growth factors and modulation of immune response. The ectoenzyme; ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPDase; CD39) catalyzes the sequential hydrolysis of ATP to ADP and AMP, ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; CD73) catalyzes the hydrolysis of AMP to adenosine, and ecto-adenosine deaminase (E- ADA) catalyzes the irreversible deamination of adenosine to inosine [3,4]. Due to great relevance, studies have reported the role of purinergic signaling in the pathophysiology of several diseases [5].

Purinergic signaling enzymes and their expression may play significant role in the modulation/maintenance of homeostasis in lymphocytes of MM patients. However, there is limited information on the effects of these enzymes and expression in MM patients. This study seeks to provide novel information on the ectonucleotidase activity such as E-NTPDase, and E-ADA, as well as percentage of expression of CD39⁺ and CD73⁺ in lymphocytes of MM patients.

This study included 85 healthy subjects as control groups and 42 MM patients of both sexes. Out of the 42 MM patients, 32 of them are currently receiving medications including

bortezomib, thalidomide, cyclophosphamide, pamidronate and/or zoledronic acid based on physician's protocols for the treatment of MM (treated MM) while the untreated MM group (n=10) are patients that were not using any treatment (in plateau phase) in the last 90 days. All the subjects gave written consent to participate in this study and the Human Ethics Committee of the Health Science Center from the Federal University of Santa Maria approved the project (protocol number: 24833313.5.0000.5346).

Lymphocytes-rich mononuclear cells were isolated from peripheral human blood collected tubes containing EDTA as anticoagulant and separated on Ficoll-Histopaque density gradients. Protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) [6]. The E-NTPDase activity in lymphocytes was determined in our laboratory as previously described by Leal et al. (2005) [7]. The released inorganic phosphate (Pi) was assayed by a method previously described by Chan et al. (1986) [8] using malachite green as colorimetric reagent. E-ADA activity in lymphocytes was measured by the method of Giusti and Galanti (1984) [9]. The percentage of lymphocytes expressing E-NTPDase (CD39) and E-5'-nucleotidase (CD73) were assessed by flow cytometry using EDTA whole blood and was incubated with anti-CD39 (PE; BD Pharmingen), anti-CD73 (APC; BD Pharmingen) and anti-CD45 (FITC; Beckman Coulter) and analyzed with the aid of BD AccuriTM C6 flow cytometer. Results were expressed as mean \pm Standard Error of Mean (SEM). For statistical analysis, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed with the Tukey *post hoc* test. The calculations were performed and the graphs drawn generated using the program GraphPad Prism 6. *P* values <0.05 were considered statistically significant.

The age and gender of patients and control group did not statistically influence the results (data not shown). The hematological parameters showed that there were no significant ($P>0.05$) differences in the total leukocyte and lymphocytes count number between the MM patients and the control groups (data not shown).

Results demonstrated that the hydrolysis of ATP (figure 1A) did not show significant difference ($P>0.05$) between untreated MM patients (44.8 ± 3.9 nmol Pi/min/mg of protein), treated MM patients (48.5 ± 2.2 nmol Pi/min/mg of protein) and control group (45.0 ± 1.6 nmol Pi/min/mg of protein). Also, no significant ($P>0.05$) difference was observed in the ADP hydrolysis (figure 1B) among three groups; control group (50.3 ± 2.0 nmol Pi/min/mg of protein), untreated MM patients group (45.7 ± 3.8 nmol Pi/min/mg of protein) and treated MM patient group (50.4 ± 2.9 nmol Pi/min/mg of protein). The activity of E-ADA was significantly increased in untreated MM patients (39.3 ± 3.8 U/L; $P<0.01$) and treated MM patients (36.6 ± 2.4 U/L; $P<0.01$) when compared to the control group (27.9 ± 1.2 U/L). However, there was no significant ($P>0.05$) difference in the E-ADA activity between the treated and untreated MM patients (figure 1C).

The percentage of CD39⁺ lymphocytes (figure 2A) did not differ among three groups (control = $37.9 \pm 3.8\%$; untreated MM = $39.6 \pm 4.6\%$; treated MM = $37.8 \pm 2.5\%$; $P>0.05$). However, the percentage of CD73⁺ lymphocytes was reduced in treated MM group (7.60 ± 1.0 %) and this reduction was by almost half (figure 2B) when compared to control group ($15.1 \pm 1.91\%$; $P<0.01$) and untreated MM patients ($14.7 \pm 3.3\%$; $P<0.05$).

The enzymatic cascade of the purinergic system begins with the hydrolysis of nucleotide ATP by E-NTPDase (CD39). This enzyme controls the immune system by regulating the concentration of ATP in lymphocyte membrane [3]. In this study, we evaluated the possible change in ATP signaling in MM patients by assessing the percentage of expression and activity of CD39 in peripheral lymphocytes of MM patients. The observed non-significant difference in CD39⁺ expression and E-NTPDase activity between the MM patients and control group may indicate that the ATP binding to its purinergic receptor (P2) is not affected in MM. Additionally, the drugs used by treated MM patients did not alter the

CD39 profile, as revealed by the non-significant difference between the control group and MM patients.

Furthermore, adenosine is a nucleoside which possesses immunosuppressive and anti-inflammatory effects [4] contributing to the pathogenesis of disease. The deamination of adenosine by E-ADA is an important step in immunological response. Although, the adenosine was not quantified in the serum of these patients; previous report has shown that adenosine is elevated in MM [10]. In this study, the observed increase in E-ADA activity in treated and untreated MM patients in comparison to the control subject may suggest the response of lymphocytes in an attempt to decrease the adenosine concentrations, and this change is independent of treatment. Therefore, the increase in adenosine may be responsible for the suppression of the immune response found in MM patients. However, the increased E-ADA activity observed in MM patients in this study could prevent the possible elevated adenosine levels in the extracellular medium. Adenosine may be increased from alternative pathways related to NAD^+ and CD38/CD203a(PC-1)/CD73 [10]. These may justify the increase in adenosine, without changing the E-NTPDase activity/ percentage of CD39⁺ expression.

Interestingly, treated MM patients showed reduction in percentage of CD73⁺ expression in lymphocytes, but E-ADA activity was increased compared with control patients. The pharmacological control of the disease and microenvironment effects may be responsible for the change in the percentage of expression of CD73⁺ lymphocytes in treated patients. This decrease in CD73 expression could represent a dynamic feedback mechanism on the immune system in order to reduce the conversion of AMP (and destined for other routes) to adenosine and consequently reduce the levels of adenosine available.

The major findings of the present study suggest that E-NTPDase and E-ADA activities and percentage of CD39-CD73 expressions in lymphocytes may represent important targets for novel therapeutic for inflammation and tumor control in MM patients.

Acknowledgments: This study was supported by the Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Hospital Universitário de Santa Maria (PROIC HUSM, Brazil, 10-2014) and Programa de Bolsas de Iniciação Científica ou Auxílio à Pesquisa PRPGP/UFSM (FIPE Sênior, Brazil, 06-2014).

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Financial support: Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica do Hospital Universitário de Santa Maria (PROIC HUSM, Brazil) and Programa de Bolsas de Iniciação Científica ou Auxílio à Pesquisa PRPGP/UFSM (FIPE Sênior, Brazil).

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

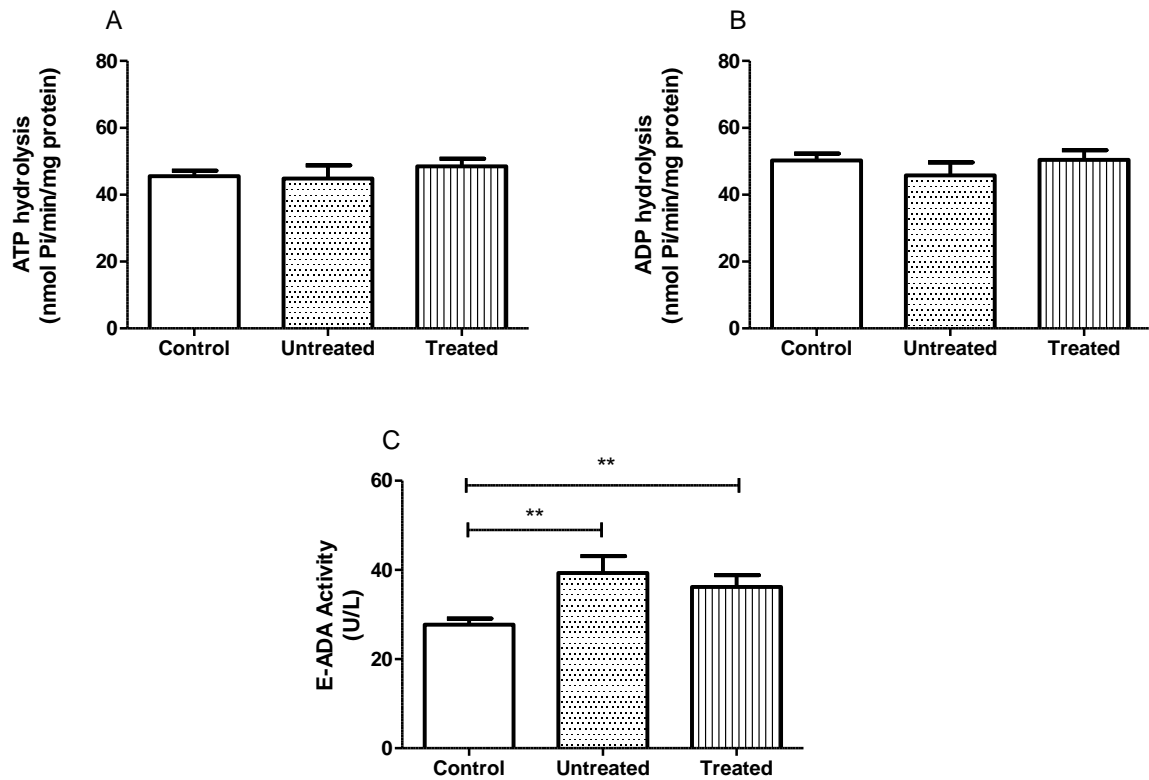


Figure 1. E-NTPDase activity in ATP (A) and ADP (B) hydrolysis, and E-ADA activity (C) in peripheral lymphocytes of untreated and treated multiple myeloma (MM) patients and control group. Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM). (**) indicates a significant statistical difference among the groups ($P < 0.01$) in ANOVA with the Tukey *post hoc* test.

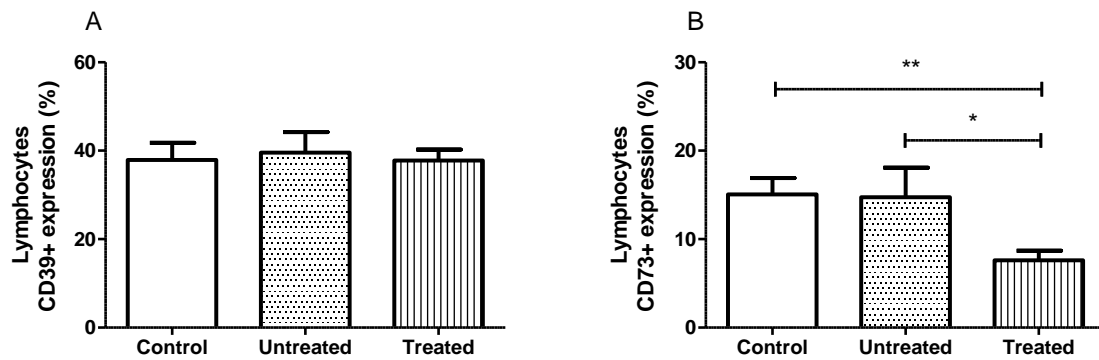


Figure 2. Percentage of CD39⁺ (A) and CD73⁺ (B) peripheral lymphocytes of untreated and treated multiple myeloma (MM) patients and control group. Bars represent mean \pm standard error of the mean (SEM). (*) and (**) indicates a significant statistical difference among the groups ($P < 0.05$) and ($P < 0.01$), respectively in ANOVA with the Tukey *post hoc* test.

References

- [1] Pratt G, Goodyear O, Moss P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2007; 138:563–79.
- [2] Nucci M, Anaissie E. Infections in patients with multiple myeloma. *Semin Hematol* 2009; 46:277-88.
- [3] Zimmermann H. Ectonucleotidases: some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Dev Res* 2001; 52:44–56.

- [4] Longhi MS, Robson SC, Bernstein SH, Serra S, Deaglio S. Biological functions of ectoenzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J Mol Med* 2013; 91:165–72.
- [5] Burnstock G, Di Virgilio F. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signal* 2013; 9:491–540.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;
- [7] Leal DBR, Streher CA, Neu TN, Bittencourt FP, Leal CAM, Silva JEP, et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; ectoapyrase; ecto-diphosphohydrolase; CD39; E.C. 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1721:9–15.
- [8] Chan KM, Delfert D, Junger KD. A direct colorimetric assay for Ca^{2+} stimulated ATPase activity. *Anal Biochem* 1986; 157:375–80.
- [9] Giusti G, Galanti B. Colorimetric Method. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie: Weinheim, 1984:315–323.
- [10] Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Zito A, Roato I, Morandi F, et al. NAD^{+} -Metabolizing Ectoenzymes in Remodeling Tumor–Host Interactions: The Human Myeloma Model. *Cells* 2015; 4:520-37.

4 DISCUSSÃO

O MM é um tumor hematopoiético caracterizado pela proliferação descontrolada de plasmócitos, acompanhado por comprometimento no sistema imune com recorrentes complicações infecciosas. As infecções permanecem como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com MM (PRATT et al., 2007). O aumento da suscetibilidade a infecções resulta da interação entre terapias antineoplásicas, complicações relacionadas com a idade e da cumulativa imunossupressão resultante da própria doença, expandindo o espectro de potenciais patógenos nesta população (NUCCI & ANAISSIE, 2009). O presente estudo avaliou o papel das ectoenzimas do sistema purinérgico na regulação do sistema imune em pacientes com MM.

A interação entre os vários componentes do sistema imunológico durante a ativação é realizada por várias moléculas de sinalização. Os nucleotídeos extracelulares, tais como ATP, que podem ser liberados em resposta a danos celulares e em sinal de perigo para o hospedeiro, são necessários para iniciar respostas imunes primárias, bem como para controlar o curso e resolução dos processos inflamatórios e respostas imunes (DI VIRGILIO et al., 2003). Está bem definido que o sistema de sinalização purinérgica, composto por enzimas e receptores purinérgicos que atuam em função da concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos, é um componente fundamental do ambiente imunorregulatório (DI VIRGILIO, 2005). Assim, foi investigada a atividade das enzimas solúveis NTPDase e 5'-NT envolvidas na hidrólise de ATP, ADP e AMP, e atividade de ADA no soro; atividade da E-NTPDase e E-ADA na superfície da membrana plasmática de linfócitos, bem como o percentual de expressão de CD39⁺ e CD73⁺ em linfócitos de pacientes com MM.

A atividade de NTPDase na hidrólise de ATP e ADP, bem como a atividade de 5'-NT na hidrólise de AMP no soro apresentaram uma redução em ambos os pacientes com MM, tratados e não tratados, quando comparados ao grupo controle. Ainda, a atividade de ambas NTPDase e 5'-NT foi significativamente menor no grupo sem tratamento em relação ao grupo tratado. Sugere-se que a redução da atividade destas enzimas seja uma consequência da modulação enzimática frente à liberação de baixas quantidades de ATP das células. Quando em baixas concentrações, o ATP desempenha um papel adicional como um modulador negativo da imunidade, com atividade anti-inflamatória ao estimular a produção de IL-10 por células dendríticas (AYMERIC et al., 2010; DI VIRGILIO et al., 2009). Assim, os pacientes com MM apresentam maior suscetibilidade para doenças infecciosas e um menor controle da atividade tumoral, e essa atividade imunossupressora parece ser superior nos pacientes não

tratados. Os pacientes não tratados do nosso estudo são pacientes que atingiram a fase de platô da doença, que fizeram uso prévio de medicamentos e atingiram uma resposta completa, que pode ser monitorada periodicamente somente com exames. Sabe-se que a recidiva é um evento comum em pacientes que receberam uma ou mais terapias anteriores e o escape da fase de platô é um evento ainda bastante incompreendido (ANDERSON et al., 2008). Desta forma, acredita-se que a menor atividade das enzimas NTPDase e 5'-NT nos pacientes não tratados possa estar relacionada à uma recidiva futura.

A maior atividade de ADA encontrada nos pacientes com MM pode ser um mecanismo de regulação frente ao aumento de adenosina disponível, ainda que as atividades de NTPDase e 5'-NT estejam reduzidas. A adenosina pode atingir altas concentrações em ambientes tumorais, estimulando o crescimento das células tumorais e angiogênese e inibindo a função e adesão das células imunes à parede do endotélio, bem como a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (SPYCHALA, 2000). Além disso, a ativação dos receptores A2A pela adenosina aumenta a liberação de citocinas anti-inflamatórias, principalmente a IL-10 (RUIZ et al., 2014), favorecendo um estado imunossuprimido. Uma vez que há reduzida atividade de NTPDase e 5'-NT, sugerimos que a adenosina pode estar sendo formada por outras vias.

O aumento de adenosina sérica em pacientes com MM foi demonstrado por Horenstein et al. (2014) e este efeito pode ser explicado pela formação de adenosina através de rotas alternativas, como $\text{NAD}^+/\text{CD38}^+/\text{CD203a}^+$. Nesta rota, o AMP é gerado utilizando NAD^+ como substrato e então 5'-NT pode atuar para formação de adenosina, sendo portanto uma via independente da utilização de ATP e NTPDase (HORENSTEIN et al., 2015). Os pacientes com MM do presente estudo demonstraram redução da atividade de 5'-NT, e portanto, não seria esta a razão pelo aumento de adenosina. Já foi demonstrado que a hipóxia em ambientes tumorais, como no MM, resultante de alterações mediadas por HIF-1 α e HIF-2, favorece a glicólise anaeróbica, com marcada redução de pH no microambiente, redução da produção de ATP e aumento simultâneo da geração de NAD^+ seguida de parcial inibição da atividade de CD73/5'-NT (YEGUTKIN, 2014). Sob tais condições, acredita-se que uma fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), presente na superfície de osteoclastos, seria responsável pela formação de adenosina a partir do AMP formado por via alternativa (HORENSTEIN et al., 2015), e esta via dependente do pH explicaria os resultados encontrados. O aumento de adenosina por esta via está relacionado a diversas células, além dos osteoclastos. O metabolismo da adenosina via NAD^+ pode influenciar a função de células Tregs afetando a apresentação de antígenos e função efetora de células T, B e NK (HUBERT

et al., 2010) contribuindo para a disfunção do sistema imune no MM e patogênese da doença.

Os efeitos da sinalização purinérgica são derivados de complexos enzimas-receptores presentes em muitos tipos celulares como plaquetas, linfócitos, células dendríticas, eritrócitos, macrófagos, entre outras células, além dos componentes solúveis (YEGUTKIN, 2008). Desta forma, este trabalho também avaliou a contribuição da sinalização purinérgica dos componentes presentes na superfície de linfócitos do sangue periférico dos pacientes com MM. A atividade de NTPDase nos linfócitos (chamada de E-NTPDase nesse caso) na hidrólise de ATP e ADP não apresentou alteração significativa nos grupos com MM em relação ao grupo controle. A percentagem de linfócitos expressando CD39 também não mostrou diferença significativa em ambos os grupos tratados e não tratados. Estes resultados indicam que a ligação de ATP aos receptores purinérgicos não deve estar alterada no MM, visto que tanto a expressão quanto a atividade de E-NTPDase não foram afetadas, nem mesmo pelo uso de tratamento.

A redução do percentual de linfócitos CD73⁺ encontrada nos pacientes em tratamento pode representar um mecanismo dinâmico de compensação do sistema imune na tentativa de diminuir a conversão de AMP em adenosina para reduzir o estado de imunossupressão. O controle farmacológico poderia ser responsável por esse efeito.

Por outro lado, observou-se um aumento de E-ADA nos linfócitos em ambos os grupos com MM, independente do aumento da atividade de E-NTPDase, assim como encontrado no soro. Da mesma forma, este resultado indica um possível aumento de adenosina extracelular com aumento das propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias. Este aumento da atividade de E-ADA deve ser resultante da ativação da via alternativa NAD⁺/CD38⁺/CD203a⁺ de formação de adenosina, já que a atividade de NTPDase não está alterada.

A regulação da expressão de ectoenzimas também está ligada às citocinas do ambiente a que as células são exposta (LONGHI et al., 2013). A adesão das CPs às células hematopoiéticas e células estromais induz a secreção de citocinas e fatores de crescimento pelas células no microambiente da MO, incluindo as próprias células do mieloma (PODAR et al., 2000). Este estudo demonstrou um aumento da secreção de IL-6 e IL-10 em ambos os grupos de pacientes com MM, sem alterações significativas nos níveis séricos de IL-2, IL-4, TNF, IFN- γ e IL-17. Estas citocinas secretadas regulam o crescimento, sobrevivência, migração e resistência a drogas de células malignas e mantém o ambiente pró-tumorigênico (FRASSANITO et al., 2001; KRONING et al., 1997), levando à supressão da imunidade adaptativa. Embora a IL-6 esteja envolvida no desenvolvimento de células B normais,

elevação dos níveis de IL-6 no soro está correlacionada com maior massa de células tumorais e também ativação dos osteoclastos em MM (MUTLU et al., 2015). IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória produzida principalmente por células Tregs, monócitos e linfócitos B (OTSUKI et al., 2000), podendo ser liberada em grandes quantidades quando receptores A2A estão ativados, aumentando as propriedades imunossupressoras do microambiente do MM. Kovacs (2010) demonstrou que IL-6 além de ser um fator de crescimento para as CPs também está relacionada a altas taxas de infecção nos pacientes com MM. Os patógenos apresentam PAMPs que são reconhecidos pelos TLRs expressos nas CPs induzindo o crescimento dessas células e prevenindo a apoptose induzida por quimioterápicos através da ativação da via autócrina relacionada a IL-6 (BOHNHORST et al., 2006; JEGO et al., 2006). Diante destes efeitos relacionados ao aumento de IL-6 e IL-10, pode-se inferir que os pacientes com MM apresentam uma maior atividade anti-inflamatória, com efeitos imunossupressores sobre as células que regulam a resposta imune levando a maior suscetibilidade a infecções.

A apoptose é também um mecanismo de defesa, que é ativado sempre que ocorre uma invasão por agentes patogênicos, ou ainda quando o DNA for lesado (GRIVICICH et al., 2007). Evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria dos tumores malignos, independente do tipo de câncer (OKADA & MAK, 2004). As numerosas disfunções no sistema imune em pacientes com MM relacionadas também com a secreção de citocinas podem contribuir para inibição da morte por apoptose das CPs. Dados mostram que altos níveis de purinas, como ATP, ADP e adenosina podem efetivamente induzir a morte por apoptose (FENG et al., 2011; LICHTENSTEIN et al., 1995). Em contrapartida, Ferrari et al. (1998) mostrou que a inibição da produção de ATP pelas células pode abolir completamente a ativação das caspases após tratamento com quimioterápicos, confirmando a importante relação do ATP com a apoptose.

A apoptose foi avaliada neste trabalho através da determinação das atividades das caspases 1, 3 e 8 de células mononucleares de sangue periférico dos pacientes em questão. As atividades das três caspases determinadas foram significativamente reduzidas em todos os pacientes com MM, tratados e não tratados. Além disso, a redução das atividades das caspases foi correlacionada com a diminuição das atividades das nucleotidases no soro, que está possivelmente relacionada com a menor disponibilidade de ATP extracelular. Estes resultados vem de encontro ao trabalho de Kong et al. (2005) que demonstrou que ATP pode estimular receptores P2X7 levando à ativação das caspases-3/8/9 e conseqüentemente à apoptose, e que a diminuição de ATP previne essa ativação. Outros estudos demonstraram que enquanto os

agentes quimioterápicos matam as células, ao mesmo tempo ativam reações que levam à produção de citocinas (como IL-6 e IL-10) e fatores de crescimento favorecendo a proliferação e proteção da apoptose em CPs (LEVINA et al., 2008). Esse mecanismo parece estar presente nos pacientes tratados do estudo, uma vez que apresentaram atividades das caspases similares aos não tratados.

O paradigma da terapia antimiéloma tem evoluído e modificado substancialmente ao longo dos anos, diante do melhor entendimento da biologia da doença e dos avanços terapêuticos (KUMAR et al., 2008; KYRTSONIS et al., 2009). Entretanto, apesar de tais avanços, o MM continua uma doença incurável (RAJKUMAR, 2012). O desenvolvimento do MM pode prosseguir através de um processo de transformação de múltiplos passos, que envolve uma série de eventos moleculares, que levam à limitação e insucesso da quimioterapia padrão, sendo necessária uma combinação de vários novos agentes quimioterapêuticos (MUTLU et al., 2015).

A recomendação de terapias multialvos oferece menor oportunidade das CPs se adaptarem e adquirem mecanismos de resistência (LEHÁR et al., 2009). Diante desse panorama, neste trabalho não foi possível avaliar o efeito isolado dos fármacos, visto que a maioria dos pacientes utiliza uma combinação destes. É possível que um fármaco possa resultar em ações diferentes de forma isolada, e seguindo os protocolos gerais utilizados em diversos trabalhos, foram avaliados somente estes dois grupos de pacientes com MM. Quando comparados os grupos sem tratamentos com o grupo de pacientes tratados, os resultados não apresentaram diferenças significativas para as atividades de E-NTPDase e E-ADA e percentual de expressão de CD39+ nos linfócitos, nem nos níveis de citocinas e atividade das caspases, bem como em ADA no soro. O tratamento parece influenciar na redução da expressão de CD73⁺ em linfócitos e atenuar o efeito imunossupressor apresentado pela redução da hidrólise de ATP, ADP e AMP no soro, como discutido anteriormente.

Em linhas gerais, os resultados evidenciam que ambos os grupos tratados e não tratados de pacientes com MM adotam mecanismos que tentam equilibrar as respostas às estratégias de controle imunológico envolvendo a sinalização purinérgica, porém, muitas vezes favorecem o escape das células tumorais a esse controle. A ativação da imunotolerância das células pode levar à recaída da doença e/ou resistência aos tratamentos, além de predispor a estados infecciosos, comuns nestes pacientes.

5 CONCLUSÕES

- A redução na atividade de NTPDase e 5'-NT, e elevação da ADA no soro de pacientes com MM tratados e não tratados indica uma modulação do sistema favorecendo um estado de imunossupressão e redução de mecanismos pró-inflamatórios.
- Os níveis séricos de IL-6 e IL-10 estão aumentados nos pacientes com MM tratados e não tratados e, provavelmente, relacionados com o crescimento, sobrevivência, e resistência a drogas de células malignas, mantendo um ambiente que favorece a supressão do controle imunológico.
- A redução nas atividades das caspases 1, 3 e 8 em ambos os grupos de pacientes com MM demonstra uma característica antiapoptótica das células, o que é um efeito negativo para o controle da doença.
- As atividades de NTPDase e 5'-NT no soro são positivamente correlacionadas com as atividades das caspases 1, 3 e 8 de ambos os grupos de pacientes com MM.
- A maior atividade de E-ADA em linfócitos de pacientes com MM tratados e não tratados sugere uma tentativa de redução da adenosina no ambiente tumoral.
- A redução na porcentagem de linfócitos CD73⁺ em pacientes tratados pode representar um mecanismo compensatório do sistema imune relacionado ao tratamento na redução da conversão de AMP em adenosina.

6 PERSPECTIVAS

Outros estudos em pacientes com MM pretendem ser conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa a fim de discutir melhor os resultados apresentados até o momento.

Pretende-se quantificar os nucleotídeos (ATP, ADP e AMP) e nucleosídeo da adenina no soro para confirmar as hipóteses levantadas neste estudo quanto aos seus níveis extracelulares.

A determinação da expressão de receptores P2X7 em linfócitos poderia explicar alguns resultados encontrados nas atividades das enzimas do sistema purinérgico.

A avaliação de proteínas associadas à apoptose (bcl-2 e bax) é importante para confirmação dos efeitos antiapoptóticos encontrados.

A avaliação de proteínas associadas à resistência a múltiplas drogas (Pgp e MRP) pode contribuir para identificação de alguns processos de resistência nos pacientes em tratamento.

REFERÊNCIAS

- ABDI, J.; CHEN, G.; CHANG, H. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms. **Oncotarget**, v. 4, p. 2186–2207, 2013.
- ANDERSON, K.C. et al. Clinically relevant end points and new drug approvals for myeloma. **Leukemia**, v. 22, p.231–239, 2008.
- ANDERSON, K.C.; CARRASCO, R.D. Pathogenesis of myeloma. **Annu Rev Pathol.**, v.6, p. 249-274, 2011.
- ANGTUACO, E.J.C. et al. Multiple myeloma: clinical review and diagnostic imaging. **Radiology**, v. 231, p. 11-23, 2004.
- ATKINSON, B. et al. Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic target. **Blood cells, Molecules and Diseases**, v. 36, n. 2, p. 217-222, 2006.
- AYMERIC, L. et al. Tumor cell death and ATP release prime dendritic cells and efficient anticancer immunity. **Cancer Res**, v. 70, p. 855–858, 2010.
- BACAL, N.S. et al. Mieloma Múltiplo: 50 casos diagnosticados por citometria de fluxo. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 27, n. 1, p. 31-36, 2005.
- BARLOGIE, B. et al. Treatment of multiple myeloma. **Blood**, v. 103, p. 20-32, 2004.
- BARSOTTI, C.; IPATA, P.L. Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 36, n.11, p.2214-2225, 2004.
- BATAILLE, R. et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cell. Identification of “many and multiple myelomas” and of new targets for myeloma therapy. **Haematologica**, v.91, p.1234-1240, 2006.
- BEAVIS, P.A. et al. CD73: A potent suppressor of antitumor immune responses. **Trends Immunol.**, v.33, p.231–237, 2012.
- BERGSAGEL, P.L. et al. Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma. **Proc Natl Acad Sci USA.**,v.93, p.13931-13936, 1996.
- BIRD J. et al. Guidelines for the diagnosis and management of multiple myeloma. **Br J Haematol**, v.154, p. 32-75, 2011.
- BITTENCOURT, R. I. O papel da terapia de manutenção no mieloma múltiplo. **Rev Bras Hematol Hemoter.**, v. 29, n. 1, p. 54-59, 2007.
- BLUESTONE, J.A.; ABBAS, A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. **Nat Rev Immunol**, v.3, p. 253-257, 2003.

- BOATRIGT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol.**, v.15, p.725-731, 2003.
- BOEYNAEMS, J. M.; COMMUNI, D. Modulation of inflammation by extracellular nucleotides. **J. Invest. Dermatol.**, v.126, p.943–944, 2006.
- BOHNHORST, J. et al. Toll-like receptors mediate proliferation and survival of multiple myeloma cells. **Leukemia**, v. 20, p.1138–1144, 2006.
- BOLLEN, M. et al. Nucleotide pyrophosphatases/phosphodiesterases on the move. **Biochem and Molec Biology**, v.35, p.393-432, 2000.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol.**, v. 39, p. 615-47, 2003.
- BOROWIEC, A. et al. Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 269-278, 2006.
- BOURS, M. et al. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacol. Ther.**, v.112, p.358–404, 2006.
- BRIMNES, M.K.; SVANE, I.M.; JOHNSEN, H.E. Impaired functionality and phenotypic profile of dendritic cells from patients with multiple myeloma. **Clin Exp Immunol**, v.144, p. 76–84, 2006.
- BROWN, R.D. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. **Blood**, v.98, p. 2992–2998, 2001.
- BUDIHardjo, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol.**, v.15, p.269-290, 1999.
- BURNSTOCK, G. DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling and cancer. **Purinergic Signalling**, v. 9, n. 4, p. 491-540, 2013.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol Rev**, v. 87, p. 659-797, 2007.
- BURNSTOCK, G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. **Physiol. Rev.**, n.87, p.659-797, 2007.
- COLGAN, S.P. et al. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). **Purinergic Signal.**, v.2, n.2, p.351-60, 2006.
- COLVIN, M. Alkylating Agents. In: KUFEL, D.W. et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 6.ed., Hamilton (ON): BC Decker, 2003.

- CUNHA, R.A. Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: different roles, different sources and different receptors. **Neurochem. Int.**, v.38, n.2, p.107-25, 2001.
- DANIEL, P.T. et al. The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. **Leukemia**, v.15, p.1022-1032, 2001.
- DAVIES, F.E. et al. Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. **Blood**, v.98, n.1, p. 210-216, 2001.
- DEAGLIO, S.; ROBSON, S.C. Ectonucleotidases as regulators of purinergic signaling in thrombosis, inflammation, and immunity. **Adv. Pharmacol.**, v.61, p. 301–332, 2011.
- DI RAIMONDO, F. et al. Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood. **Haematologica**, v. 85, n. 8, p. 800–805, 2000.
- DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP, P2 receptors, and inflammation. **Drug Dev Res**, v. 59, n. 1, p. 171–174, 2003.
- DI VIRGILIO, F. et al. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. **Blood**, v.97, n.3, p.587-600, 2001.
- DI VIRGILIO, F. Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. **Purinergic Signal**, v. 1, n. 3, p. 205-209, 2005.
- DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Curr Opin Pharmacol**, v. 9, p. 507-513, 2009.
- DIAZ, C. et al. Tratamiento del mieloma multiple com pamidronato endovenoso. Mejoria Del dolor y supresion del riesgo de hipercalcemia. **Medicina**, v. 64, p. 289-294, 2004.
- DWYER, K.M. et al. CD39 and control of cellular immune responses. **Purinergic Signal.**, v. 3, p. 171– 180, 2007.
- ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**, v. 111, p. 904-915, 2009.
- ELTZSCHIG, H. K. et al. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. **Blood**, v .113, p. 224-232, 2009.
- ENARI, M.; HUG, H.; NAGATA, S. Involvement of an ICE-like protease in FAS-mediated apoptosis. **Nature**, v. 375, p. 78–81, 1995.
- ENJYOJI, K. et al. Targeted disruption of CD39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation. **Nat. Med.**, v.5, p.1010–1017, 1999.
- FAIMAN, B.M. et al. Renal complications in multiple myeloma and related disorders: survivorship care plan of the International Myeloma Foundation Nurse Leadership Board. **Clin J Oncol Nurs**, v.15, p. 66-76, 2011.

- FAVALORO, J. et al. 2014. Myeloid derived suppressor cells are numerically, functionally and phenotypically different in patients with multiple myeloma. **Leuk. Lymphoma.**, v. 55, n. 12, p. 2893-900, 2014.
- FENG, L. et al. Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. **Neoplasia**, v.13, p. 206-216, 2011.
- FERRARI, D. et al. Differential Regulation and ATP Requirement for Caspase-8 and Caspase-3 Activation during CD95- and Anticancer Drug-induced Apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine.**, v.188, n.5, p.979-984, 1998.
- FERRER, A.C. et al. Contribution of hypoxia-measuring molecular imaging techniques to radiotherapy planning and treatment. **Clin Transl Oncol.**, v.12, n.1, p.22-26, 2010.
- FILIPPINI, A. et al. Ecto-ATPase activity in cytolytic T-lymphocytes. Protection from the cytolytic effects of extracellular ATP. **J of Biological Chemistry**, v. 265, p. 334-340, 1990.
- FOWLER, J. A. et al. "Bone marrow stromal cells Create a permissive microenvironment for myeloma development: a new stromal role for Wnt inhibitor Dkk1. **Cancer Research**, v. 72, n. 9, p. 2183–2189, 2012.
- FRASSANITO, M.A.; CUSMAI, A.; DAMMACCO, F. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. **Clin Exp Immunol.**, v. 125, p. 190–197, 2001.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. v.25, p.4798-4811, 2006.
- GALLUCCI, S.; MATZINGER, P. Danger signals: SOS to the immune system. **Curr Opin Immunol**, v.13, n. 1, p. 114–119, 2001.
- GODING, J.W. Ecto-enzymes: physiology meets pathology. **J. Leukoc. Biol.**, v. 67, p. 285-311, 2000.
- GOSELL, M.D.; GYSBERS, V.; MC CAUGHAN, G.W. CD26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, p. 249-264, 2001.
- GOTTLIEB, R.A. Mitochondrial and apoptosis. **Biol Signals Recept.**, v.10, p.147-161, 2001.
- GREENBERG, A.J.; RAJKUMAR, S.V.; VACHON, C.M. Familial monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma: epidemiology, risk factors, and biological characteristics. **Blood**, v.119, p. 5359-5366, 2012.
- GREENSTEIN, S. et al. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1681-1694, 2002.
- GREIPP, R. et al. International staging system for multiple myeloma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 15, p. 3412–3420, 2005.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol.**, v. 22, p.15-20. 2003.

HAAG, F. et al. Extracellular NAD and ATP: partners in immune cell modulation. **Purinergic Signal**, v. 3, n. 1-2, p. 71-81, 2007.

HASKÓ G.; CRONSTEIN B.N. Adenosine: na endogenous regulator of innate immunity. **Trends Immunol.**, v. 25, n. 1, p. 33-9, 2004.

HASKÓ, G. et al. C. inosine inhibits inflammatory cytokine production by a posttranscriptional mechanism and protects against endotoxin-induced shock, **J. Immunol.**, v.164, p.1013–1019, 2000.

HAUSER, A.E. et al. Long-lived plasma cells in immunity and inflammation. **Ann N Y Acad Sci.**, v.987, p.266-269, 2003.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature.**, v.407, p.770-776, 2000.

HEUTS, D.P. Crystal Structure of a Soluble Form of Human CD73 with Ecto-5' Nucleotidase Activity. **Chem biochem.**, v.13, p.2384–2391, 2012.

HIDESHIMA, T. et al. Bortezomib induces canonical nuclear factor- κ B activation in multiple myeloma cells. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 1046–1052, 2009.

HIDESHIMA, T. et al. Cytokines and signal transduction. **Best Pract Res Cl Ha**, v. 18, n. 4, p. 509–524, 2005.

HIDESHIMA, T. et al. Molecular mechanisms mediating anti-myeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. **Blood**, v. 101, p. 1530-1534, 2003.

HIDESHIMA, T. et al. NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma. **J Biol Chem**, v. 277, n. 19, p. 16639–16647, 2002.

HIDESHIMA, T. et al. Thalidomide and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. **Blood**, v.96, p.2943–2950, 2000.

HOFFBRAND, A. V. et al. Multiple myeloma. In: SAN-MIGUEL, J; BLADÉ, J. **Posgraduate Haematology**, 6. ed., EUA: Willey-Blackwel, 2011.cap.31, p.585.

HORENSTEIN, A.L. et al. Ectoenzymes and Their Products as Communicators in the Human Myeloma Niche. In: PROCEEDINGS OF THE 56TH ASH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION, San Francisco, CA, USA, 2014, p. 2064.

HORENSTEIN, A.L. et al. NAD⁺-Metabolizing Ectoenzymes in Remodeling Tumor–Host Interactions: The Human Myeloma Model. **Cells**, v.4, n.3, p.520-537, 2015.

- HUANG, Y.J. et al. The role of pannexin 1 hemichannels in ATP release and cell-cell communication in mouse taste buds. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.6436-41, 2007.
- HUBERT, S. et al. Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. **J. Exp Med**, v. 207, p. 2561–2568, 2010.
- HUNGRIA, V. T. M. Doença óssea em Mieloma Múltiplo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.29, n.1, p.60-66, 2007b.
- HUNGRIA, V.T.M. Tratamento do Mieloma Múltiplo recidivado. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.2, n.1, p.48-53, 2007a.
- HUNGRIA, V.T.M. et al. Confirmation of the utility of the International Staging System and identification of a unique pattern of disease in Brazilian patients with multiple myeloma. **Hematologica**, v. 93, n.5, p.791-792, 2008.
- HUNTER, A.M.; LACASSE, E. C.; KORMELUCK, R. G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer target. **Apoptosis**, v. 12, n. 9, p. 1543-68, 2007.
- INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION. Desenvolvido pela International Myeloma Foundation Latin America. **Entendendo Testes Freelite® e Hevylite® 2015**. Disponível em: <<http://www.mielomabrasil.org/publicacoes.php>>. Acesso em: 17 jul. 2016.
- INTERNATIONAL MYELOMA FOUNDATION. Desenvolvido pela International Myeloma Foundation Latin America. **Revisão Concisa das Opções e Tratamento de Doenças - Edição 2015**. Disponível em: <<http://www.mielomabrasil.org/publicacoes.php>>. Acesso em: 13 ago. 2016.
- IWAKI-EGAWA, S.; YAMAMOTO, T.; WATANABE, Y. Human plasma adenosine deaminase 2 is secreted by activated monocytes. **Biol. Chem.**, v. 387, p. 319-321, 2006.
- JEGO, G. et al. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll like receptors. **Leukemia**, v.20, p.1130–1137, 2006.
- JOHNSTONE, R.W.; RUEFLI, A.A.; LOWE, S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v.10, n.2, p.153-64, 2002.
- JUNGER, W.G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. **Nat. Rev. Immunol.**, v.11, n.3, p.201-212, 2011.
- KACSMARECK, E. et al. Identification and characterization of CD39/vascular ATP diphosphohydrolase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33116-33122, 1996.
- KANG, J. et al. Nedergaard M. Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. **J Neurosci**, v. 28, p. 4702-4711, 2008.
- KANTARI, C; WALCZAK, H. Caspase-8 and Bid: Caught in the act between death receptors and mitochondria. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1813, n.4, p. 558-563,2011.

KAY, N. et al. Altered T cell repertoire usage in CD4 and CD8 subsets of multiple myeloma patients, a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E9487). **Leuk Lymphoma**, v. 33, n. 1-2, p. 127–133, 1999.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, p.239-257, 1972.

KOYAMA, T. et al. Hypergravity induces ATP release and actin reorganization via tyrosine phosphorylation and RhoA activation in bovine endothelial cells. **Pflugers Arch**, v. 457, p. 711-719, 2009.

KOVACS, E. Interleukin-6 leads to interleukin-10 production in several human multiple myeloma cell lines. Does interleukin-10 enhance the proliferation of these cells?. **Leuk. Res**, v. 34, p. 912-916, 2010.

KRONING, H. et al. Overproduction of IL-7, IL-10 and TGF-beta 1 in multiple myeloma. **Acta Haematol.**, v. 98, p. 116–118, 1997.

KUMAR, S.K., et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. **Blood**, v. 111, p. 2516-2520, 2008.

KROEMER, G.; REED, J.C. Mitochondrial control of cell death. **Nat Med**, v. 6, p. 513-516, 2000.

KUMAR, S. et al. Trisomies in multiple myeloma: Impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. **Blood**, v. 119, p. 2100–2105, 2012.

KYLE, R.A.; RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma. **N Engl J Med**, v.35, n.18, p.1860-73, 2004.

KYLE, R.A.; RAJKUMAR, V. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma, **Leukemia**, v. 23, p. 3-9, 2009.

KYRTSONIS M.C. et al. Staging systems and prognostic factors as a guide to therapeutic decisions in multiple myeloma. **Semin Hematol**, v. 46, n. 2, p.110-117, 2009.

KONG, Q. et al. P2X₇ nucleotide receptors mediate caspase-8/9/3-dependent apoptosis in rat primary cortical neurons. **Purinergic Signal.**, v. 1, p. 337–347, 2005.

LANDGREN, O. et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. **Blood**, v. 113, p. 5412-5417, 2009.

LATINI, S.; PEDATA, F. Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. **J. Neurochem.**, v.79, n.3, p.463-484, 2001.

LEHÁR, J. et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. **Nat Biotech**, v.7, p.659–666, 2009.

- LEVINA, V. et al. Drug-selected human lung cancer stem cells: Cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. **PLoS One**, v. 3, p. e3077, 2008.
- LI, H. et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, **Cell**, v. 94, n. 4, p. 491–501, 1998.
- LIAO, D.; JOHNSON, R.S. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 2, p. 281-290, 2007.
- LICHTENSTEIN, A. et al. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. **Cell Immunol.**, v. 162, p. 248-255, 1995.
- LOEFFLER, M.; KREMER, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. **Exp Cellular Res**, v. 256, p. 19-26, 2000.
- LONGHI, M.S. et al. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. **J Mol Med (Berl)**, v. 91, n.2, p.165-72, 2013.
- MACDONALD, P. E. et al. Release of small transmitters through kiss-and-run fusion pores in rat pancreatic beta cells. **Cell Metab**, v. 4, p. 283-290, 2006.
- MAIOLINO, A.; MAGALHÃES, R.J.P. Mieloma múltiplo e insuficiência renal. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 29, n. 1, p. 86-91, 2007.
- MALAVASI, F. et al. CD38 and CD157 as receptors of the immune system: a bridge between innate and adaptive immunity, **Mol. Med.**, v.12, p. 334–341, 2006.
- MALAVASI, F. et al. CD38 and chronic lymphocytic leukemia: A decade later. **Blood**, v. 118, p. 3470–3478, 2011.
- MARTINS, I. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. **Cell Cycle**, v. 8, p. 3723–372, 2009.
- MATHISEN, M. S.; JABBOUR, E.; KANTARJIAN, H. M. Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) with focus on emerging investigational and target therapies. **Oncology**, v. 26, n. 9, p. 851-859, 2012.
- MITSIADES, C.S. et al. Focus on multiple myeloma. **Cancer Cell**, v. 6, p. 439-444, 2004.
- MITSIADES N. et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. **Blood**, v. 99b, p. 4525-4530, 2002b.
- MITSIADES N. et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v .99, p. 14374-14379, 2002a.

- MITTELMAN, M. The implications of anaemia in multiple myeloma. **Clin Lymphoma**, v. 4, p. S23-29, 2003.
- MOREAUX, J. et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. **Blood**, v. 103, n. 8, p. 3148–3157, 2004.
- MUTLU, P. et al. An update on molecular biology and drug resistance mechanisms of multiple myeloma. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 96, p. 413–424, 2015.
- NEFEDOVA, Y.; LANDOWSKI, T.H.; DALTON, W.S. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. **Leukemia**, v. 17, n. 6, p. 1175–1182, 2003.
- NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**, v. 22, p. 299-306, 1997.
- NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Infections in patients with multiple myeloma in the era of high-dose therapy and novel agents. **Clin. Infect. Dis.**, v. 49, p. 1211-1225, 2009.
- O’GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nat Med**, v. 10, p. 801 –805, 2004.
- OGAWARA, H. et al. High Th1/Th2 ratio in patients with multiple myeloma. **Leukaemia Res**, v. 29, p. 135–140, 2005.
- OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.
- ONCOBIOLOGIA. Desenvolvido pelo Programa de Oncobiologia da UFRJ. MAIA, R. C.(Coord.). **Fenótipo MDR multifatorial: implicações para o efeito antitumoral de quimioterápicos convencionais e de um novo composto em neoplasias**. Disponível em: <www.oncobiologia.bioqmed.ufrj.br/programa_grupos_detalhes.asp?id=533>. Acesso em: 19 jul. 2016.
- OTSUKI, T. et al. Expression and production of interleukin 10 in human myeloma cell lines. **Br J Haematol**, v. 111, p. 835–42, 2000.
- OYAJOBI, B.O. Multiple myeloma/hypercalcemia. **Arthritis Res Ther**, v. 9, p. S4, 2007.
- PALOMBELLA, V.J. et al. The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF-kB1 precursor protein and the activation of NF-kB. **Cell**, v.78, p.773-785, 1994.
- PALUMBO, A. et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: An International Myeloma Working Group report. **Blood**, v. 125, p. 2068–2074, 2015.
- PETROS, A.M.; OLEJNICZAK, E.T.; FESIK, S.W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PILARSKI, L.M. et al. Severe Deficiency of B Lymphocytes in Peripheral Blood from Multiple Myeloma, **J Clin Invest**, v. 74, p. 1301–1306, 1984.

PODACK, E.R.; YOUNG, J.; COHN, Z.A. Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T cell granules. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.82, n.24, p.8629-8633, 1985.

PODAR, K. et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 7875-81, 2002.

PRATT, G.; GOODYEAR, O.; MOSS, P. Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma, **British Journal of Haematology**, v. 138, n. 5, p. 563–579, 2007.

QUARONA, V. et al., Unraveling the contribution of ectoenzymes to myeloma life and survival in the bone marrow niche, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1335, p.10–22, 2015.

RAJKUMAR, S. V. Multiple myeloma: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am. J. Hematol.**, v. 87, p. 78–88, 2012.

RAJKUMAR, S.V. et al. International Myeloma Working Group criteria for the Diagnosis of multiple myeloma. **Lancet Oncol**, v. 15, p. 538-548, 2014.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for Purines and Pyrimidines. **Pharmacol. Rev.**, v. 50, n.3, p. 413-492, 1998.

RAWSTRON, A.C. et al. B-lymphocyte suppression in multiple myeloma is a reversible phenomenon specific to normal B-cell progenitors and plasma cell precursors. **Br J Haematol**, v. 100, p. 176–183, 1998.

REED, J. Apoptosis and cancer: strategies for integrating program cell death. **Semin Hematol**, v.37, p. 9-16, 2000.

REGATEIRO, F.S. et al. Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGFbeta. **Eur. J. Immunol**, v. 41, p. 2955–2965, 2011.

RESTA, R.; YAMASHITA, Y.; THOMPSON, L.F. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. **Immunological Reviews**, v.161, p.95-109, 1998.

ROBSON, S.C.; SEVIGNY, J.; ZIMMERMANN, H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. **Purinergic Signal**, v.2, p.409–430, 2006.

ROH, J.L. et al. The prognostic value of hypoxia markers in T2-staged oral tongue cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 1, p. 63-68, 2009.

ROMANO, A. et al. Immunological Dysregulation in Multiple Myeloma Microenvironment. **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 198539, 10 pages, 2014.

ROSEN, L.S. et al. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: a phase III, double-blinded, comparative trial. **Cancer J**, v. 7, p. 377-387, 2001.

ROSSI, M. et al. Immunologic microenvironment and personalized treatment in multiple myeloma. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 13, n. 1, suppl, p. S83–S93, 2013.

RUIZ, M. L.; LIM, Y-H.; ZHENG, J. Adenosine A2A Receptor as a Drug Discovery Target. **J Medic Chem**, v. 57, n. 9, p. 3623-3650, 2014.

RUPNARAIN, C. et al. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **Biol Chem**, v. 385, p. 449-64, 2004.

RUSSELL, S.J.; RAJKUMAR, S.V. Multiple myeloma and the road to personalised medicine. **Lancet Oncol**, v. 12, p. 617–619, 2011.

SAHOTA, S.S. et al. Myeloma VL and VH gene sequences reveal a complementary imprint of antigen selection in tumor cells. **Blood**, v. 89, p. 219-226, 1997.

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nat Immunol**, v. 6, p. 345–352, 2005.

SATO, J. et al. 18F-fluoromisonidazole PET uptake is correlated with hypoxia-inducible factor-1 α expression in oral squamous cell carcinoma. **J Nucl Med**, v. 54, n. 7, p. 1060-1065, 2013.

SAVE, S.; PERSSON, K. Extracellular ATP and P2Y receptor activation induce a proinflammatory host response in the human urinary tract. **Infect Immun**, v. 78, n. 3609-3615, 2010.

SEER. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. **SEER Cancer Statistics Factsheets: Myeloma**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2014.

SELZNER, N. et al. Water induces autocrine stimulation of tumor cell killing through ATP release and P2 receptor binding. **Cell Death Differ**, v. 11, suppl 2, p. S172-180, 2004.

SEMENZA, G.L. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. **Semin Cancer Biol**, v. 19, n. 1, p.12-16, 2009.

SHARMA, A. et al. Dysregulation in T helper 1/T helper 2 cytokine ratios in patients with multiple myeloma. **Leukemia & Lymphoma**, v. 51, v. 5, p. 920–927, 2010.

SHAROYAN, S. et al. Influence of dipeptidyl peptidase IV on enzymatic properties of adenosine deaminase. **Acta Biochim. Pol.**, v.53, n.3, p.539-546, 2006.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64 p. 9-29, 2014.

SKOBERNE, M.; BEIGNON, A. S.; BHARDWAJ, N. Danger signals: a time and space continuum. **Trends Mol Med**, v. 10, n. 6, p. 251–257, 2004.

- SLUYTER, R.; BARDEN, J.A.; WILEY, J.S. Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. **Cell Tissue Res**, v.304, p. 231-236, 2001.
- SMYTH, M.J.; GODFREY, D.I.; TRAPANI, J.A. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. **Nat Immunol**, v. 2, p. 293–299, 2001.
- SONMEZ, M. et al. Effect of pathologic fractures on survival in multiple myeloma patients: a case control study. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 27, p. 487-493, 2008.
- SPYCHALA, J. Tumor-promoting functions of adenosine. **Pharmacol Therap**, v. 87, p. 161–173, 2000.
- STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. Modulation of purinergic signaling by NPPTtype ectophosphodiesterases. **Purinergic Signalling**, v. 2, p. 361-70, 2006.
- STEFAN, C.; JANSEN, S.; BOLLEN, M. NPP-type ectophosphodiesterases: unity in diversity. **TRENDS in Biochemical Science**, v. 30, p. 542-550, 2005.
- SUADICANI, S. O.; BROSNAN, C. F.; SCEMES, E. P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling. **J Neurosci**, v. 26, p. 1378-1385, 2006.
- TAKEDACHI, M. et al. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation. **J. Cell Physiol**, v. 227, p. 2622-2631, 2012.
- TORRES, I.L. et al. Chronic stress effects on adenine nucleotide hydrolysis in the blood serum and brain structures of rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 74, p. 181-186, 2002.
- TSUBOI, I. et al. Adenosine deaminase isoenzyme levels in patients with human T-cell lymphotropic virus Type 1 and human immunodeficiency virus Type 1 infections. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.2, p. 626-630, 1995.
- UNGERER, J.P.J. et al. Serum adenosine deaminase: isoenzyme and diagnostic application. **Clin. Chem.**, v.38, p.1322-1326, 1992.
- VACCA, A. et al. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 23, p. 5334-5346, 2005.
- VAN DE DONK, N.W.C.J.; SOONENVELD, P. Diagnostic and risk stratification in Multiple Myeloma. **Hematol Oncol Clin N Am**, v. 28, p. 791-813, 2014.
- VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat Immunol**, v. 6, p. 338–334, 2005.
- WANG, S. et al. Optimizing immunotherapy in multiple myeloma: Restoring the function of patients' monocyte-derived dendritic cells by inhibiting p38 or activating MEK/ERKMAPK and neutralizing interleukin-6 in progenitor cells. **Blood**, v. 108, n. 13, p. 4071–4077, 2006.

- WEISS, B.M. et al. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. **Blood**, v. 113, n. 22, p. 5418-5422, 2009.
- YEGUTKIN, G.G. et al. Metabolism of circulating ADP in the bloodstream is mediated via integrated actions of soluble adenylate kinase-1 and NTPDase1/CD39 activities. **FASEB J.**, v.26, n.9, p. 3875-3883, 2012.
- YEGUTKIN, G.G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, p. 673-694, 2008.
- YEGUTKIN, G.G. Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 49, p. 473–497, 2014.
- YOUNG, J.D. et al. Purification and characterization of a cytolytic pore-forming protein from granules of cloned lymphocytes with natural killer activity. **Cell**, v. 44, n. 6, p. 849-859, 1986.
- ZHANG, Z. et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. **Nat Cell Biol**, v. 9, p. 945-53, 2007.
- ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. **Drug Devel. Res.**, n. 52, p. 44-56, 2001.
- ZIMMERMANN, H. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. **Sch. Pharmacol.**, v. 362, p. 299-309, 2000.
- ZIMMERMANN, H. Nucleotides and CD39: principal modulatory players in hemostasis and thrombosis. **Nature Medicine**, v. 5, n. 9, p. 987-988, 1999a.
- ZIMMERMANN, H. Two novel families of ectonucleotidase: molecular structures, catalytic properties and a search for function. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 20, p. 231-236, 1999b.
- ZIMMERMANN, H.; ZEBISCH, M.; STRATER, N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. **Purinergic Signal.**, v.8, n.3, p.437-502, 2012.
- ZIPORI, D. The hemopoietic stem cell niche versus the microenvironment of the multiple myeloma-tumor initiating cell. **Cancer Microenvironment**, v. 3, n. 1, p. 15–28, 2010.
- ZORNIG, M. et al. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1551, p. F1-37, 2001.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA COM SERES HUMANOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À APOPTOSE, RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS, SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA, METILAÇÃO DE DNA E ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA NO MIELOMA MÚLTIPLO.

Pesquisador: José Edson Paz da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24833313.5.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 494.114

Data da Relatoria: 10/12/2013

Apresentação do Projeto:

O estudo constará da análise de amostras coletadas de aproximadamente 40 pacientes recém-diagnosticados para mieloma múltiplo (MM) e que ainda não tenham recebido tratamento. Os mesmos serão avaliados após 3, 6, 12 meses do início do tratamento, e o mesmo período após transplante de medula óssea, quando ocorrer. As amostras biológicas da medula óssea e do sangue periférico a serem utilizadas, farão parte das alíquotas coletadas para os exames de rotina para diagnóstico e acompanhamento do tratamento de MM. O presente estudo pretende avaliar quantitativamente a expressão de proteínas associadas à apoptose (bcl-2, bax) e à resistência a múltiplas drogas MDR (Pgp, MRP) na população de linfócitos B; dosar citocinas Th1/Th2; quantificar a expressão das ectoenzimas CD39 e CD73, e receptor P2X7 em linfócitos B; quantificar nucleotídeos e nucleosídeo de adenina; avaliar a presença de metilação nos genes CDKN2B, CDH1, ESR1, HIC1, CCND2, DCC e TGFHR2 envolvidos na regulação de diversas vias celulares de linfócitos B; avaliar o perfil de agregação plaquetária induzida pela quimioterapia; avaliar o

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi **CEP:** 97.105-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 494.114

estado de ativação das plaquetas através da expressão de CD41, CD61, CD42b, CD62P, p24/CD9, FVa e anexina V; determinar a expressão dos receptores purinérgicos P2X1, P2Y1, P2Y12 e P2X7 em plaquetas; determinar a relação de células Tregs CD4+/CD25+, a expressão plaquetária de CD154 e concentração de TGF-H. Diante disso, este projeto propõe também avaliar e correlacionar os fatores prognósticos e a resposta ao tratamento antineoplásico, utilizando as variáveis relacionadas à resposta imune.

Objetivo da Pesquisa:

avaliar a expressão em linfócitos das proteínas relacionadas com a apoptose e proteínas indicadoras de resistência a múltiplas drogas, sua com interação citocinas pró e antiinflamatórias, metilação do DNA, sinalização purinérgica, ativação plaquetária e células T regulatórias na modulação da resposta imune no mieloma múltiplo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Critério de Inclusão:

crescimento tumoral e colapso do controle imune local (8).As disproteinemias presentes no mieloma múltiplo estão frequentemente relacionadas a anormalidades de hemostasia, podendo estar associadas tanto ao sangramento quanto a predisposição à trombose. As descrições clássicas relatam que, durante o curso clínico do MM, 15-30% dos pacientes podem apresentar manifestações hemorrágicas, que variam de acordo com o tipo de MM (15% para IgG e 30% para IgA) (9). O sangramento no mieloma múltiplo tem incidência muito variável, sendo, na maioria das vezes, do tipo cutâneo mucoso. Esse distúrbio pode estar diretamente relacionado à anormalidade proteica. Sendo assim, as manifestações hemorrágicas decorrentes da paraproteína podem originar-se por anormalidade nas plaquetas, nos fatores de coagulação ou na fibrinólise. A plaquetopenia é descrita em uma incidência variável, ocorrendo em uma fase mais tardia da doença, de acordo com o grau de infiltração medular pelos plasmócitos ou é secundária à quimioterapia (9). Para o paciente sintomático (anemia, hipercalcemia, alteração da função renal, presença de lesões líticas ou plasmocitoma extramedular, aumento progressivo do componente-M no soro e/ou urina), o tratamento deverá

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 494.114

ser rapidamente instituído. Nesse caso, existem dois grandes grupos de pacientes: aqueles que são considerados candidatos à consolidação com altas doses de quimioterapia seguidas de transplante de células-tronco hematopoiéticas e um segundo grupo de pacientes não elegíveis para receber altas doses de quimioterapia. Os critérios utilizados para alocar os pacientes em um desses grupos baseiam-se em idade, performance status (medida relacionada à tentativa de quantificar o bem-estar geral dos pacientes) e presença de comorbidades (10). Para os pacientes assintomáticos, não se verifica melhora adicional quando a quimioterapia é iniciada ao diagnóstico, podendo permanecer estáveis durante anos sem requerer tratamento (11). Apesar dos progressos no tratamento do mieloma múltiplo, com aumento da sobrevida livre de progressão observada principalmente em pacientes abaixo de 65 anos, o mieloma ainda é uma doença incurável e a maioria dos pacientes recidivará. O padrão da recidiva é muito heterogêneo, podendo evoluir com comportamento indolente ou agressivo. Enquanto alguns pacientes apresentam recidiva precoce, com pior prognóstico, e provavelmente responderão mal ao tratamento, outros apresentam recidiva após um longo período de plateau e provavelmente atingirão uma melhor resposta à terapia (12). Existem várias opções de tratamento para o paciente com mieloma múltiplo recidivado, e a decisão dependerá do padrão da recidiva, do tratamento realizado como primeira linha, se fez transplante autólogo de medula óssea ou não, da resposta e sua duração, se a recidiva ocorreu com ou sem tratamento de manutenção, do performance status do paciente e da reserva medular. Na maioria dos casos, o objetivo terapêutico será controlar a doença, melhorar os sintomas e a qualidade de vida. Dentre as opções de terapêuticas, podem ser considerados a reintrodução do tratamento usado como terapia inicial, o transplante autólogo de medula óssea e fármacos como a talidomida e o bortezomibe (12-14).

Tamanho da Amostra no Brasil: 80
Data do Primeiro 20/12/13 00:00
Serão considerados aptos a participarem do estudo os indivíduos recém-diagnosticados para MM, que ainda não receberam tratamento

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 494.114

quimioterápico e que aceitem participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Para os critérios de inclusão no grupo controle, constam os portadores de neoplasias malignas, atendidos no HUSM no período do estudo por suspeita de câncer e que não confirmaram o diagnóstico, que foram submetidos à coleta de amostras para fins investigativos, que não estiverem em uso de quimioterápicos ou corticosteróides e que aceitem participar do estudo mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos do estudo os pacientes que fizeram uso de tratamento quimioterápico prévio antes do encaminhamento ao Serviço, os que utilizaram qualquer dose de corticosteróides antes do diagnóstico, os que não aceitem participar do estudo e aqueles cujo volume de amostra for insuficiente para os testes por dificuldades na coleta.

Riscos:

Nas condições em que o trabalho está sendo proposto, não há previsão de riscos além daqueles já conhecidos para as coletas das amostras.

Benefícios:

As neoplasias hematológicas afetam cerca de dez por cento da população mundial. Diversos esquemas de tratamento têm sido utilizados para combater estas enfermidades. Fatores como características individuais, leucometria ao diagnóstico, idade do paciente, presença de fenótipos aberrantes, alterações cromossômicas e moleculares podem influenciar positiva ou negativamente a qualidade da resposta aos protocolos terapêuticos. A detecção precoce de proteínas que dificultam ou retardam a apoptose e produzem resistência às drogas, de citocinas pró- e antiinflamatórias, bem como de nucleotídeos e nucleosídeo de adenina relacionados com enzimas como as ectonucleotidases NTPDase (CD39) e 5 α -nucleotidase (CD73), e a avaliação do padrão de metilação específica de genes podem determinar ou auxiliar na identificação de fatores prognósticos no Mieloma Múltiplo. Além disso, a compreensão de como os mecanismos de interações entre plaquetas, células Tregs e as células tumorais regulam os processos trombóticos, a angiogênese e metástase, vem sendo explorada no

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900
UF: RS Município: SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 494.114

sentido de auxiliar pesquisas para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas. Esses processos estão diretamente envolvidos com a qualidade da resposta imune e podem auxiliar na tomada de decisões, no monitoramento dos pacientes e na pesquisa clínica na busca de fármacos mais específicos e mais eficazes com menor citotoxicidade

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

pesquisa relevante, pesquisadores demonstram conhecimento e experiência no assunto, metodologia adequada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

presentes e adequados

Recomendações:

ok

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovar

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 13 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Félix Alexandre Antunes Soares
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - Prédio da Reitoria 2º andar
Bairro: Cidade Universitária - Camobi CEP: 97.105-900
UF: RS Município: SANTA MARIA E-mail: cep.ufsm@gmail.com
Telefone: (55)3220-9362