

Paula Fernanda de Oliveira

**ESTADO NUTRICIONAL E SUAS RELAÇÕES COM
POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T E MARCADORES
INFLAMATÓRIOS EM INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO
RECENTE DE NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS MALIGNAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Everson Araújo Nunes.

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Paula Fernanda de

Estado nutricional e suas relações com populações de linfócitos T e marcadores inflamatórios em indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas / Paula Fernanda de Oliveira ; orientador, Everson Araújo Nunes - Florianópolis, SC, 2013.
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição.

Inclui referências

1. Nutrição. 2. Neoplasias hematológicas. 3. Linfócitos T. 4. Citocinas. 5. Estado nutricional. I. Araújo Nunes, Everson . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. III. Título.

Este trabalho é dedicado aos meus amados pais, José Nivaldo e Lurdete. O amor e o testemunho de vida de vocês ensinaram-me as coisas mais belas e essenciais da vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus** pelo dom da vida e por sua presença viva e constante, fortalecendo-me e guiando-me em todos os momentos.

Aos meus pais, **José Nivaldo** e **Lurdete**, pelo *sim* à exigente e belíssima tarefa de gerar, educar e amar a mim e a meus irmãos. Vocês foram os nossos primeiros mestres, que nos ensinaram o que há de mais belo e essencial na vida. E aos meus irmãos, **Matheus Ulisses**, **Maurício Júlio** e **José Henrique**, pelo carinho e incentivo sempre!

Ao meu amor **Henrique**, por todo o amor e incentivo. É maravilhoso compartilhar contigo a alegria deste momento, especialmente nesta etapa de nossas vidas.

Ao prezado **prof. Everson**, por toda a dedicação e paciência. Agradeço a Deus pela oportunidade de tê-lo como meu orientador. Teu ser pesquisador, professor e humano são exemplos que levarei sempre comigo em minha prática profissional e de vida.

Ao querido **prof. Erasmo**, por sua sensibilidade e carinho em todos os momentos. Obrigada por todos os seus ensinamentos e por sua amizade!

Às colegas e amigas **Dayanne** e **Carolina**, pelo companheirismo e cumplicidade durante esses dois anos... E à amiga **Thayz**, por sua dedicação e disponibilidade em ajudar. Vocês são presentes de Deus em minha vida!

Aos **pacientes** da onco-hematologia do HU/UFSC por sua breve, porém, tão significativa passagem em minha vida. Vocês doaram muito mais do que amostras de sangue, vocês doaram sorrisos, esperança, vontade de viver... Fizeram-me observar a vida por um ângulo diferente e ajudaram a tornar-me um ser humano melhor.

Aos **profissionais** do serviço de hematologia do HU/UFSC, representados pela **Dr.^a Joanita Angela Del Moral**, muito obrigada por nos acolher e nos ajudar em tudo o que precisamos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Nutrição** pelo suporte financeiro.

Ao **Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC)**, nas pessoas dos professores coordenadores e alunos, por possibilitarem a execução do nosso projeto e pela amizade construída ao longo destes dois anos.

Ao **Grupo de Oração Universitário (GOU)** da UFSC, pelo acolhimento, carinho e oportunidade de partilhar a vida e a fé com cada um de vocês neste período da minha vida.

A todos que de certa forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Tudo posso Naquele que me fortalece”.
(Filipenses 4, 13)

RESUMO

OLIVEIRA, Paula Fernanda de. **Estado nutricional e suas relações com populações de linfócitos T e marcadores inflamatórios em indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas.** Florianópolis, 2013. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Orientador: Everson Araújo Nunes, Dr.

Neoplasias hematológicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças, entre elas, destacam-se as leucemias, os linfomas e o mieloma múltiplo. Reconhecidamente, o componente inflamatório é um fator inerente às neoplasias. Deste processo participam células imunitárias e mediadores inflamatórios que podem repercutir sobre o estado nutricional dos indivíduos acometidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as proporções de linfócitos T CD4⁺, T CD4⁺IL-17⁺ e T CD8⁺, concentrações de citocinas plasmáticas (interleucina(IL)-6, IL-10, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)), e suas relações com o estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas. Este é um estudo descritivo, envolvendo dezesseis indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas foram incluídos no estudo. Para avaliar as proporções das populações linfocitárias, amostras de sangue foram incubadas por 4h em meio de cultura na presença ou não de estimuladores. Posteriormente, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos (anti-CD4, anti-IL-17A e anti-CD8) ligados a fluoróforos específicos, e adquiridas por citometria de fluxo. As concentrações de citocinas foram determinadas por citometria de fluxo. O estado nutricional foi avaliado pelos parâmetros: índice de massa corporal (IMC), circunferência muscular do braço (CMB) e percentual de perda de peso. A proporção de linfócitos T CD4⁺, T CD4⁺IL-17⁺ e T CD8⁺ encontradas foram, respectivamente, 30,2% (16,8; 39,6), 2,5% (2,1; 10,8) e 19,5% (8,2; 25,5) e a razão CD4⁺:CD8⁺ foi 1,5 (1,0; 3,5). Em análise por diagnóstico observou-se que os indivíduos com linfoma apresentaram maior proporção de linfócitos T CD8⁺ (p=0,024) e uma menor razão CD4⁺:CD8⁺ (p=0,006) em relação às leucemias. A proporção de células T CD4⁺IL-17⁺ foram correlacionadas negativamente com a razão CD4:CD8 e positivamente com a CMB. A concentração de IL-6 encontrada foi aproximadamente 4 vezes superior aos valores descritos

na literatura para indivíduos normais. Os indivíduos participantes não apresentaram comprometimento nutricional, com base nos parâmetros antropométricos. A partir dos resultados foi possível constatar que os indivíduos com neoplasias hematológicas em fase inicial não apresentam comprometimento nutricional, considerando a avaliação antropométrica, embora apresentem um quadro inflamatório pronunciado pela elevação de marcadores inflamatórios. Os indivíduos com linfomas mantiveram melhor a proporção de linfócitos T CD8 em relação às leucemias, e a possível relação positiva entre as células Th17, T CD8 e CMB, soma evidências de que essas células podem desempenhar um papel importante na imunidade antineoplásica e prognóstico.

Palavras-chave: Neoplasias hematológicas. Linfócitos T. Citocinas. Estado nutricional.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Paula Fernanda de. **Nutritional status and its relations with populations of T lymphocytes and inflammatory markers in patients with newly diagnosed hematological malignancies.** Florianópolis, 2013. Dissertation (Master in Nutrition) – Post Graduation Program in Nutrition, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Supervisor: Everson Araújo Nunes, Dr.

Hematological neoplasms comprise a heterogeneous group of diseases, among them are the leukemias, lymphomas and multiple myeloma. Admittedly, the inflammatory component is a factor inherent to neoplasms. In this process, there is the participation of immune cells and the inflammatory mediators produced by them, which can, among other functions, modify the nutritional status of the affected individuals. The aim of this study was to evaluate the proportions of CD4⁺, CD4⁺IL-17⁺ and CD8⁺ T cells, plasma cytokine concentrations (interleukin (IL)-6, IL-10, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF)), and their relationship to the nutritional status of patients with hematological neoplasms. This is a descriptive study involving sixteen individuals of both sexes diagnosed with hematological neoplasms were included in the study. To assess the proportions of lymphocyte populations, blood samples were incubated for 4h in culture medium in the presence or not of stimulators. Subsequently, the cells were fixed, permeabilized and stained with antibodies specific fluorophores linked to (anti-CD4, anti-IL-17A and anti-CD8) and acquired by flow cytometry. Concentrations of cytokines were determined by flow cytometry. Nutritional status was assessed by parameters: body mass index (BMI), arm muscle circumference (AMC) and percentage of weight loss. The proportion of CD4⁺ T cells, CD4⁺IL-17⁺ and CD8⁺ T cells were, respectively, 30.2% (16.8, 39.6), 2.5% (2.1, 10.8), and 19.5% (8.2, 25.5) and the CD4⁺:CD8⁺ was 1.5 (1.0, 3.5). In diagnostic analysis showed that individuals with lymphoma had a higher proportion of CD8⁺ T lymphocytes ($p = 0.024$) and reduced the CD4⁺:CD8⁺ ratio ($p = 0.006$) compared to leukemias. The proportion of CD4⁺IL-17⁺ was negatively correlated with the CD4:CD8 ratio and positively with the AMC. The concentration of IL-6 found was approximately 4 times higher than the values reported in the literature for normal subjects. The individuals involved had no nutritional impairment. Based on the results, it was established that individuals with

hematologic neoplasms, in early stage, have no nutritional impairment, based in antropometric evaluation, although showed a pronounced elevation in inflammatory markers. Individuals with lymphomas presented a higher proportion of CD8⁺ T lymphocytes compared to leukemias and a potential positive relationship between Th17 cells, CD8 and AMC. Such data increase evidences that these cells may play an important role in antineoplastic immunity and prognosis.

Keywords: Hematological neoplasms. T cells. Cytokines. Nutritional status.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação das relações entre resposta inflamatória e neoplasias.....33
- Figura 2 – Gráficos citometria de fluxo representativos das proporções de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺IL17⁺ do sangue periférico.....47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Estudos clínicos relacionados à avaliação de fenótipos de células imunitárias, citocinas e neoplasias malignas.....	38
Quadro 2 – Variáveis, suas características e indicadores.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CB – Circunferência do braço
- CBA – Ensaio citométrico de esferas ordenadas
- CD – *Cluster of differentiation* (agrupamento de diferenciação)
- CMB – Circunferência Muscular do Braço
- COX – Cicloxigenase
- DCT – Dobra Cutânea Tricipital
- EBV – *Epstein-Barr virus* (Vírus Epstein-Barr)
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- FOXP3 – *Forkhead Box P3*
- HIF1 α – *Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha* (Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa)
- HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)
- HTLV-1 – *Human T-lymphotropic virus Type 1* (Vírus linfotrópico da célula T humana tipo 1)
- HNE – Hidroxinonenal
- IFN- γ – Interferon gama
- IL – Interleucina
- LDH – Lactato desidrogenase
- LH – Linfoma de Hodgkin
- LNH – Linfoma não Hodgkin
- LMA – Leucemia mieloide aguda
- MO – Medula óssea
- NF- κ B – *Nuclear Factor Kappa B* (Fator de transcrição nuclear Kappa B)
- PCR – Proteína C reativa
- PMA – *phorbol-12-myristate 13-acetate* (forbol-12-miristato 13-acetato)
- ROR- γ t – *Retinoid-related orphan receptor gama t* (Receptor órfão relacionado ao retinol gama t)
- RPMI – *Roswell Park Memorial Institute* (Instituto Memorial Roswell Park)

STAT-3 – *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
(Transdutor de Sinal e Ativador de Transcrição 3)

TCTH – Transplante de células-tronco hematopoéticas

TGF- β – *Transforming Growth Factor β* (Fator de Crescimento Transformador β)

Th – Linfócito T *helper*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

Treg – Linfócito T regulador

VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Vascular Endotelial)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	OBJETIVOS	26
1.1.1	Objetivo Geral.....	26
1.1.2	Objetivos Específicos	26
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2.1	NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS	27
2.2	SISTEMA IMUNITÁRIO	31
2.2.1	Resposta inflamatória e neoplasias	31
2.2.2	Células imunitárias, citocinas e neoplasias	35
3	POPULAÇÃO E MÉTODOS	43
3.1	POPULAÇÃO	43
3.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	43
3.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	44
3.4	INSTRUMENTOS E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS.....	44
3.4.1	Caracterização dos indivíduos	44
3.4.2	Avaliação do estado nutricional	44
3.4.3	Coleta de sangue	45
3.4.4	Avaliação da proporção de linfócitos T CD4, Th17 e CD8	46
3.4.5	Determinação da concentração de citocinas plasmáticas.....	48
3.4.6	Determinação das concentrações séricas de PCR e albumina e do hemograma.....	48
3.5	TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS	49
4	ARTIGO ORIGINAL	51
5	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS.....	83
	APENDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93
	APENDICE B – Formulário para coleta de dados	99
	ANEXO A - Parecer Consubstanciado CEPESH/UFSC.....	101

1 INTRODUÇÃO

Neoplasia é um termo utilizado para designar doenças nas quais células anormais dividem-se de maneira descontrolada, tornando-se capazes de se alastrar a outros tecidos. Quando elas são originadas de tecidos produtores de células sanguíneas e de células do sistema imunitário, são chamadas de neoplasias hematológicas. Fazem parte desse grupo heterogêneo de doenças as leucemias e os linfomas (ALMEIDA *et al*, 2005; SWERDLOW *et al*, 2008).

As leucemias são doenças malignas das células progenitoras da medula óssea e de outros órgãos hematopoiéticos. Podem ser subdivididas de acordo com o tipo de linhagem celular que é afetada, linfóide ou mieloide, e de acordo com a velocidade de progressão da doença, aguda ou crônica. Assim, as leucemias são classificadas como: linfóide aguda, mieloide aguda, linfóide crônica e mieloide crônica (ALMEIDA *et al*, 2005; HAMERSCHLAK, 2008;).

Entre os fatores associados com o desenvolvimento das leucemias, destaca-se: tabagismo, radiação, síndrome de Down e outras doenças hereditárias, benzeno (presente na fumaça de cigarro, gasolina e indústria química), algumas classes de drogas utilizadas em quimioterapia, síndrome mielodisplásica e outras desordens sanguíneas (POLYCHRONAKIS *et al*, 2013).

Outro subgrupo de neoplasias hematológicas são os linfomas. Esses são originados nos linfonodos, estruturas do sistema imunitário concentradas em diversas regiões do organismo, e são classificadas em dois tipos: Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH) (MOUNTER; LENNARD, 1999; ALMEIDA *et al*, 2005; FLOWERS; ARMITAGE, 2010).

Na maior parte desses casos, a etiologia é desconhecida, embora exista associação com a função imunitária alterada. Assim, indivíduos imunossuprimidos, portadores de doenças autoimunes severas, e infectados pelo HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), HTLV-1 (*Human T-lymphotropic virus Type 1*), EBV (*Epstein-Barr vírus*) e herpes vírus 8, possuem maior risco para o desenvolvimento de linfomas. Além disso, infecção por *Helicobacter pylori*, alterações em genes envolvidos com a resposta imunitária, exposições ocupacionais e ambientais a substâncias químicas também estão associadas ao desenvolvimento dessas neoplasias (ALEXANDER *et al*, 2007; HJALGRIM, 2012).

Ainda, entre as neoplasias hematológicas tem-se o mieloma múltiplo, doença causada pela proliferação de um linfócito B clonal neoplásico, formador de células produtoras de imunoglobulinas anômalas. É caracterizado pelo comprometimento do esqueleto em diversos lugares, podendo se propagar, também, para os linfonodos e localizações extralinfonodais, como a pele (SUCRO *et al*, 2009).

São desconhecidos os fatores de risco para o desenvolvimento de mieloma múltiplo, entretanto, acredita-se que exista uma combinação entre fatores genéticos e exposição a fatores ambientais, tais como: radiação ionizante; substâncias químicas (solventes) e herbicidas; asbesto e benzeno; infecções virais (herpes vírus 8, HIV, hepatite C) (ALEXANDER *et al*, 2007).

Reconhecidamente, o componente inflamatório é um fator inerente às neoplasias. Deste processo participam células imunitárias e mediadores inflamatórios por elas produzidos. Entre essas células estão os linfócitos T CD4⁺, reguladores essenciais da resposta imunitária antineoplásica. Essas células direcionam a diferenciação de outras células imunitárias em resposta à variedade de antígenos neoplásicos e outros fatores liberados por elas. Também, os linfócitos T CD8⁺ ou T citotóxicos, que causam a destruição de células infectadas ou anormais, constituindo, assim, o principal mecanismo de defesa antineoplásica (ZHU; PAUL, 2008; ALLEN *et al*, 2011).

Dentre os linfócitos T CD4⁺, destacam-se os T helper 17 (Th 17). Estas células têm sido envolvidas no desenvolvimento de doenças inflamatórias e seu papel é discutido nas neoplasias. Muitos dos efeitos mediados por essa célula são atribuídos a IL-17A por ela produzida. A diferenciação desse fenótipo celular é mediada pela ação de citocinas, como IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), e atividade de fatores de transcrição, como STAT-3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) e ROR- γ t (*Retinoid-related orphan receptor gama t*) (PARK *et al*, 2005; PECK; MELLINS, 2009; KORN *et al*, 2009; MURUGAIYAN; SAHA, 2009; WU *et al*, 2009).

No âmbito das neoplasias, os linfócitos Th17 podem exercer atividade pró ou antineoplásica. Elas parecem induzir a produção de uma ampla variedade de fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promove a angiogênese inflamatória e neoplásica, favorecendo assim, o crescimento neoplásico. Porém, esse efeito parece ter maior relevância nas neoplasias sólidas (NUMASAKI *et al*, 2003; NUMASAKI; LOTZE; SASAKI, 2004; TAKARASHI *et al*, 2005). Inversamente, em estudo com neoplasia

pulmonar em ratos, células Th17 provocaram um quadro inflamatório protetor pelo recrutamento de células dendríticas, granulócitos e linfócitos T CD4 e CD8 efetoras (MARTIN-OROZCO *et al*, 2009). E em indivíduos com leucemia linfocítica crônica, uma maior proporção de Th17 esteve relacionada à melhor prognóstico (JAIN *et al*, 2011; NIARAGH *et al*, 2013).

As citocinas são substâncias produzidas por células imunitárias que atuam sobre aspectos específicos da inflamação, retroalimentando o processo inflamatório. Citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina(IL)-6 podem desempenhar importantes papéis na iniciação, proliferação e sobrevivência de células neoplásicas (TANNO; MATSUI, 2011; KIMURA; NAKA; KISHIMOTO, 2011). Além delas, a IL-17 tem sido implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias (WU *et al*, 2009). Por outro lado, a IL-10, citocina com atividade anti-inflamatória, desempenha o papel de reprimir a atividade das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (OUYANG *et al*, 2011). A atuação desses mediadores pode repercutir negativamente sobre o estado nutricional dos indivíduos, podendo levar ao hipermetabolismo, à perda de peso e à redução da massa corporal magra, e afetar a qualidade de vida e a resposta ao tratamento e, conseqüentemente, o prognóstico desses indivíduos (DEWYS *et al.*, 1980; ÁRGILES *et al.*, 2003; WILMORE *et al.*, 2006).

Embora a condição nutricional dos indivíduos com neoplasias hematológicas malignas não apresente comprometimento inicialmente, ele pode ser modificado com o avançar da doença e, especialmente, com o tratamento quimioterápico empregado (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Conhecer a proporção de células imunitárias do sangue periférico e a concentração de citocinas plasmáticas com potencial implicação prognóstica e suas relações com o estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas na etapa anterior ao tratamento quimioterápico é de extrema importância, pois possibilita o manejo nutricional adequado visando a uma melhor resposta ao tratamento e à qualidade de vida desses indivíduos.

Diante disso, formulou-se a seguinte pergunta de partida: *Qual a associação do estado inflamatório e nutricional de indivíduos com diagnóstico de neoplasias hematológicas previamente ao início do tratamento?*

O presente trabalho está inserido no Grupo de Pesquisa em Imunonutrição, o qual é integrado por professores e alunos do Programa

de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os dados aqui apresentados são dados iniciais de um ensaio clínico randomizado que envolverá a suplementação de óleo de peixe em indivíduos com neoplasias hematológicas malignas durante o tratamento quimioterápico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação das proporções de linfócitos T CD4⁺, Th17 (CD4⁺IL-17⁺) e CD8⁺, concentrações de citocinas plasmáticas e variáveis relacionadas ao estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas.

1.1.2 Objetivos Específicos

Em indivíduos com neoplasias hematológicas malignas:

- Avaliar a proporção de linfócitos T CD4⁺, Th17 (CD4⁺IL-17⁺) e CD8⁺ no sangue periférico;
- Determinar a concentração de citocinas plasmáticas (IL-6, IL-10, IL-17A, fator de necrose tumoral);
- Avaliar parâmetros laboratoriais (hemograma completo, PCR, albumina);
- Avaliar o estado nutricional por meio dos métodos antropométricos: índice de massa corporal, circunferência muscular do braço, percentual de perda de peso;
- Correlacionar proporções de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, Th17, concentrações de citocinas plasmáticas, parâmetros laboratoriais e as variáveis relacionadas ao estado nutricional.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS

O termo neoplasia significa “novo crescimento” e é utilizado para designar doenças nas quais células anormais se proliferam de maneira excessiva e desregulada. Quando malignas são capazes de se alastrar a outros tecidos e se espalhar para outras partes do organismo por meio do sangue ou do sistema linfático. Existem mais de duzentos diferentes tipos de neoplasias malignas, geralmente recebem o nome do órgão ou do tipo de célula a partir do qual teve origem (ALMEIDA *et al*, 2005).

A categoria de neoplasias originadas de tecidos produtores de células sanguíneas, como a medula óssea, e de células do sistema imunitário, inclui: leucemias e outros transtornos mieloproliferativos, linfomas e mieloma múltiplo. Esse conjunto heterogêneo de doenças é chamado de neoplasias hematológicas malignas (SWERDLOW *et al*, 2008).

As leucemias compõem um grupo heterogêneo de neoplasias que tem como origem células progenitoras da medula óssea e de outros órgãos hematopoiéticos em menor grau. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais (blastos), que substituem as células sanguíneas normais. Podem ser subdivididas de acordo com o tipo de linhagem celular que é afetada, linfoide ou mieloide, e de acordo com a velocidade de progressão da doença, aguda ou crônica. Assim, as leucemias são classificadas como: linfoide aguda; mieloide aguda; linfoide crônica e mieloide crônica (ALMEIDA *et al*, 2005; HAMERSCHLAK, 2008).

As leucemias agudas são doenças progressivas e invasivas caracterizadas por rápida proliferação de células imaturas denominadas blastos. Isso ocorre porque a célula que origina os clones neoplásicos é um precursor cuja mutação causa perda da capacidade maturativa (anaplasia) com conseqüente acúmulo de células jovens na medula óssea e/ou no sangue periférico e com evolução rapidamente fatal em pacientes não tratados, o que pode levar a morte em semanas ou meses. As leucemias crônicas sem tratamento evoluem para uma morte mais lenta em meses ou anos, e caracterizam-se por grande número de células em proliferação, porém com manutenção da capacidade de diferenciação (SILVA *et al.*, 2006; HAMERSCHLAK, 2008).

A primeira ferramenta utilizada para o diagnóstico das leucemias é o hemograma, apesar de que para o diagnóstico definitivo e estadiamento são utilizadas outras técnicas adicionais, tais como: exame de medula óssea, estudos histoquímicos e citogenéticos, imunofenotipagem, biologia celular e exames de imagem. As leucemias agudas, de forma geral, são caracterizadas por pancitopenia e aparecimento de blastos periféricos, chegando a 90% da contagem de leucócitos totais e de proporção maior de 30% de blastos na medula óssea. Na leucemia mieloide crônica ocorre aumento da contagem de granulócitos ($< 50.000/ \text{mm}^3$ para indivíduos assintomáticos e de 200.000 a 1.000.000/ mm^3 para indivíduos sintomáticos). A contagem de plaquetas pode apresentar-se normal ou moderadamente aumentada. E a concentração de hemoglobina é usualmente $> 10 \text{ g/ dL}$. Já na leucemia linfocítica crônica ocorre linfocitose periférica ($> 5000/ \text{mm}^3$) e aumento de linfócitos ($> 30\%$) na medula óssea. Cerca de 10% dos pacientes apresentam anemia moderada, trombocitopenia, ou ambos (RYTTING, 2012).

Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, tais como: tabagismo, radiação, síndrome de Down e outras doenças hereditárias, benzeno (fumaça do cigarro, gasolina e indústria química), algumas classes de drogas utilizadas em quimioterapia, síndrome mielodisplásica e outras desordens sanguíneas (POLYCHRONAKIS *et al*, 2013).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (2011) afirmaram que a leucemia, sem considerar as neoplasias da pele não melanoma, é a 11ª neoplasia mais incidente em homens e a 13ª em mulheres da região Sul do Brasil. E estimaram para 2012, 8510 casos novos da doença na população nacional, desses, 300 no estado de Santa Catarina (SC) e 20 na cidade de Florianópolis.

Outro grupo de neoplasias hematológicas são os linfomas. Esses são originados nos linfonodos, estruturas do sistema imunitário concentradas em diversas regiões do organismo, e são classificados em LH e LNH (HARTGE; DEVESA; FRAUMENI JR., 1994).

Os LNH compreendem uma variedade de doenças, com incidências e manifestações clínicas diferentes, e a maioria está relacionada ao linfócito B (MOUNTER; LENNARD, 1999; HAMERSCHLAK, 2008; FLOWERS; ARMITAGE, 2010). Na maior parte dos casos a etiologia é desconhecida, embora exista associação com a função imunitária alterada. Assim, indivíduos transplantados que

receberam tratamento com imunossuppressores, portadores de doenças autoimunes severas e infectados pelo HIV, HTLV-1, EBV e herpes vírus 8, possuem um maior risco para o desenvolvimento de LNH. A infecção por *Helicobacter Pylori* aumenta o risco de linfoma gástrico. Além disso, alterações em genes envolvidos com a resposta imunitária, exposições ocupacionais e ambientais a substâncias químicas também estão associadas, embora com menor peso, ao desenvolvimento dessas neoplasias (ALEXANDER *et al*, 2007; HJALGRIM, 2012).

A ocorrência dos LNH na população é significativa, sendo que na região Sul, sem considerar as neoplasias de pele não melanoma, é a 10ª neoplasia mais incidente entre os homens e a 12ª entre as mulheres. Além disso, estimativas para a população brasileira apontaram 9640 casos novos de LNH para ambos os sexos em 2012, desses, 290 para o estado de SC e 20 para a cidade de Florianópolis (BRASIL, 2011).

O LH clássico possui características próprias que o distingue de outros tipos de linfomas. Surge quando um linfócito, mais frequentemente, o linfócito B, transforma-se em célula maligna, capaz de crescer descontroladamente e disseminar-se. Neste tipo de neoplasia hematológica, as células malignas, multinucleadas Reed-Sternberg e mononucleares de Hodgkin, constituem o menor componente da neoplasia (1 - 2%), enquanto que a população celular predominante é composta por células inflamatórias, tais como linfócitos, células plasmáticas, histiócitos, neutrófilos, eosinófilos e células estromais (MITELMAN *et al*, 2009).

O sistema imunitário comprometido, infecção pelo HIV e o uso de drogas imunossupressoras são fatores associados ao desenvolvimento dessa neoplasia. Foram previstos 2870 casos novos da doença, entre homens e mulheres, para o ano 2009 no território nacional. E no ano 2010, a doença foi causa de morte para 483 indivíduos de ambos os sexos no Brasil (BRASIL, 2013).

O diagnóstico e estadiamento dos linfomas, de modo geral, envolve a realização de radiografia, tomografias, exames laboratoriais, tais como hemograma, fosfatase alcalina, LDH (lactato desidrogenase), testes de funcionalidade hepática, albumina, cálcio, creatinina, eletrólitos, entre outros. Um achado hematológico importante é que cerca de 30% dos indivíduos com LNH apresentam anemia ao diagnóstico, e eventualmente, pode se desenvolver na maior parte. Além disso, podem ou não apresentar trombocitopenia (PORTLOCK, 2012).

Ainda, entre as neoplasias hematológicas tem-se o mieloma múltiplo, doença causada pela proliferação de um linfócito B clonal

neoplásico, formador de células produtoras de imunoglobulinas anômalas. É caracterizado pelo comprometimento do esqueleto em diversos lugares, podendo se propagar, também, para os linfonodos e localizações extralinfonodais, como a pele. É responsável por 1% de todas as mortes por câncer nos países ocidentais e é a segunda neoplasia hematológica mais comum no mundo, perdendo apenas para os linfomas (SUCRO *et al.*, 2009).

Sua incidência é elevada em negros e adultos de meia idade e é mais prevalente principalmente entre 50 e 60 anos. A sobrevida dos pacientes pode variar de alguns meses até mais de uma década (SUCRO *et al.*, 2009). Existem poucos registros sobre a incidência e aspectos clínicos da doença em grupos étnicos da América Latina. Inclusive, no Brasil, a incidência é desconhecida, uma vez que não são divulgadas junto às estimativas anuais fornecidas pelo INCA (HUNGRIA, 2007).

São desconhecidos os fatores de risco para o desenvolvimento de mieloma múltiplo, entretanto, acredita-se que exista uma combinação entre fatores genéticos e exposição a fatores ambientais, tais como: radiação ionizante; substâncias químicas (solventes) e herbicidas; asbesto e benzeno; infecções virais (herpes vírus 8, HIV, hepatite C) (ALEXANDER *et al.*, 2007).

Indivíduos portadores de mieloma múltiplo podem apresentar aumento de proteínas sanguíneas e urinárias, hipercalcemia, insuficiência renal e anemia, embora, usualmente, apresentem contagem de leucócitos e de plaquetas normais. O diagnóstico e estadiamento envolvem exames de sangue de rotina, eletroforese de proteínas, raios X e exame de medula óssea (BERENSON, 2012).

As principais estratégias no tratamento das neoplasias hematológicas envolvem quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e transplante de células tronco-hematológicas (TCTH). Este pode ser alogênico, quando ocorre a transferência de células da medula óssea de um doador para outra pessoa, ou autólogo que envolve o uso da medula óssea do próprio paciente visando restabelecer a função das células hematopoiéticas após administração de quimioterapia em alta dose. Além desses, podem ser realizados transplante de células progenitoras do sangue periférico e transplante de sangue do cordão umbilical (ALMEIDA *et al.*, 2005; AMOS; GORDON, 1995).

Apesar de ser objetivo primário da quimioterapia e da radioterapia destruir células neoplásicas, preservando as normais, a maioria dos agentes quimioterápicos e grande parte da radioterapia realizada, não atua de forma específica, lesando tanto células malignas

quanto normais, particularmente as células de rápido crescimento, como as gastrointestinais, capilares e as do sistema imunológico. Isso explica a ocorrência de graves efeitos colaterais, tais como mucosite do trato gastrointestinal e maior susceptibilidade a infecções, acarretando em redução da ingestão oral, náusea, vômitos, diarreia, absorção diminuída de nutrientes, e conseqüente comprometimento do estado nutricional (ALMEIDA *et al*, 2005).

Por tal motivo, é necessária a busca de um índice terapêutico favorável, onde os benefícios sejam confrontados com a toxicidade aos tecidos sadios. A impossibilidade de utilização de doses elevadas em vista dos possíveis efeitos colaterais gerados ao indivíduo é, muitas vezes, o ponto limitante na eficácia do tratamento (ALMEIDA *et al*, 2005; HAJJAJI; BOUGNOUX, 2012).

2.2 SISTEMA IMUNTÁRIO

2.2.1 Resposta inflamatória e neoplasias

A ligação entre neoplasia e inflamação é conhecida desde o século XIX, com base em observações de que as neoplasias, geralmente, surgiam em locais de inflamação crônica e que as células inflamatórias estavam, frequentemente, presentes em amostras de biópsias neoplásicas. A partir dessas evidências essa relação tem sido cada vez mais fortalecida (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002; LIN; KARIN, 2007; KEIBEL; SINGH; SHARMA, 2009).

O quadro inflamatório existente nas neoplasias é marcado pela presença de células do sistema imunitário e mediadores inflamatórios (quimiocinas, citocinas e prostaglandinas), remodelação e reparação de tecidos, e angiogênese. As células e mediadores inflamatórios estão presentes no microambiente da maioria, se não, de todas as neoplasias, independente do fator que desencadeou seu desenvolvimento (BALKWILL; MANTOVANI, 2001; COUSSENS; WERB, 2002; BALKWILL, CHARLES; MANTOVANI, 2005; LIN; KARIN, 2007; KEIBEL; SINGH; SHARMA, 2009).

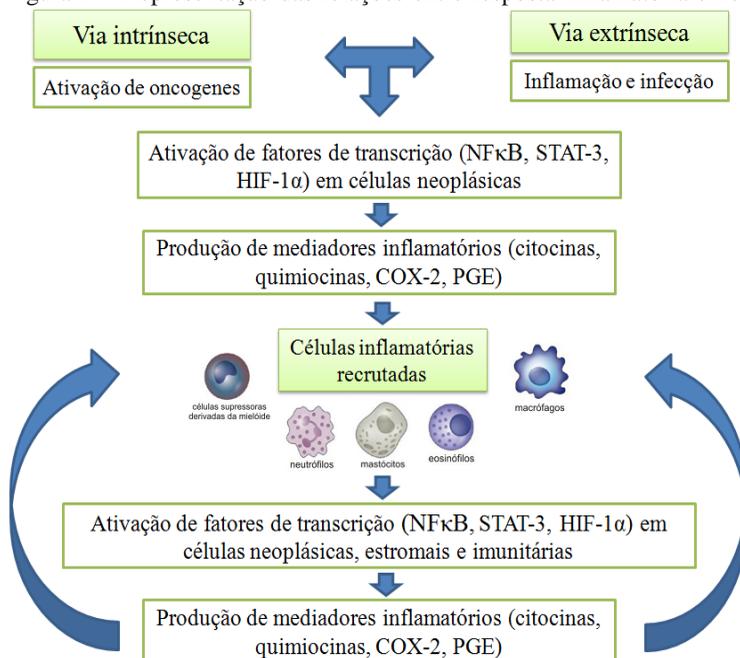
Neoplasias e inflamação são conectadas por duas hipóteses (vias): intrínseca e extrínseca (Fig. 1). A hipótese intrínseca apresenta que eventos genéticos causam a neoplasia, os quais incluem a ativação de vários tipos de oncogenes por mutação, rearranjo ou amplificação

cromossomal, e inativação de genes supressores de células neoplásicas. As células que são transformadas dessa maneira produzem mediadores inflamatórios, gerando, assim, um microambiente inflamatório, onde, anteriormente, não havia condição inflamatória subjacente. Já, na hipótese extrínseca, inflamação e infecção são condições que aumentam o risco de desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias, pois podem promover transformações no comportamento celular (MANTOVANI *et al*, 2008).

As duas hipóteses convergem e aparentemente podem coexistir, resultando na ativação de vias de sinalização intracelulares envolvendo fatores de transcrição, principalmente, fator nuclear- κ B (NF- κ B), STAT-3 e fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) nas células neoplásicas. Esses fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como, a produção de COX-2, que, por sua vez, resulta na produção de prostaglandinas. Esses fatores recrutam e ativam vários leucócitos, mais notavelmente, as células de linhagem mielocítica. As citocinas ativam alguns fatores de transcrição chaves nas células imunitárias, células estromais e neoplásicas, resultando na produção de mais mediadores inflamatórios e um microambiente inflamatório sendo alimentado (JUNG *et al*, 2003; KARIN; GRETEN, 2005; YU; KORTYLEWSKI; PARDOLL, 2007).

Esse latente quadro inflamatório relacionado às neoplasias possui muitos efeitos pró-neoplásicos, tais como: estímulo à sobrevivência e proliferação das células neoplásicas, geração de novos vasos sanguíneos e linfáticos, favorecendo assim, a ocorrência de invasão, migração e metástase. Além disso, contribui para a inibição da resposta imunitária antineoplásica e alteração da resposta do organismo ao tratamento quimioterápico (KARIN; GRETEN, 2005).

Figura 1 – Representação das relações entre resposta inflamatória e neoplasias



COX, ciclooxigenase; PGE, prostaglandina E; NFκB, fator nuclear-κB; STAT-3, transdutor de sinal e ativador de transcrição-3; HIF-1α, fator induzível por hipóxia-1α. Fonte: adaptado de MANTOVANI, 2008.

Concomitantemente, efeitos sobre o estado nutricional, como hipermetabolismo, perda de peso e redução da massa corporal magra, podem ser observados em indivíduos com neoplasias. Esses efeitos podem estar associados à atuação de mediadores inflamatórios, principalmente IL-1, IL-6, TNF e interferon gama (IFN-γ). Tais efeitos podem repercutir negativamente sobre a qualidade de vida, resposta ao tratamento e, conseqüentemente, sobre o prognóstico desses indivíduos (DEWYS *et al.*, 1980; ÁRGILES *et al.*, 2003; WILMORE *et al.*, 2006).

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que desempenha importante papel na iniciação neoplásica por estimular a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS) que podem causar dano ao DNA e levar a mutações genéticas. A IL-6 pode influenciar diretamente o crescimento neoplásico por induzir à proliferação e à sobrevivência de células neoplásicas em mieloma múltiplo, linfoma não Hodgkin e carcinoma hepatocelular. Esta citocina possui atividade

pleiotrópica, podendo atuar sobre o desenvolvimento neoplásico de maneira direta e indireta ao promover condições favoráveis para tal, no microambiente neoplásico (TANNO; MATSUI, 2011). IL-6 juntamente com TGF- β podem induzir as células T CD4 indiferenciadas Th17 e inibir as células Treg induzidas por TGF- β (KIMURA; NAKA; KISHIMOTO, 2011). A IL-17, produzida pelos linfócitos Th17, é responsável pela maioria dos efeitos produzidos por essas células, que tem sido implicada ao desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias (WU *et al*, 2009). Já a IL-10, citocina com atividade anti-inflamatória, é produzida pelos linfócitos T reguladores (Treg), entre outras células imunitárias. Desempenham o papel de reprimir a atividade das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (OUYANG *et al*, 2011).

Em estudo com neoplasia pulmonar, indivíduos apresentaram indicadores inflamatórios (PCR sérica e contagem total de leucócitos) aumentados, os quais foram correlacionados positivamente com a desnutrição (VAN DER MEIJ *et al*, 2010). Read *et al* (2007), em estudo com indivíduos portadores de neoplasia colorretal, observaram que níveis plasmáticos de IL-6 foram positivamente correlacionados com os níveis de PCR séricos e negativamente correlacionados à sobrevida dos indivíduos. De forma contrária, nesse estudo, a concentração de IL-10 plasmática foi positivamente correlacionada com uma maior sobrevivência. Além disso, concentrações plasmáticas de IL-12 foram positivamente correlacionadas com a toxicidade do tratamento. Não foram encontrados trabalhos que avaliassem a atuação de marcadores inflamatórios sobre o estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas.

Em adição ao quadro inflamatório coexistente às neoplasias, que por si só, pode gerar comprometimento nutricional aos indivíduos portadores da doença, tem-se alterações funcionais e metabólicas decorrentes da quimioterapia e/ou radioterapia, que contribuem, ainda mais, para a ocorrência de complicações como má absorção de nutrientes, aumento da demanda energética, estresse, diarreia, vômitos e divisão ou destruição celular, e que repercutem drasticamente sobre o estado nutricional dos indivíduos submetidos a essas terapias (ALMEIDA *et al*, 2005).

Embora, de maneira geral, no início da doença, os indivíduos com neoplasias hematológicas não apresentem comprometimento nutricional pela doença em si, correm alto risco de desenvolverem desnutrição como consequência da intervenção terapêutica, tais como a

quimioterapia e radioterapia. Um dos principais problemas apresentados por indivíduos submetidos a essas formas de tratamento é a mucosite, inflamação da mucosa de revestimento do trato gastrointestinal causada pelos efeitos tóxicos da quimioterapia e radioterapia sobre células de proliferação rápida, como as que compõem a mucosa, que leva à redução da ingestão oral, náusea, vômito, diarreia, absorção diminuída de nutrientes e proliferação de micro-organismos patogênicos (ALMEIDA *et al*, 2005).

Um agravamento importante deste quadro inflamatório é a enterocolite neutropênica. Condição que pode comprometer a parte terminal do íleo, ceco e cólon, e progredir a complicações potencialmente fatais. Esse quadro clínico caracteriza-se pela ocorrência de febre, diarreia, dor abdominal e íleo paralítico (COTTER *et al*, 2008).

2.2.2 Células imunitárias, citocinas e neoplasias

O sistema imunitário consiste num conjunto de células, tecidos e moléculas que medeiam a resistência a agentes externos, tais como: infecções por bactérias, fungos, vírus e parasitas; células ou tecidos enxertados; situações onde órgãos ou tecidos sofreram algum trauma; alergias; e internos, como: células neoplásicas e nas doenças autoimunes (SALMINEN *et al*, 2008; ALLEN *et al*, 2011).

Diante disso, existem mecanismos distintos, mas que atuam em conjunto e de forma coordenada na construção da resposta imunitária. Esses mecanismos de defesa são classificados como imunidade inata, responsável pela proteção inicial do organismo, e imunidade adquirida que se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa mais tardia e mais eficaz. Esse tipo de resposta é mediado por linfócitos, células que são capazes de reconhecer antígenos e de executar uma resposta efetora altamente específica e durável (AHMED; GRAY, 1996; ALLEN *et al*, 2011).

Essas células são nomeadas de acordo com o seu local de maturação e/ou função. Os linfócitos T ou timo dependentes, por serem maturados nesse órgão, são divididos em: T CD4⁺, pois expressam em sua superfície a molécula CD4. Além disso, são conhecidos como T helpers (Th) ou auxiliares por interferirem na função efetora de outras células imunitárias, principalmente pela produção de citocinas; e os T CD8⁺ ou T citotóxicos, que expressam o marcador extracelular CD8 e causam a destruição de células infectadas ou anormais, constituindo,

assim, o principal mecanismo de defesa antineoplásica. Existem também os linfócitos B que são produzidos e maturados na medula óssea e responsáveis pela produção de anticorpos. (ZHU; PAUL, 2008; ALLEN *et al*, 2011).

As células T CD4⁺ são reguladoras essenciais da resposta imunitária antineoplásica, direcionando a diferenciação de outras células imunitárias em resposta à variedade de antígenos neoplásicos e outros fatores liberados por essas células. São classificadas em várias categorias, entre elas: Th1, Th2, Treg e, mais recentemente, Th17. Os Th17 têm sido envolvidos no desenvolvimento de doenças inflamatórias, além de seu papel discutido nas neoplasias, podendo exercer atividade pró ou antineoplásica. Muitos dos efeitos mediados por essa célula são atribuídos a IL-17A por ela produzida. A diferenciação desse fenótipo celular é mediada pela ação de citocinas, como IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), e atividade de fatores de transcrição, como STAT-3 e ROR- γ t (PARK *et al*, 2005; ZHU; PAUL, 2008; PECK; MELLINS, 2009; KORN *et al*, 2009; MURUGAIYAN; SAHA, 2009; WU *et al*, 2009).

Th17 são gradualmente aumentadas no ambiente neoplásico durante o desenvolvimento da doença. Em indivíduos com leucemia mieloide aguda, essas células se encontraram em proporção quatro vezes maior no sangue periférico de indivíduos doentes não tratados comparados aos controles saudáveis. Após tratamento com completa remissão da doença, a proporção dessas células foi significativamente reduzida (WU *et al*, 2009). Entretanto, também foi demonstrado que a proporção desse fenótipo celular no sangue periférico não apresentou alteração nos indivíduos com leucemia mieloide aguda antes do tratamento, durante a severa citopenia induzida pela quimioterapia e durante a fase de reconstituição. Esses dados foram semelhantes aos encontrados em indivíduos saudáveis (ERSVAER *et al*, 2010).

Atualmente, discute-se o papel que essas células podem exercer em condições neoplásicas. Elas parecem induzir produção de uma ampla variedade de fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promove a angiogênese inflamatória e neoplásica, favorecendo assim, o crescimento neoplásico. Porém, esse efeito parece ter uma maior relevância nas neoplasias sólidas (NUMASAKI *et al*, 2003; NUMASAKI; LOTZE; SASAKI, 2004; TAKARASHI *et al*, 2005). Inversamente, em estudo com neoplasia pulmonar em ratos, células Th17 provocaram um quadro inflamatório protetor pelo recrutamento de células dendríticas, granulócitos e

linfócitos T CD4 e CD8 efetoras (MARTIN-OROZCO *et al*, 2009). E em indivíduos com leucemia linfocítica crônica, uma maior proporção de Th17 esteve relacionada a um melhor prognóstico (JAIN *et al*, 2011; NIARAGH *et al*, 2013). Diante disso, a IL-17 parece ser uma citocina pleiotrópica, com possíveis ações pró e antineoplásicas, dependendo da imunogenicidade da neoplasia (BENCHETRIT *et al*, 2002).

Adicionalmente, é conhecido o fenômeno de plasticidade que ocorre entre os linfócitos Th17 e os outros subtipos de linfócitos T. Tais alterações podem ocorrer em resposta às condições do ambiente neoplásico, tais como padrão de citocinas secretadas, presença de hipóxia, entre outros fatores, que podem levar à reprogramação da expressão de genes. Esse fenômeno pode dar origem a células em estágio intermediário de diferenciação que podem ter implicações biológicas importantes, tais como a inicialização de células neoplásicas (SUNDRUD *et al*, 2003; WEI *et al*, 2009; JAIN *et al*, 2011; YANG *et al*, 2011).

No quadro 1 são apresentados estudos que relacionam os fenótipos de células imunitárias supra citados, sua frequência e relevância clínica, bem como as citocinas relacionadas com a diferenciação e/ou atividade desses fenótipos celulares, em diferentes situações neoplásicas, dentre elas, neoplasias hematológicas malignas.

Quadro 1 – Estudos clínicos relacionados à avaliação de fenótipos de células imunitárias, citocinas e neoplasias malignas.

Autor	Características	Objetivos	Resultados principais
Yang <i>et al</i> , EUA, 2009	Estudo clínico com amostras de 43 indivíduos com LNH de células B. Amostras de linfonodos e tonsilas hiperplásicas e de SP de indivíduos saudáveis foram usadas como controle.	Explorar a relação das células Treg e Th17 no desenvolvimento do LNH células B, e os possíveis mecanismos envolvidos nesse processo.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓ Th17 de 3 a 12 vezes nas amostras de indivíduos com LNH em relação às controles. ▪ Th17 e Treg foram reciprocamente regulados no ambiente neoplásico, por diversos fatores (citocinas). ▪ Importante papel das células neoplásicas no balanço entre Th17 e Treg → super-regulação de Treg e inibição de Th17.
Wu <i>et al</i> , China, 2009	Estudo clínico controlado com 42 indivíduos com LMA (27 com completa remissão e 15 sem remissão completa após 2 ciclos de QT) + 36 controles saudáveis	Avaliar a proporção de Th17 (CD3 ⁺ CD8 ⁻ IL-17 ⁺) e a concentração de citocinas (IL-17, IL-6 e TGF-β ₁) em pacientes com LMA e seu envolvimento na patogênese da LMA.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑ Th17 (4x), IL-17 (1,8x), TGFβ₁ (4x) e IL-6 (11x) no SP de indivíduos com LMA não tratada em relação aos controles. ▪ Correlação positiva entre IL-6 e proporções de Th17; ▪ ↓ Th17 (2x) após remissão completa.

CD, agrupamento de diferenciação; IL, interleucina; LMA, leucemia mieloide aguda; LNH, linfoma não Hodgkin; QT, quimioterapia; SP, sangue periférico; TGFβ, Fator de crescimento e transformação beta; Th, linfócito T *helper*; Treg, linfócito T regulador.

Quadro 1 – Estudos clínicos relacionados à avaliação de fenótipos de células imunitárias, citocinas e neoplasias malignas (continuação).

Autor	Características	Objetivos	Resultados principais
Ersvaer <i>et al.</i> , Noruega, 2010	Estudo clínico, controlado, incluindo 16 indivíduos com diagnóstico recente de LMA não tratada + 20 indivíduos recebendo QT + 30 controles saudáveis.	Comparar a distribuição dos subtipos de células T, Tc1 IFN γ^+ , Th1, Th17 (CD3 $^+$ CD8 $^-$ IL-17 $^+$) e Treg, em pacientes com LMA antes, durante e pós-QT.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↓Tc e Th1 (2x) circulantes durante a QT em relação aos saudáveis. ▪ % Th17 no SP manteve-se em todas as fases de tratamento. ▪ ↑Treg durante (3x) e após a QT (2x) em comparação a antes do tratamento.
Maruyama <i>et al.</i> , Japão, 2010	Estudo clínico, com 55 indivíduos com neoplasia gástrica maligna (27 com doença inicial e 28 com doença avançada). Linfonodos foram classificados como: N1 (adjacente à neoplasia) e N2 (marginalmente distante da neoplasia). Linfonodos mesentéricos foram utilizados como controle.	Investigar a proporção de Th17 e Treg dentre os linfócitos presentes no infiltrado neoplásico, linfonodos regionais e CMSP de indivíduos com neoplasia gástrica maligna.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑ Th17 no tecido de indivíduos com doença inicial (5x) e avançada (4x) em relação aos saudáveis. ▪ ↑Th17 (1,5x) no tecido de indivíduos com doença inicial em relação aos com avançada. ▪ ↓Th17 (2x) no SP de indivíduos com doença avançada (x saudáveis). ▪ Th17/Treg foi marcadamente aumentada na doença inicial. ▪ ↓Th17 e ↑Treg no microambiente neoplásico com a progressão da doença.

CD, agrupamento de diferenciação; CMSP, células mononucleares do sangue periférico; IFN γ , interferon gama; IL, interleucina; LMA, leucemia mieloide aguda; QT, quimioterapia; SP, sangue periférico; Tc, linfócito T citotóxico; Th, linfócito T *helper*; Treg, linfócito T regulador.

Quadro 1 – Estudos clínicos relacionados à avaliação de fenótipos de células imunitárias, citocinas e neoplasias malignas (continuação).

Autor	Características	Objetivos	Resultados principais
Jain <i>et al.</i> , EUA, 2011	Estudo clínico controlado, envolvendo 66 indivíduos com LLC e 15 voluntários saudáveis.	Quantificar a %Th17 e de outras células IL-17 ⁺ sanguínea e tecidual de indivíduos com LLC e correlacionar com o desfecho clínico.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑Th17 no SP (4x) e no baço (5x) de indivíduos com LLC em relação aos saudáveis. ▪ Indivíduos com maiores %Th17 circulantes → melhores marcadores de prognóstico e tempo de sobrevida.
Yang <i>et al.</i> , China, 2011	Estudo clínico controlado, envolvendo 12 indivíduos submetidos à cirurgia por neoplasia colorretal maligna. Amostras de tecido intestinal de 3 indivíduos saudáveis foram utilizadas como controle.	Elucidar o papel das células T Foxp3 ⁺ IL-17 ⁺ na patogênese da neoplasia colorretal maligna.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ ↑linfócitos T Foxp3⁺IL-17⁺, Foxp3⁺IL-17⁺ e Foxp3⁺IL-17⁻ (4, 5 e 2x, respectivamente) no tecido neoplásico em relação aos normais. ▪ Linfócitos T Foxp3⁺IL-17⁻ expressaram altos níveis de TGF-β, RORγ_t e quimiocinas → efeito quimiotático sobre linfócitos Tregs Foxp3⁺. ▪ Hipóxia induziu a expressão de IL-17 pelos linfócitos Tregs Foxp3⁺. ▪ Linfócitos T Foxp3⁺IL-17⁻ induziram a iniciação de células neoplásicas.

CD, agrupamento de diferenciação; IL, interleucina; LLC, leucemia linfocítica crônica; RORγ_t, Receptor órfão relacionado ao retinol gama t; SP, sangue periférico; TGFβ, Fator de crescimento e transformação beta; Tc, linfócito T citotóxico; Th, linfócito T *helper*; Treg, linfócito T regulador.

Quadro 1 – Estudos clínicos relacionados à avaliação de fenótipos de células imunitárias, citocinas e neoplasias malignas (continuação).

Autor	Características	Objetivos	Resultados principais
Niaragh <i>et al.</i> , 2013	Estudo clínico, controlado, envolvendo 40 indivíduos com LLC distribuídos nos grupos: progressivo (20); indolente (20); IGHV mutado (24); não mutado (16). 15 indivíduos saudáveis formaram o grupo controle.	Avaliar as proporções periféricas dos subtipos de células Th17, Tc17 e Treg CD39 ⁺ e seus papéis na imunopatogênese e prognóstico da LLC.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Expressiva ↓Th17 e Tc17 no SP do grupo progressivo em relação aos grupos indolente (1,6x) e saudável (1,8x). ▪ ↓ células IL-17⁺ foi associado ao ↑Treg CD39⁺. ▪ Resultados sugerem que a progressão da LLC está associada à ↓ células de IL-17⁺ e ↑Treg.

CD, agrupamento de diferenciação; IGHV, imunoglobulina variável de cadeia pesada; IL, interleucina; LLC, leucemia linfocítica crônica; SP, sangue periférico; Tc, linfócito T citotóxico; Th, linfócito T helper; Treg, linfócito T regulador.

3 POPULAÇÃO E MÉTODOS

3.1 POPULAÇÃO

A população foi constituída por indivíduos atendidos pelo serviço de onco-hematologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Florianópolis – SC. A amostragem foi por conveniência e saturação temporal (de novembro/2012 a abril/2013).

O atendimento da onco-hematologia do HU abrange os setores de emergência, ambulatório de hematologia e internação do HU (Clínica Médica II).

Critérios de inclusão: possuir idade ≥ 16 anos; apresentar diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas; estar apto a iniciar tratamento quimioterápico; não estar impossibilitado de se alimentar oralmente.

Critérios de exclusão: ter idade < 16 anos, estar em tratamento paliativo; estar em tratamento com estatinas e/ou algum fármaco anti-inflamatório; possuir diagnóstico de doença infectocontagiosa e estar em período gestacional.

A equipe médica teve conhecimento dos critérios de inclusão supramencionados e auxiliou na triagem dos candidatos a participar do estudo. Os indivíduos aptos foram encaminhados às nutricionistas responsáveis pela pesquisa, que os apresentaram a proposta de pesquisa e efetuaram o convite de participação.

3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (120.066 de 08/10/2012) (Apêndice A).

Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B) conforme com a Declaração de Helsinki (2008) e cada participante recebeu uma cópia desse termo.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este estudo é caracterizado como descritivo, de corte transversal, conduzido com indivíduos portadores de neoplasias hematológicas malignas com diagnóstico recente, anteriormente ao tratamento quimioterápico.

3.4 INSTRUMENTO E TÉCNICAS DE COLETA DE DADOS

3.4.1 Caracterização dos indivíduos

Os indivíduos da amostra foram identificados por cadastro previamente elaborado para a pesquisa (Apêndice B), contemplando as seguintes informações:

- Dados clínicos: tipo de neoplasia hematológica, estadiamento, fármacos utilizados, protocolo quimioterápico, comorbidades associadas e doenças prévias;
- Hábitos de vida: consumo de bebida alcoólica, uso de tabaco e prática de atividade física;

3.4.2 Avaliação do estado nutricional

Foram mensuradas as medidas de peso, altura, circunferência do braço (CB) e dobra cutânea tricipital (DCT) conforme a *World Health Organization* (WHO) (1995). O peso atual foi aferido em balança eletrônica de plataforma com capacidade máxima de 150 kg e escala de 100 g, da marca Toledo® (Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A estatura foi aferida com régua antropométrica, acoplada à balança citada anteriormente, com capacidade de aferição máxima de 2 m e escala de 1 mm. Os indivíduos foram avaliados descalços e com o mínimo de roupa. O peso usual foi referido pelo participante ou responsável.

A CB foi mensurada em duplicata de forma não sequencial e foi calculada a média aritmética dos valores encontrados. A DCT foi aferida em triplicata de forma intercalada e foi utilizada a mediana dos resultados. Essas medidas foram realizadas com auxílio de fita métrica

inelástica TBW[®] (São Paulo, SP, Brasil) e adipômetro Lange Skinfold Caliper[®] (Beta Technology Incorporated, Santa Cruz, Califórnia, EUA), respectivamente, ambos com precisão de 1 mm. O valor da circunferência muscular do braço (CMB) foi obtido da diferença entre o valor da CB e o valor da DCT após ser dividida por dez e multiplicada pelo valor de π (3,14) (MONEGO *et al.*, 2003).

Para a avaliação do estado nutricional foi utilizado o Índice de Massa Corporal (IMC) que representa a razão entre peso e altura ao quadrado (WHO, 1995). O resultado foi apresentado em kg/m² e classificado a partir dos pontos de corte estabelecidos para cada faixa etária (ONIS *et al.*, 2007; BRASIL, 2007; WHO, 2008).

Os valores de CMB foram comparados com os valores esperados para o percentil 50^o, segundo sexo e idade dos indivíduos, apresentados por Frisancho (1981; 1990).

A variação do peso relacionada ao período prévio ao estudo foi avaliada a partir do cálculo de percentual de perda de peso, que resulta da divisão entre ΔP (diferença entre o peso usual e o peso atual) e o peso inicial, multiplicado por 100, para ser expresso em percentual. Sua classificação foi confrontada com o tempo de ocorrência, segundo valores propostos por Blackburn *et al.* (1977). Para tal, os indivíduos foram questionados quando a ocorrência de variações no peso corporal, e em caso positivo, foram questionados quanto ao período de tempo de ocorrência.

3.4.3 Coleta de sangue

O procedimento de coleta foi realizado por profissionais capacitados do setor de análises clínicas, seguindo o protocolo do HU/UFSC. Os indivíduos em atendimento ambulatorial compareceram ao laboratório do HU/UFSC, pela manhã, das 7h30 às 9h30, preferencialmente descansados, em jejum de 8 a 12 horas. Quando internados a coleta ocorreu nas clínicas de internação por volta das 7h30, em conjunto com a coleta destinada aos exames de rotina. Foi solicitado aos pacientes permanecerem em jejum de 8 a 12 horas. Quando atendidos no setor de emergência a coleta foi realizada neste mesmo setor.

A amostra sanguínea foi coletada em dois tubos heparinizados (Sistema Vacutainer[®] BD Biosciences - Abingdon, RU) com capacidade de 10 mL cada e em um tubo de 5 mL (Sistema Vacutainer[®] BD

Biosciences - Abingdon, RU) com ativador de coágulo e gel separador para as dosagens de PCR e albumina.

Após a coleta, cada amostra foi transportada à temperatura ambiente até o laboratório de pesquisa (Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas/ UFSC - <http://lidoc.ccb.ufsc.br/>) onde, imediatamente, foi iniciado o processamento das mesmas.

3.4.4 Avaliação da proporção de linfócitos T CD4, Th17 e CD8

Alíquota de 1 mL de sangue total foi adicionada em um tubo Falcon[®] (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) de 15 mL, contendo 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 a 37°C na presença, ou não, de PMA (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich, São Luis, MO, EUA), Ionomicina (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, São Luis, MO, EUA) e Monensina (2 mM) (BD GolgiStop[™] Protein Transport Inhibitor, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubada em banho-maria por 4 horas, a 37° C. Após o período de incubação, o sangue diluído foi transferido para tubos de citometria de fluxo e incubado por 15 minutos com solução hemolítica (BD Pharm Lyse[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA) em volume dez vezes superior ao volume de sangue diluído. Após esse procedimento, o material foi centrifugado para retirada da solução hemolítica e lavado duas vezes com tampão de marcação (BD Pharmigen[™] Stain Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (DURAMAD *et al*, 2004).

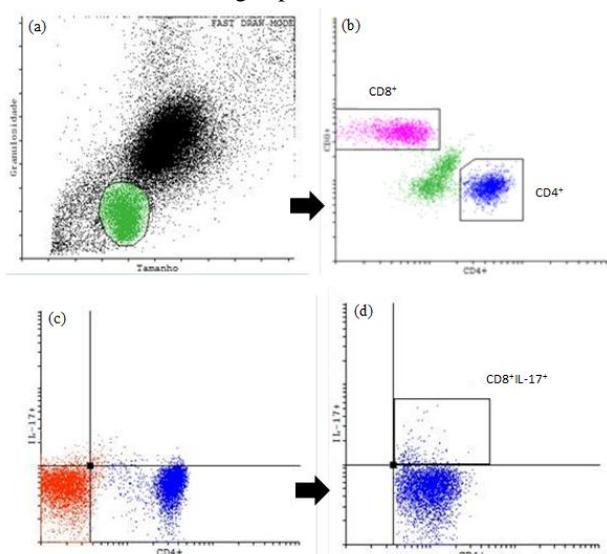
Todas as amostras foram fixadas com tampão de fixação (BD Cytotfix[™] Fixation Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Uma vez fixadas, as células foram permeabilizadas usando tampão de permeabilização Perm Wash C (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a marcação, as células foram incubadas por 40 minutos com 20 µL de *cocktail* de anticorpos ligados a fluoróforos específicos: anti-CD4 (PerCP-Cy5.5), anti-IL17A (PE) (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit, BD Pharmigen[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para a obtenção da proporção de linfócitos T CD4 e CD8, as células não estimuladas foram incubadas com 10 µL de cada anticorpo isolado (anti-CD4 e anti-CD8) ligados aos fluoróforos PE e FITC, respectivamente

(PE Mouse Anti-Human CD4, BD Pharmigen™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (FITC Mouse Anti-Human CD8, BD Pharmigen™, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os controles negativos foram incubados com anticorpos monoclonais não reativos ligados aos fluoróforos PerCP-Cy5.5, PE e FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em tampão de marcação (BD Pharmigen™ Stain Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e adquiridas em citômetro de fluxo FACScantoII e software BD FACSDiva versão 6.1.3. Foram adquiridas 10.000 células e posteriormente foram analisadas usando o software Cyflogic versão 1.2.1. A proporção de linfócitos IL-17A⁺ foram expressos como percentual dos linfócitos CD4⁺ totais. Os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foram expressos como percentual das células com características morfológicas (tamanho e granulidade) de linfócitos (DURAMAD *et al*, 2004).

Na figura 2 são apresentados gráficos de citometria de fluxo, que apresentam o modelo de análise das proporções de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺IL17⁺ do sangue periférico.

Fig. 2. Gráficos citometria de fluxo representativos das proporções de linfócitos CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺IL17⁺ do sangue periférico.



(a) células com características morfológicas de linfócitos; (b) células CD4⁺ e CD8⁺ do total de linfócitos; (c) células não estimuladas; (d) células CD4⁺IL-17⁺ estimuladas e marcadas com os anticorpos anti-CD4 e anti-IL-17.

3.4.5 Avaliação de citocinas plasmáticas IL-6, IL-10, IL-17A e TNF

O sangue total foi centrifugado para separação da fração de plasma. Alíquotas do plasma foram, então, congeladas em freezer -80 °C. No momento do ensaio, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e imediatamente usadas para análise das concentrações de IL-6, IL-10, IL-17A e TNF por citometria de fluxo com sistema comercial para mensuração de citocinas (ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA) (Human Th1/Th2/Th17 cytokine kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), contendo mistura de anticorpos conjugados ao fluoróforo *phycoerythrin* (PE) (anti-IL-2; anti-IL-4; anti-IL-6; anti-IL-10; anti-TNF, anti-IFN γ e anti-IL-17A) (Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) que proporciona um sinal de fluorescência em proporção à quantidade de analito ligado. O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante.

A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II através do software FACSDiva versão 6.1.3. Curvas padrões para cada citocina foram plotadas e as concentrações de cada amostra teste foram calculadas usando o software FCAP array v.3.0 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados foram expressos em pg/mL (CHEN *et al.*, 1999).

3.4.6 Determinação da concentração de PCR e albumina e do hemograma

Após a coleta, o sangue, destinado à dosagem de PCR e albumina e a determinação do hemograma, foi processado no Serviço de Análises Clínicas do HU. A PCR foi determinada pelo método de imunonefelometria (Siemens Dade Behring Inc., 55, Newark, DE, EUA) (LEDUE *et al.*, 1998), e a albumina, pelo método colorimétrico automatizado (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, EUA) empregando-se púrpura de bromocresol como reagente de cor (LASKY *et al.*, 1985). Para a obtenção do hemograma foi utilizado o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Inc. Kobe, Japan).

3.5 TRATAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram registrados e organizados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) Todas as informações foram digitadas em dupla entrada para posterior verificação das inconsistências mediante o programa EPIDATA[®] (EpiData Association, Atlanta, GA, EUA). Após, o banco de dados foi transformado mediante o software STAT-TRANSFER[®] (Circle Systems, Seattle, WA, EUA), para posterior análise estatística no programa estatístico STATA[®] versão 11.0 para Windows (StataCorp, College Station, TX, EUA).

As variáveis quantitativas foram tratadas como mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram descritas considerando as frequências absolutas e relativas de cada categoria das variáveis correspondentes.

Para análise entre grupos (leucemias e linfomas) foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e para testar associação entre as variáveis foram utilizadas as correlações de Spearmann. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

No quadro 1 são apresentadas as variáveis, seus respectivos indicadores, bem como sua classificação teórica.

Quadro 2 – Variáveis, suas características e indicadores.

Variável	Indicadores	Classificação teórica
Sexo	Masculino Feminino	Independente, qualitativa nominal, dicotômica
Idade	Anos	Independente, quantitativa, discreta
Tipo da doença	Neoplasias hematológicas malignas	Independente, qualitativa nominal
Estadiamento da doença	Alto risco Risco intermediário Baixo risco	Independente, qualitativa ordinal, politômica
Peso	kg	Independente, quantitativa, contínua

Altura	m	Independente, quantitativa, contínua
IMC	kg/m ²	Independente, quantitativa, contínua
CMB	%	Independente, quantitativa, contínua
T CD4 Th17 T CD8	%	Independente, quantitativa, contínua
IL-6 IL-10 IL-17A TNF	pg/mL	Independente, quantitativa, contínua
% de perda de peso	Perda intensa Perda moderada Sem alteração Ganho de peso	Independente, qualitativa ordinal, politômica
Albumina	g/ dL	Independente, quantitativa, contínua
PCR	mg/ dL	Independente, quantitativa, contínua
Hemácias	milhões/ mm ³	Independente, quantitativa, contínua
Hemoglobina	g/ dL	Independente, quantitativa, contínua
Hematócrito	%	Independente, quantitativa, contínua
Leucócitos totais	mm ³	Independente, quantitativa, contínua
Contagem de plaquetas	mm ³	Independente, quantitativa, contínua

Fonte: os autores

4 ARTIGO ORIGINAL

Indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas apresentam modificações da proporção de linfócitos T e concentrações de IL-6 sem comprometimento do estado nutricional

Paula Fernanda de Oliveira¹; Dayanne da Silva Borges Betiati¹; Carolina de Quadros Camargo¹; Thayz Rodrigues Chagas¹; Joanita Ângela Gonzaga Del Moral⁴; Giovanna Steffenello Durigon⁴; Patrick Barcelos Gaspareto⁵ Erasmo Benício Santos de Moraes Trindade^{1,2}; Everson Araújo Nunes^{1,3}

¹Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

⁴Serviço de Hematologia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

⁵Serviço de Farmácia da Unidade de Quimioterapia, Hospital Universitário, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil

RESUMO

Neoplasias hematológicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças, entre elas, destacam-se as leucemias, os linfomas e o mieloma múltiplo. Reconhecidamente, o componente inflamatório é um fator inerente às neoplasias. Deste processo participam células imunitárias e mediadores inflamatórios que podem repercutir sobre o estado nutricional dos indivíduos acometidos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as proporções de linfócitos T CD4⁺, T CD4⁺IL-17⁺ e T CD8⁺, concentrações de citocinas plasmáticas (interleucina(IL)-6, IL-10, IL-17 e fator de necrose tumoral (TNF)), e suas relações com o estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas. Este é um estudo descritivo, envolvendo dezesseis indivíduos de ambos os sexos com diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas foram incluídos no estudo. Para avaliar as proporções das populações

linfocitárias, amostras de sangue foram incubadas por 4h em meio de cultura na presença ou não de estimuladores. Posteriormente, as células foram fixadas, permeabilizadas e marcadas com anticorpos (anti-CD4, anti-IL-17A e anti-CD8) ligados a fluoróforos específicos, e adquiridas por citometria de fluxo. As concentrações de citocinas foram determinadas por citometria de fluxo. O estado nutricional foi avaliado pelos parâmetros: índice de massa corporal (IMC), circunferência muscular do braço (CMB) e percentual de perda de peso. A proporção de linfócitos T CD4+, T CD4⁺IL-17⁺ e T CD8⁺ encontradas foram, respectivamente, 30,2% (16,8; 39,6), 2,5% (2,1; 10,8) e 19,5% (8,2; 25,5) e a razão CD4⁺:CD8⁺ foi 1,5 (1,0; 3,5). Em análise por diagnóstico observou-se que os indivíduos com linfoma apresentaram maior proporção de linfócitos T CD8⁺ (p=0,024) e uma menor razão CD4⁺:CD8⁺ (p=0,006) em relação às leucemias. A proporção de células T CD4⁺IL-17⁺ foram correlacionadas negativamente com a razão CD4:CD8 e positivamente com a CMB. A concentração de IL-6 encontrada foi aproximadamente 4 vezes superior aos valores descritos na literatura para indivíduos normais. Os indivíduos participantes não apresentaram comprometimento nutricional, com base nos parâmetros antropométricos. A partir dos resultados foi possível constatar que os indivíduos com neoplasias hematológicas em fase inicial não apresentam comprometimento nutricional, considerando a avaliação antropométrica, embora apresentem um quadro inflamatório pronunciado pela elevação de marcadores inflamatórios. Os indivíduos com linfomas mantiveram melhor a proporção de linfócitos T CD8 em relação às leucemias, e a possível relação positiva entre as células Th17, T CD8 e CMB, soma evidências de que essas células podem desempenhar um papel importante na imunidade antineoplásica e prognóstico.

Palavras-chave: Neoplasias hematológicas. Linfócitos T. Citocinas. Estado nutricional.

ABSTRACT

Hematological neoplasms comprise a heterogeneous group of diseases, among them are the leukemias, lymphomas and multiple myeloma. Admittedly, the inflammatory component is a factor inherent to neoplasms. In this process, there is the participation of immune cells and the inflammatory mediators produced by them, which can, among other functions, modify the nutritional status of the affected individuals. The

aim of this study was to evaluate the proportions of CD4⁺, CD4⁺IL-17⁺ and CD8⁺ T cells, plasma cytokine concentrations (interleukin (IL)-6, IL-10, IL-17 and tumor necrosis factor (TNF)), and their relationship to the nutritional status of patients with hematological neoplasms. This is a descriptive study involving sixteen individuals of both sexes diagnosed with hematological neoplasms were included in the study. To assess the proportions of lymphocyte populations, blood samples were incubated for 4h in culture medium in the presence or not of stimulators. Subsequently, the cells were fixed, permeabilized and stained with antibodies specific fluorophores linked to (anti-CD4, anti-IL-17A and anti-CD8) and acquired by flow cytometry. Concentrations of cytokines were determined by flow cytometry. Nutritional status was assessed by parameters: body mass index (BMI), arm muscle circumference (AMC) and percentage of weight loss. The proportion of CD4⁺ T cells, CD4⁺IL-17⁺ and CD8⁺ T cells were, respectively, 30.2% (16.8, 39.6), 2.5% (2.1, 10.8), and 19.5% (8.2, 25.5) and the CD4⁺:CD8⁺ was 1.5 (1.0, 3.5). In diagnostic analysis showed that individuals with lymphoma had a higher proportion of CD8⁺ T lymphocytes ($p = 0.024$) and reduced the CD4⁺:CD8⁺ ratio ($p = 0.006$) compared to leukemias. The proportion of CD4⁺IL-17⁺ was negatively correlated with the CD4:CD8 ratio and positively with the AMC. The concentration of IL-6 found was approximately 4 times higher than the values reported in the literature for normal subjects. The individuals involved had no nutritional impairment. Based on the results, it was established that individuals with hematologic neoplasms, in early stage, have no nutritional impairment, based in antropometric evaluation, although showed a pronounced elevation in inflammatory markers. Individuals with lymphomas presented a higher proportion of CD8⁺ T lymphocytes compared to leukemias and a potential positive relationship between Th17 cells, CD8 and CMB. Such data increase evidences that these cells may play an important role in antineoplastic immunity and prognosis.

Keywords: Hematological neoplasms. T cells. Cytokines. Nutritional status.

INTRODUÇÃO

As neoplasias hematológicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças. Entre elas, destacam-se as leucemias, os linfomas e o mieloma múltiplo (ALMEIDA *et al.*, 2005). As leucemias são doenças malignas das células progenitoras da medula óssea e de

outros órgãos hematopoiéticos. Podem ser subdivididas de acordo com o tipo de linhagem celular que é afetada, linfoide ou mieloide, e de acordo com a velocidade de progressão da doença, aguda ou crônica (ALMEIDA *et al.*, 2005; HAMERSCHLAK, 2008). Os linfomas são originados nos linfonodos, estruturas do sistema imunitário concentradas em diversas regiões do organismo, e são classificados em dois tipos: Hodgkin (LH) e não Hodgkin (LNH). (MOUNTER; LENNARD, 1999; 2005; FLOWERS; ARMITAGE, 2010). Ainda, o mieloma múltiplo, é causado pela proliferação de um linfócito B clonal neoplásico, formador de células produtoras de imunoglobulinas anômalas. É caracterizado pelo comprometimento do esqueleto em diversos lugares, podendo se propagar, também, para os linfonodos e localizações extralinfonodais, como a pele (SUCRO *et al.*, 2009).

Reconhecidamente, o componente inflamatório é um fator inerente às neoplasias. Deste processo participam células imunitárias e mediadores inflamatórios por elas produzidos. Entre elas estão os linfócitos T CD4⁺, reguladores essenciais da resposta imunitária antineoplásica, que direcionam a diferenciação de outras células imunitárias em resposta à variedade de antígenos neoplásicos e outros fatores liberados por essas células; e os linfócitos T CD8⁺ ou T citotóxicos, que causam a destruição de células infectadas ou anormais, constituindo, assim, o principal mecanismo de defesa antineoplásica (ZHU; PAUL, 2008; ALLEN *et al.*, 2011).

Dentre os linfócitos T CD4⁺, destacam-se os T helper 17 (Th 17). Estas células têm sido envolvidas no desenvolvimento de doenças inflamatórias e seu papel é discutido nas neoplasias. Muitos dos efeitos mediados por essa célula são atribuídos a IL-17A por ela produzida. A diferenciação desse fenótipo celular é mediada pela ação de citocinas, como IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- β (*Transforming Growth Factor β*), e atividade de fatores de transcrição, como STAT-3 e ROR- γ t (PARK *et al.*, 2005; PECK; MELLINS, 2009; KORN *et al.*, 2009; MURUGAIYAN; SAHA, 2009; WU *et al.*, 2009).

No âmbito das neoplasias, os linfócitos Th17 podem exercer atividade pró ou antineoplásica. Elas parecem induzir produção de uma ampla variedade de fatores angiogênicos, incluindo o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que promove a angiogênese inflamatória e neoplásica, favorecendo assim, o crescimento neoplásico. Porém, esse efeito parece ter maior relevância nas neoplasias sólidas (NUMASAKI *et al.*, 2003; NUMASAKI; LOTZE; SASAKI, 2004; TAKARASHI *et al.*, 2005). Inversamente, em estudo com neoplasia

pulmonar em ratos, células Th17 provocaram um quadro inflamatório protetor pelo recrutamento de células dendríticas, granulócitos e linfócitos T CD4 e CD8 efetoras (MARTIN-OROZCO *et al.*, 2009). E em indivíduos com leucemia linfocítica crônica, uma maior proporção de Th17 esteve relacionada a um melhor prognóstico (JAIN *et al.*, 2011; NIARAGH *et al.*, 2013).

As citocinas são substâncias produzidas por células imunitárias que atuam sobre aspectos específicos da inflamação, retroalimentando o processo inflamatório. Citocinas pró-inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina(IL)-6 podem desempenhar importantes papéis na iniciação, proliferação e sobrevivência de células neoplásicas (TANNO; MATSUI, 2011; KIMURA; NAKA; KISHIMOTO, 2011). Além delas, a IL-17 tem sido implicada no desenvolvimento de doenças autoimunes e inflamatórias (WU *et al.*, 2009). Por outro lado, a IL-10, citocina com atividade anti-inflamatória, desempenha o papel de reprimir a atividade das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (OUYANG *et al.*, 2011). A atuação desses mediadores, especialmente TNF, IL-6 e IL-1 β , pode repercutir negativamente sobre o estado nutricional dos indivíduos, podendo levar ao hipermetabolismo, à perda de peso e à redução da massa corporal magra, e afetar a qualidade de vida e a resposta ao tratamento e, conseqüentemente, o prognóstico desses indivíduos (DEWYS *et al.*, 1980; ÁRGILES *et al.*, 2003; WILMORE *et al.*, 2006).

Embora, inicialmente, a condição nutricional (parâmetros antropométricos) dos indivíduos com neoplasias hematológicas malignas não apresente comprometimento, ele pode ser modificado com o avançar da doença e, especialmente, com o tratamento quimioterápico empregado (ALMEIDA *et al.*, 2005). Portanto, conhecer o estado nutricional desses indivíduos na etapa pré-tratamento é de extrema importância, pois possibilita o manejo nutricional adequado visando a uma melhor resposta ao tratamento e à qualidade de vida dos indivíduos afetados.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a proporção de células imunitárias (linfócitos T CD4, Th17 e CD8) e as concentrações de citocinas plasmáticas (IL-6, IL-10, IL-17A e TNF) em indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas em fase anterior ao tratamento e suas associações com o estado nutricional, visto que podem repercutir sobre a qualidade de vida e prognóstico desses indivíduos.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

População

A população foi constituída por indivíduos atendidos pelo serviço de onco-hematologia do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário, Florianópolis – SC. A amostragem foi por conveniência e saturação temporal (de novembro/2012 a abril/2013).

O atendimento da onco-hematologia do HU abrange os setores de emergência, ambulatório de hematologia e internação do HU (Clínica Médica II).

Critérios de inclusão: possuir idade ≥ 16 anos; apresentar diagnóstico de neoplasias hematológicas malignas; estar apto a iniciar tratamento quimioterápico; não estar impossibilitado de se alimentar oralmente.

Critérios de exclusão: ter idade < 16 anos, estar em tratamento paliativo; estar em tratamento com estatinas e/ou algum fármaco anti-inflamatório; possuir diagnóstico de doença infectocontagiosa e estar em período gestacional.

Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da UFSC (120.066 de 08/10/2012).

Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) conforme com a Declaração de Helsinki (2008).

Delineamento do estudo

Este estudo é caracterizado como descritivo, de corte transversal, conduzido com indivíduos com neoplasias hematológicas malignas com diagnóstico recente, anteriormente ao tratamento quimioterápico.

Instrumento e técnicas de coleta de dados

Identificação dos indivíduos

Os indivíduos foram caracterizados a partir do preenchimento de um formulário de cadastro previamente elaborado, contemplando informações como: dados clínicos, hábitos de vida.

Avaliação do estado nutricional

Foram mensuradas as medidas de peso, altura, circunferência do braço (CB) e dobra cutânea tricipital (DCT) conforme a *World Health Organization* (WHO) (1995). O peso atual foi aferido em balança eletrônica de plataforma com capacidade máxima de 150 kg e escala de 100 g, da marca Toledo® (Empresa Toledo do Brasil, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A estatura foi aferida com régua antropométrica, acoplada à balança citada anteriormente, com capacidade de aferição máxima de 2 m e escala de 1 mm. Os indivíduos foram avaliados descalços e com o mínimo de roupa. O peso usual foi referido pelo participante ou responsável.

A CB foi mensurada em duplicata de forma não sequencial e calculada a média aritmética dos valores encontrados. A DCT foi aferida em triplicata por sistema de rodízio e utilizada a mediana dos resultados. Essas medidas foram realizadas com auxílio de fita métrica inelástica TBW® (São Paulo, SP, Brasil) e adipômetro Lange Skinfold Caliper® (Beta Technology Incorporated, Santa Cruz, Califórnia, EUA), respectivamente, ambos com precisão de 1 mm. O valor da circunferência muscular do braço (CMB) foi obtido da diferença entre o valor da CB e o valor da DCT após ser dividida por dez e multiplicada pelo valor de π (3,14) (MONEGO *et al.*, 2003).

Para a avaliação do estado nutricional foi utilizado Índice de Massa Corporal (IMC) (WHO, 1995) e classificado a partir dos pontos de corte estabelecidos para cada faixa etária (ONIS *et al.*, 2007; BRASIL, 2007; WHO, 2008).

Os valores de CMB foram comparados com os valores esperados para o percentil 50°, segundo sexo e idade dos indivíduos, apresentados por Frisancho (1981; 1990).

A variação do peso relacionada ao período prévio ao estudo foi avaliada a partir do cálculo de percentual de perda de peso. Sua classificação foi confrontada com o tempo de ocorrência, segundo valores propostos por Blackburn *et al.* (1977).

Coleta de sangue

A coleta foi realizada no ambiente hospitalar, seguindo o protocolo do HU/UFSC e realizado por profissionais capacitados do setor de análises clínicas. A amostra sanguínea foi coletada em dois tubos heparinizados (Sistema Vacutainer® BD Biosciences - Abingdon, RU) com capacidade de 10 mL cada e um tubo de 5 mL (Sistema

Vacutainer[®] BD Biosciences - Abingdon, RU) com ativador de coágulo e gel separador para as dosagens de PCR e albumina.

Após a coleta, cada amostra foi transportada em temperatura ambiente até o laboratório de pesquisa (Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas - LIDoC, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas/ UFSC - <http://lidoc.ccb.ufsc.br/>) onde, imediatamente, foi iniciado o processamento das mesmas.

Avaliação da proporção de linfócitos T CD4, Th17 e CD8

Alíquota de 1 mL de sangue total foi adicionada em um tubo Falcon[®] (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) de 15 mL, contendo 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 a 37°C na presença, ou não, de PMA (50 ng/mL) (Sigma-Aldrich, São Luis, MO, EUA), Ionomicina (1 µg/mL) (Sigma-Aldrich, São Luis, MO, EUA) e Monensina (2 mM) (BD GolgiStop[™] Protein Transport Inhibitor, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e incubada em banho-maria por 4 horas, a 37° C. Após o período de incubação, o sangue diluído foi transferido para tubos de citometria de fluxo e incubado por 15 minutos com solução hemolítica (BD Pharm Lyse[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA) em volume dez vezes superior ao volume de sangue diluído. Após esse procedimento, o material foi centrifugado para retirada da solução hemolítica, lavado duas vezes com tampão de marcação (BD Pharmigen[™] Stain Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (DURAMAD *et al*, 2004) e fixado com tampão de fixação (BD Cytotfix[™] Fixation Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Uma vez fixadas, as células foram permeabilizadas usando tampão de permeabilização Perm Wash (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Para a marcação, as células foram incubadas por 40 minutos com 20 µL de *cocktail* de anticorpos ligados a fluoróforos específicos: anti-CD4 (PerCP-Cy5.5), anti-IL17A (PE) (Human Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit, BD Pharmigen[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Para a obtenção da proporção de linfócitos T CD4 e CD8, as células não estimuladas foram incubadas com 10 µL de cada anticorpo isolado (anti-CD4 e anti-CD8) ligados aos fluoróforos PE e FITC, respectivamente (PE Mouse Anti-Human CD4, BD Pharmigen[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA) (FITC Mouse Anti-Human CD8, BD Pharmigen[™], BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os controles negativos foram incubados com anticorpos monoclonais não reativos ligados aos fluoróforos PerCP-Cy5.5, PE e

FITC (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em tampão de marcação (BD Pharmigen™ Stain Buffer, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e adquiridas em citômetro de fluxo FACScantoII e software BD FACSDiva versão 6.1.3. Foram adquiridas 10.000 células e posterior análise usando o software Cyflogic versão 1.2.1. A proporção de linfócitos IL-17A⁺ foram expressos como percentual dos linfócitos CD4⁺ totais. Os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ foram expressos como percentual das células com características morfológicas (tamanho e granulosidade) de linfócitos (DURAMAD *et al.*, 2004).

Determinação da concentração de citocinas plasmáticas IL-6, IL-10, IL-17A e TNF

O sangue total foi centrifugado para separação da fração de plasma. Alíquotas do plasma foram, então, congeladas em freezer -80 °C. No momento do ensaio, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e imediatamente usadas para análise das concentrações de IL-6, IL-10, IL-17A e TNF por citometria de fluxo com sistema comercial para mensuração de citocinas (ensaio citométrico de esferas ordenadas (CBA) (Human Th1/Th2/Th17 cytokine kit, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), contendo uma mistura de anticorpos conjugados ao fluoróforo *phycoerythrin* (PE) (anti-IL-2; anti-IL-4; anti-IL-6; anti-IL-10; anti-TNF, anti-IFN γ e anti-IL-17A) (Human Th1/Th2/Th17 PE Detection Reagent, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). O ensaio foi conduzido de acordo com as instruções do fabricante.

A aquisição dos dados foi realizada em citômetro de fluxo FACScanto II por meio do software FACSDiva versão 6.1.3. Curvas padrões para cada citocina foram plotadas e as concentrações de cada amostra teste foram calculadas usando o software FCAP array v.1.0.2 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Os dados foram expressos em pg/mL (CHEN *et al.*, 1999).

Determinação da concentração de PCR e albumina e do hemograma

Após a coleta, o sangue, destinado à dosagem de PCR e albumina e à determinação do hemograma, foi processado no Serviço de Análises Clínicas do HU. A PCR foi determinada pelo método de imunonefelometria (Siemens Dade Behring Inc., 55, Newark, DE, EUA)

(LEDUE *et al*, 1998), e a albumina, pelo método colorimétrico automatizado (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Newark, DE, EUA) empregando-se púrpura de bromocresol como reagente de cor (LASKY *et al*, 1985). Para a obtenção do hemograma foi utilizado o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Inc. Kobe, Japan).

Tratamento e análise dos dados

Os dados foram registrados e organizados em banco de dados no programa Microsoft Office Excel 2007[®] (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) Todas as informações foram digitadas em dupla entrada para posterior verificação das inconsistências mediante o programa EPIDATA[®] (EpiData Association, Atlanta, GA, EUA). Após, o banco de dados foi transformado mediante o software STAT-TRANSFER[®] (Circle Systems, Seattle, WA, EUA), para posterior análise estatística no programa estatístico STATA[®] versão 11.0 para Windows (StataCorp, College Station, TX, EUA).

As variáveis quantitativas foram tratadas como mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram descritas considerando as frequências absolutas e relativas de cada categoria das variáveis correspondentes.

Para análise entre grupos (leucemias e linfomas) foi utilizado o teste de Mann-Whitney, e para testar associação entre as variáveis foram utilizadas as correlações de Spearman. Para todos os testes, foi adotado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Caracterização da amostra

Trinta e sete indivíduos com diagnóstico de neoplasias hematológicas iniciaram o tratamento quimioterápico no período de novembro de 2012 a abril de 2013. Dezenove desses indivíduos foram excluídos por não atenderem os critérios de elegibilidade. Dentre eles, oito eram portadores de doenças infecto contagiosas e seis estavam fazendo uso de anti-inflamatório. Apresentavam diagnósticos de leucemia aguda ($n=4$), leucemia crônica ($n=3$), linfoma não Hodgkin ($n=10$) e mieloma múltiplo (2) e a grande maioria era do sexo masculino ($n=14$). Dos dezoito indivíduos elegíveis ao estudo, dois recusaram

participar e dezesseis confirmaram seu aceite por meio da assinatura do TCLE (fig. 1).

Os sujeitos do estudo apresentavam idades entre 18,7 e 79,6 anos, e entre as neoplasias hematológicas apresentadas destacaram-se as leucemias agudas (n=9) e os linfomas não Hodgkin (n=3). A maioria dos sujeitos (n=9) apresentaram comorbidades, tais como: depressão, esofagite, hérnia de hiato, gastrite, úlcera gástrica, hipertensão arterial sistêmica, hipotireoidismo, disfunção renal, diabetes tipo II, osteoporose, artrite reumatoide e intolerância a lactose. A tabela 1 apresenta a caracterização dos sujeitos do estudo.

É importante destacar que em função da variedade de doenças, as formas de estadiamento foram diversas, e apesar de terem sido inclusos indivíduos com diagnóstico recente, foram encontrados variados graus de progressão das doenças. Para melhor entendimento e padronização da informação, classificou-se o grau de gravidade da doença ou o prognóstico do indivíduo conforme o risco: alto, intermediário e baixo. Dos indivíduos participantes, sete apresentaram doença de alto risco, sete apresentaram risco intermediário e dois apresentaram baixo risco. Os diagnósticos e estadiamentos foram estabelecidos, principalmente, com base em biópsia, imunofenotipagem e citogenética e imunohistoquímica.

Avaliação do Estado Nutricional

Os indivíduos do estudo apresentaram valor mediano de IMC de 25,6 kg/m² (24,1; 29,2) e de adequação de CMB de 100% (86,9; 111,1) em relação ao valor de referência conforme sexo e idade. Apesar disso, sete indivíduos (43,8%) apresentaram perda de peso significativa e grave em até seis meses antes do estudo. Esses dados foram obtidos com base na informação do peso usual e do período de tempo em que ocorreu a alteração de peso referida pelo indivíduo.

Parâmetros laboratoriais

Na tabela 2 são apresentados os resultados das análises laboratoriais. Em análise conjunta, observou-se redução importante da contagem de hemácias [2,5 milhões/ mm³ (2,2; 4,1)], concentração de hemoglobina [8,3 g/ dL (7,2; 11,6)], hematócrito [25,4 % (20,6; 35,7)] e contagem de plaquetas [58.000 mm³ (33.000; 136.000)]. Tais parâmetros apresentaram tal alteração, especialmente, nos indivíduos com leucemias, conforme esperado nessas doenças. A mediana dos

leucócitos totais [7.860 mm^3 (4.840; 22.480)] comportou-se dentro dos limites de referência, porém ao analisar os valores individualmente, observou-se leucocitose acentuada na maioria dos casos de leucemias.

Observou-se também, elevação da concentração de PCR [37,5 mg/ L (7,2; 68,9)] e redução da concentração de albumina [3,2 g/ dL (2,9; 3,6)], com aumento da razão PCR/albumina [13,7 (2,1; 23,6)].

Foi também investigado se algumas variáveis possuíam associações que pudessem potencialmente ser utilizadas no ambiente clínico. Leucócitos totais foram negativamente correlacionados à contagem de plaquetas ($r = -0,44$), enquanto a concentração de albumina foi inversamente correlacionada ao IMC ($r = -0,53$).

Proporção de populações linfocitárias T CD4⁺, CD4⁺IL17⁺ e CD8⁺

Para a determinação da proporção das populações linfocitárias T CD4⁺, CD4⁺IL17⁺ e CD8⁺, foram selecionadas células com características morfológicas (tamanho e granulosidade) de linfócitos. Na figura 2 são apresentados gráficos representativos da análise da proporção desses fenótipos celulares obtidos por citometria de fluxo. Na tabela 3 são apresentados os resultados dessas análises por população linfocitária.

A mediana da proporção de linfócitos T CD4⁺ foi de 30,2% (16,8; 39,6) em relação ao total de linfócitos. A proporção mediana de linfócitos T CD4⁺IL17⁺ foi de 2,5% (2,1; 10,8) do total de linfócitos T CD4⁺. Os linfócitos T CD8⁺ apresentaram-se na proporção de 19,5% (8,2; 25,5) do total de linfócitos, porém em análise por diagnóstico observou-se que a proporção desse linfócito é inferior nas leucemias [9,8% (3,7; 16,4)] em comparação aos linfomas [29,2% (23,7; 40,6)] e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,024$). Além disso, a razão CD4⁺:CD8⁺ foi de 1,5 (1,0; 3,5) em análise conjunta, porém apresentou-se redução significativa nos linfomas 0,97% (0,77; 1,03) em relação às leucemias 2,55% (1,54; 4,97) ($p = 0,006$) (fig.3).

A proporção de T CD4⁺IL17⁺ foi correlacionada inversamente com a razão CD4⁺:CD8⁺ ($r = -0,39$) e positivamente com a CMB ($r = -0,31$). Correlações inversas também foram encontradas entre a razão CD4⁺:CD8⁺ e as contagens de hemácias ($r = -0,50$) e plaquetas ($r = -0,66$).

Citocinas plasmáticas IL-17A, IL-6, IL-10 e TNF

Na tabela 3 são apresentadas as concentrações plasmáticas das citocinas IL-6 e IL-10. As concentrações plasmáticas de IL-17A e TNF apresentaram-se abaixo do limite teórico de detecção do método (17,8 e 3,8 pg/ mL, respectivamente) para todos os indivíduos, exceto um indivíduo que apresentou concentração de IL-17A de 70,9 pg/ mL. Este era do sexo feminino, cinquenta e nove anos de idade, portador de leucemia pró-mielocítica aguda de baixo risco e história progressiva de artrite reumatoide e hipertensão arterial.

É importante ressaltar que em um indivíduo idoso, do sexo feminino, portador de mieloma múltiplo, com alto grau de estadiamento e, entre outras comorbidades, apresentava insuficiência renal aguda, foram encontrados níveis de IL-10 de 115,4 pg/ mL e de IL-6 acima de 5000 pg/ mL, estando o último valor, acima da linearidade máxima utilizada. O indivíduo foi a óbito no dia seguinte da coleta de sangue. O dado referente à concentração de IL-6 deste indivíduo não foi incluso nas análises.

As concentrações de IL-6 foram, como esperado, fortemente associadas às concentrações de PCR ($r= 0,71$) e à relação PCR/albumina ($r= 0,75$). IL-6 também foi positivamente associada à contagem de leucócitos ($r= 0,42$).

DISCUSSÃO

Com base nos resultados observou-se que a amostra foi constituída por indivíduos em diferentes situações onco-hematológicas, com variados graus de estadiamento. Dentre os principais resultados pode-se destacar que o estado nutricional desses indivíduos no momento avaliado (fase inicial da doença e/ou anterior ao tratamento), aparentemente, não se mostrou comprometido, apesar de que uma parcela significativa apresentou perda de peso significativa ou grave em período recente. Além disso, albumina sérica apresentou correlação inversa ao estado nutricional. Adicionalmente, observou-se que a população de linfócitos T CD8⁺ foram significativamente maiores nos linfomas e, conseqüentemente, a razão CD4⁺:CD8⁺ apresentou-se significativamente reduzida nessas doenças em relação às leucemias. Também, observou-se associação positiva entre os linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ e a relação CD4⁺:CD8⁺. Essas células, também, foram positivamente correlacionadas com a adequação de CMB.

A variabilidade dos dados apresentada neste estudo é o retrato dos diferentes diagnósticos e variáveis manifestações clínicas que compõem as neoplasias hematológicas malignas. Apesar dessa limitação, os dados aqui apresentados possuem valor imensurável visto que essas doenças possuem incidência relativamente rara na população (JEMAL *et al*, 2002). Mesmo com uma amostra relativamente reduzida, o que limita o estabelecimento de muitas associações pela falta de poder, nossos dados oferecem informações importantes sobre características do estado inflamatório nutricional de indivíduos nessas condições de agravo à saúde.

A partir desse estudo pode-se constatar que indivíduos com neoplasias hematológicas malignas em fase inicial, não apresentaram comprometimento nutricional, considerando somente dados antropométricos (IMC e percentual de adequação de CMB). No entanto, aproximadamente, 44% dos indivíduos apresentaram perda de peso significativa ou grave em até seis meses anteriores à avaliação, demonstrando que esses indivíduos podem estar em situação de risco nutricional, condição que pode ser agravada com o emprego do tratamento (ALMEIDA *et al*, 2005). Diante disso, ressalta-se a necessidade de utilização de diferentes métodos de avaliação nutricional, que, também, levem em consideração outros parâmetros, tais como exame físico e história clínica dos indivíduos (BAUER; CAPRA; FERGUSON, 2002).

Conhecer o estado nutricional de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas na etapa pré-tratamento é de extrema importância, pois possibilita o manejo nutricional adequado visando a uma melhor resposta ao tratamento e à qualidade de vida dos indivíduos afetados. Estudo retrospectivo, envolvendo 107 indivíduos com neoplasia gástrica metastática ou avançada, submetidos a tratamento quimioterápico, avaliou a relação de 28 variáveis com o prognóstico. Dentre elas, histologia, metástase peritoneal, ascite, estado funcional e perda de peso foram identificadas como importantes fatores prognósticos (INA *et al*, 2012). Outro estudo revisou dados coletados prospectivamente de um total de 780 indivíduos com neoplasia pulmonar (pequenas células (n=290) e não pequenas células (n=418)) e mesentelioma (n=72), em quimioterapia. O objetivo foi avaliar a influência da perda de peso sobre o tratamento quimioterápico e prognóstico desses indivíduos. A perda de peso foi relacionada a não completude do tratamento e à maior ocorrência de anemia por toxicidade. Além disso, a perda de peso foi relacionada a um menor

tempo de sobrevida (ROSS *et al*, 2004). Outro estudo, com objetivo de avaliar o efeito do estado nutricional sobre a indução da remissão da doença, envolveu 66 crianças e adolescentes com leucemia linfoblástica aguda. Dessas, 35 encontravam-se desnutridas e 31 encontravam-se bem nutridas, com base no parâmetro peso por idade. Em comparação às crianças bem nutridas, as que se encontravam mal nutridas apresentaram maior ocorrência de infecções, maior tempo de indução de remissão e de internação (HAFIZ; MANNAN, 2008).

No presente estudo, os indivíduos apresentaram redução da concentração sérica de albumina, e este marcador foi negativamente correlacionado ao IMC. Tal achado pode ser explicado pela baixa especificidade e sensibilidade da albumina sérica como marcador do estado nutricional. Esse marcador, no entanto, melhor refletiu a condição inflamatória apresentada pelos indivíduos do estudo. Por ser a albumina uma proteína de fase aguda negativa, em resposta ao estímulo inflamatório, sua concentração é reduzida. Tal condição inflamatória é também explicada pela elevação da PCR e citocinas pró-inflamatórias. Esse resultado é semelhante ao encontrado por Cabral, Carvalho e Miszputen (2001), que avaliaram 36 indivíduos portadores de doença de Crohn. O estado nutricional dos indivíduos foi avaliado por métodos antropométricos (altura, peso, peso ideal/peso atual, DCT, CB e CMB) e pela avaliação da concentração de albumina sérica. Ao considerar apenas os dados bioquímicos, 28 indivíduos apresentaram desnutrição moderada e grave, no entanto, ao correlacionar esses dados com a avaliação antropométrica, não foi possível encontrar associação entre a concentração de albumina sérica e a avaliação antropométrica. Neste mesmo estudo a albumina apresentou sensibilidade de 64% e especificidade de 37,5% para identificar desnutrição. Esse marcador foi associado inversamente ao estado inflamatório e apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 56,5% para detectar inflamação ativa. Esses resultados sugerem que a concentração de albumina pode sofrer interferências do estado inflamatório, especialmente, por ação de citocinas inflamatórias, como a IL-6 que, no presente estudo, mostrou-se quatro vezes mais elevada quando comparada ao encontrado em indivíduos saudáveis descritos na literatura (WU *et al*, 2009).

A IL-10, citocina com atividade anti-inflamatória, é produzida pelos linfócitos T reguladores (Treg), entre outras células imunitárias. Desempenham o papel de reprimir a atividade das células T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (OUYANG *et al*, 2011). No

presente estudo, essa citocina apresentou-se duas vezes mais elevada, em comparação às concentrações encontradas na literatura para indivíduos saudáveis (MALARSTIG *et al*, 2008). Com base nisso, sugere-se que a elevação da concentração dessa citocina seja reflexo, principalmente, de elevada proporção de linfócitos Treg no sangue periférico dos indivíduos avaliados. Estudos com neoplasias hematológicas e sólidas demonstraram que os linfócitos Treg apresentaram-se em elevada proporção no início da doença e aumentaram com o avanço da mesma, em detrimento de outras populações linfocitárias, tais como os linfócitos Th17 (ERSVAER *et al*, 2010; MARUYAMA *et al*, 2010).

Dentre as células imunitárias avaliadas, as células T CD4 e CD8, em análise conjunta, apresentaram redução de aproximadamente 30% em relação às proporções descritas na literatura para indivíduos normais (GIORGI *et al*, 1990; REICHERT *et al*, 1991; BOFILL *et al*, 1992). Os linfócitos T CD8 apresentaram-se em maior proporção no sangue periférico de indivíduos com linfoma, em relação aos indivíduos com leucemias. Ao comparar com dados de indivíduos normais, os indivíduos com linfoma apresentaram valores semelhantes, enquanto que os valores dos indivíduos com leucemia foram três vezes menores (GIORGI *et al*, 1990; REICHERT *et al*, 1991; BOFILL *et al*, 1992). Isso pode ser explicado pela proliferação de células imaturas e com possíveis fenótipos aberrantes na medula óssea dos indivíduos com leucemias (maioria em nosso estudo) e a alteração da expressão de marcadores celulares, tais como a molécula CD4 e CD8 (EMERECIANO *et al*, 2004).

A manutenção da proporção de células CD8⁺ nos indivíduos com linfomas pode potencialmente corresponder à manutenção da capacidade citotóxica apresentada por essas células e efetiva imunidade antineoplásica, o que pode estar intimamente ligado ao prognóstico dos indivíduos, como demonstrado em outros estudos envolvendo neoplasias malignas sólidas (PAGES *et al*, 2010). Estudo clínico envolvendo oitenta indivíduos diagnosticados com linfoma folicular em tratamento quimioterápico. A proporção de linfócitos T CD8⁺ produtoras de granzima B avaliada antes do tratamento, foi altamente correlacionada com maior sobrevivência livre de doença nos indivíduos após tratamento quimioterápico (Rituximab) (LAURENT *et al*, 2011).

Além disso, nosso estudo encontrou uma correlação inversa entre a proporção de linfócitos Th17 e a razão CD4⁺:CD8⁺. Esses dados são reflexos da maior proporção de linfócitos T CD8⁺ encontrada nos

indivíduos com maior distribuição de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺. Em análise desses fenótipos celulares por diagnóstico, observa-se que o aumento de linfócitos T CD8⁺ nos indivíduos com linfomas é acompanhado por uma maior distribuição de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ nestes mesmos indivíduos (resultados não apresentados).

Esses dados vão de encontro com o que foi observado por Munegowda e colaboradores (2011) em estudo cujo objetivo foi avaliar o efeito estimulatório de linfócitos Th17 ovoalbumina-específicas (OVA), sobre a resposta citotóxica das células T CD8⁺ e imunidade antineoplásica em modelos preventivos e terapêuticos contra melanoma B16 expressando OVA (BL6-10 OVA). Linfócitos Th17 adquiriram o peptídeo MHC I (complexo maior de histocompatibilidade) e expressaram o fator de transcrição ROR γ t, IL-17 e IL-2. *In vitro*, essas células não tiveram nenhuma atividade direta contra as células neoplásicas, no entanto, elas foram hábeis em estimular a resposta dos linfócitos T citotóxicos CD8⁺, via IL-2 e pMHC I. *In vivo*, utilizando camundongos C57BL/6, injetados com células BL6-10 OVA, e posteriormente, com linfócitos Th17, observou-se que os linfócitos Th17 por meio da IL-17 estimularam a expressão de quimiocinas CCL2 e CCL20 no microambiente neoplásico pulmonar promovendo o recrutamento de vários leucócitos (células dendríticas, T CD4⁺ e CD8⁺) e provocando uma resposta imunitária protetora.

A proporção de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ encontrada em nosso estudo foi semelhante à encontrada por Ersvaer e colaboradores (2010). No referido estudo, observou-se que os indivíduos com leucemia mieloide aguda (n=16), no período anterior ao início do tratamento quimioterápico, apresentaram proporção de Th17 (CD3⁺CD8⁺IL-17A⁺) semelhante à apresentada pelos controles saudáveis (n=30). Tal proporção manteve-se durante (n=16) e a pós a quimioterapia (n=6).

Outros estudos envolvendo indivíduos com leucemia mieloide aguda (n=42) e leucemia linfocítica crônica (n=66) não tratados, demonstraram que a proporção de Th17 no sangue periférico é, aproximadamente, quatro vezes mais elevada nos indivíduos doentes em relação aos saudáveis (WU *et al*, 2009; JAIN *et al*, 2011). Esta proporção foi reduzida após remissão completa da doença (WU *et al*, 2009). Maiores proporções de Th17 foram relacionadas com melhor prognóstico (JAIN *et al*, 2011; NIARAGH *et al*, 2013).

Esses estudos apresentaram grande variação dos valores encontrados em indivíduos saudáveis. Deve-se ressaltar que esses estudos foram desenvolvidos a partir de diferentes métodos e

populações (norueguesa, chinesa e americana) (WU *et al*, 2009; JAIN *et al*, 2011; NIARAGH *et al*, 2013).

Além disso, observou-se uma correlação positiva entre a proporção de linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ com a adequação da CMB. Apesar deste parâmetro, isoladamente, não ser suficiente para avaliar o estado nutricional (BAUER; CAPRA; FERGUSON, 2002), tal relação pode direcionar a investigação do uso dessa proporção celular como possível fator prognóstico nutricional. Essas células, também, foram positivamente relacionadas à proporção de linfócitos T CD8, podendo estar associadas à resposta imunitária protetora, como descrito em outros estudos.

Mais estudos são necessários para avaliar a implicação prognóstica dos linfócitos Th17 nas neoplasias hematológicas malignas, porém nossos dados somam com as evidências existentes a respeito do potencial papel dessas células nas neoplasias hematológicas.

CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos nossos dados, foi possível constatar que os indivíduos com neoplasias hematológicas em fase inicial não apresentaram comprometimento nutricional, com base em parâmetros antropométricos, embora apresentassem um quadro inflamatório pronunciado pela elevação de marcadores inflamatórios.

Além disso, observou-se manutenção da proporção de linfócitos T CD8 nos indivíduos com linfomas em relação aos com leucemias. Essas células foram correlacionadas a maior proporção de linfócitos Th17, o que pode estar associado a uma resposta imunitária protetora como descrito em outros estudos.

A positiva correlação encontrada entre linfócitos Th17 e CMB pode direcionar a investigação do uso dessa proporção celular como possível fator prognóstico nutricional.

O conhecimento das proporções das populações linfocitárias T CD4, Th17 e T CD8, bem como, das concentrações de mediadores inflamatórios e suas relações com o estado nutricional, pode representar aplicação prognóstica nas neoplasias hematológicas. Estas informações podem ter valor como ferramenta de monitoramento para diversas abordagens terapêuticas como a quimioterapia, radioterapia e a imunonutrição.

AGRADECIMENTOS E NOTAS

Esta pesquisa é financiada pelo CNPQ, PPGN e CAPES. Endereço para correspondência: Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC), Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS), Centro de Ciências Biológicas (CCB), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Trindade, Trindade, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC – Brasil. Telefone: +55 48 3721 2289. Email: everson.nunes@ufsc.br.

REFERÊNCIAS

ALLEN *et al.* The Clinical Implications of Antitumour Immunity in Head and Neck Cancer. **The Laryngoscope**. n. 122, p. 144-157, 2011;

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005;

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LÓPES-SORIANO, F.J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion of Clinical Nutrition and Metabolic Care**. n. 6, p. 401-406, 2003;

BAUER, J.; CAPRA, S.; FERGUSON, M. Use of the scored patient-generated Subjective Global Assessment tool in patients with cancer. **European Journal of Clinical Nutrition**. n. 56, p. 770-785, 2002.

BLACKBURN, G. L. *et al.* Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v. 1, p. 11-22, 1977;

BOFILL, M. *et al.* Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. **Clinical and Experimental Immunology**. n. 88, p. 243-252, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição.

Incorporação das curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde de 2006 e 2007 no SISVAN, Brasília, DF, 2007. Disponível em:<http://nutricao.saude.gov.br/docs/geral/curvas_oms_2006_2007.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2012;

CABRAL, V. L. R.; CARVALHO, L.; MISZPUTEN, S. J. Importance of serum albumin values in nutritional assessment and inflammatory activity in patients with Crohn's disease. **Archives of Gastroenterology**. n. 38, p. 104-108, 2001;

CHEN, R. et al. Simultaneous Quantifications of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. **Clinical Chemistry**. v. 45, n. 9, p. 1693-1694, 1999;

DEWYS, W. D. et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. **The American Journal of Medicine**, n. 69, p. 491-497, 1980;

DURAMAD, P. et al. Flow cytometric detection of intracellular Th1/Th2 cytokines using whole blood: Validation of immunologic biomarker for use in epidemiologic studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. v. 13. p. 1452-1458, 2004;

EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. n. 50, p. 183-189, 2004;

ERSVAER, E. et al. Intense chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating Tc1, Th1, Th17 and Treg cells. **BMC Immunology**. v. 11, n. 38, 2010;

FLOWERS, C. R.; ARMITAGE, J. O. A Decade of Progress in Lymphoma: Advances and Continuing Challenges. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**. v. 10, n. 6, p. 414-423, 2010;

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 34, p. 2540-2545, 1981;

_____. **Antropometric Standards for the assessment of growth and nutrition status**. Michigan, USA: The University of Michigan Press, 1990;

GIORGI, J. V. et al. Quality control in the flow cytometric measurement of T lymphocyte subsets: the multicenter AIDS cohort study experience. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. **Clinical Immunology Immunopathology**. n. 5, p. 173-86, 1990;

HAFIZ, M. G.; MANNAN, M. A. Nutritional status at initial presentation in childhood acute lymphoblastic leucemia and its effect on induction of remission. **Mymensingh Medical Journal**. n. 17, p.46-57, 2008.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genetic. **Jornal de Pediatria**. n. 84. p. S52-S57, 2008;

INAL, A. et al. Prognostic factor in first-line chemotherapy treated metastatic gastric cancer patients: a retrospective study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. n. 13. p. 3869-3872, 2012;

JAIN, P. et al. Th17 and non-Th17 IL-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. **Haematologica**. v. 4, n. 97, p. 599-607, 2011;

JEMAL, A., et al. Cancer statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. n. 52, p. 23-47, 2002.

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6: a pleiotropic cytokine and Th17 Cells. **Th17 Cells in Health and Disease**. p. 47-62, 2011;

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**. n. 27, p. 485-517, 2009;

LASKY, F. D. et al. Evaluation of a bromocresol purple method for the determination of albumin adapted to the DuPont aca discrete clinical analyzer. **Clinical Biochemistry**. n. 18, p. 290-296, 1985.

LAURENT, C. et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. **Blood**. v. 118 n. 205371-5379, 2011;

LEDUE, T. B. et al. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum. **Annals Clinical Biochemistry**. n. 35, p. 745-53, 1998;

MARTIN-OROZCO, N. et al. Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**. v. 5, n. 31, p. 787–798, 2009;

MARUYAMA, T. et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3⁺ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. **Cancer Science**. v. 101, n. 9, p. 1947-1954, 2010;

MONEGO, E. T. et al. **Antropometria: manual de técnicas e procedimentos**. 2 ed. Goiânia (GO): Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição da Região Centro-Oeste/ MS/ UFG, 2003;

MOUNTER, P. J.; LENNARD, A. L. Management of non-Hodgkin's Lymphomas. **The Fellowship of Postgraduate Medicine**. n. 75, p. 2–6, 1999;

MUNEGOWDA, M. A. et al. Th17 and Th17-stimulated CD8⁺ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. **Cancer Immunology Immunotherapy**. n. 60, p. 1473-1484, 2011;

MURUGAIYAN, G.; SAHA, B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. **The Journal of Immunology**. n. 183, p. 4169-4175, 2009;

NIARAGH, J. F. et al. Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **Tumour Biology**. n. 34, p. 929-940, 2013;

NUMASAKI, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. **Blood**. v. 7, n. 101, p. 2620-2627, 2003;

NUMASAKI, M.; LOTZE, M. T.; SASAKI, H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. **Immunology Letters**. n. 93, p. 39–43, 2004;

ONIS, M. et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**. n. 85, p. 660-667, 2007;

OUYANG, W., et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**. v. 29, p. 71-109, 2011;

PAGES, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**. n. 29, p. 1093-1102, 2010.

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**. v. 11, n. 6, p. 1133–1141, 2005;

PECK, A.; MELLINS, E. D. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. **Immunology**. n. 129, p. 147-153, 2009;

REICHERT, T., et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. **Clinical Immunology Immunopathology**. n. 60, p. 190-208, 1991;

ROSS, P. J. et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? **British Journal of Cancer**. n. 90, p. 1905–1911, 2004;

SELVIN, E.; PAYNTER, N. P.; ERLINGER, T. P. The Effect of Weight Loss on C-Reactive Protein: A Systematic Review. **Archives of Internal Medicine**. v. 167, 2007;

SUCRO, L. V. et al. Mieloma múltiplo: diagnóstico e tratamento. **Revista Médica de Minas Gerais**. n. 19, p. 58-62, 2009;

TAKAHASHIA, H. et al. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. **Immunology Letters**. n. 98, p. 189–193, 2005;

TANNO, T.; MATSUI, W. Development and maintenance of cancer stem cells under chronic inflammation. **Journal of Nippon Medical School**. n. 78, p. 138-145, 2011;

WILMORE, S. J. et al. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Supplement to Nutrition**. v. 12, n.1, 2006;

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report n°. 854. **Physical Status: The use and interpretation of antropometry**. Geneva, Switzerland: WHO, 1995;

_____. **BMI classification**. Geneva, Switzerland: WHO, 2008.

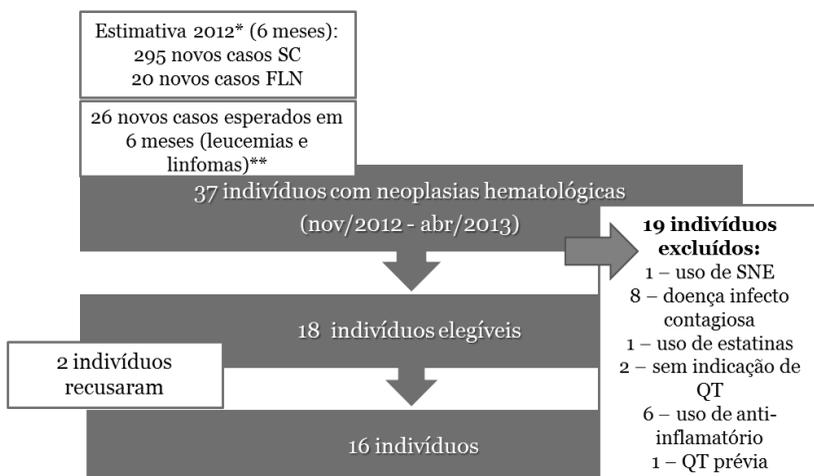
Disponível em:

<http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Acesso em: 02 jul. 2012;

WU, C. et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**. n. 158, p. 199-204, 2009;

ZHU, J., PAUL W E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**. v. 112, n. 5, 2008;

Figura 1 – Fluxograma do estudo. Florianópolis, 2013.



FLN, Florianópolis; SNE, sonda nasoenteral; QT, quimioterapia.

*Estimativa para 2012 – Leucemias e linfomas – dados apresentados para 6 meses (INCA, 2012);

**Dados baseados na incidência de leucemias e linfomas (julho/2011 a junho/2012) do HU/UFSC.

Tabela 1 – Caracterização de indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas. Florianópolis, 2013.

Características	n= 16
Sexo (n/ %)	
Feminino	9 (56,3)
Masculino	7 (43,8)
Idade (mediana/ min;max)	47 (18,7; 79,6)
Diagnóstico(n/ %)	
Leucemias agudas	9 (56,3)
Linfomas não Hodgkin	3 (18,8)
Linfomas de Hodgkin	2 (12,5)
Leucemias crônicas	1 (6,3)
Mieloma múltiplo	1 (6,3)
Comorbidades (n/ %)	
Ausente	9 (56,3)
Presente	7 (43,8)
Cor da pele (n/ %)	
Branca	13 (81,3)
Não branca	3 (18,8)

Tabela 2 – Parâmetros laboratoriais de indivíduos com diagnóstico recente de neoplasias hematológicas malignas. Florianópolis, 2013 (n=16).

Variáveis	n	Mediana (p25-p75)	Valores de Referência
Hemácias (milhões/ mm ³)	15	2,5 (2,2; 4,1)	M: 4,5 a 6,0 / F: 4,0 a 5,2 _a
Hemoglobina (g/ dL)	15	8,3 (7,2; 11,6)	M: 13,0 a 18,0/ F: 12,0 a 16,0 _a
Hematócrito (%)	15	25,4 (20,6; 35,7)	M: 40,0 a 52,0/ F: 37,0 a 47,0 _a
Leucócitos (mm ³)	15	7.860 (4.840; 22.480)	3.800-11.000 _a
Plaquetas (mm ³)	15	58.000 (33.000; 136.000)	150.000- 440.000 _a
PCR (mg/ L)	16	37,5 (7,2; 68,9)	< 5,0 _b
Albumina (g/ dL)	16	3,2 (2,9; 3,6)	3,4 a 5,0 _c
PCR/albumina	16	13,7 (2,1; 23,6)	-

a. WILLIAMS; WILKINS. Wintrobe's Clinical Hematology. p. 2532-2542, 1999;

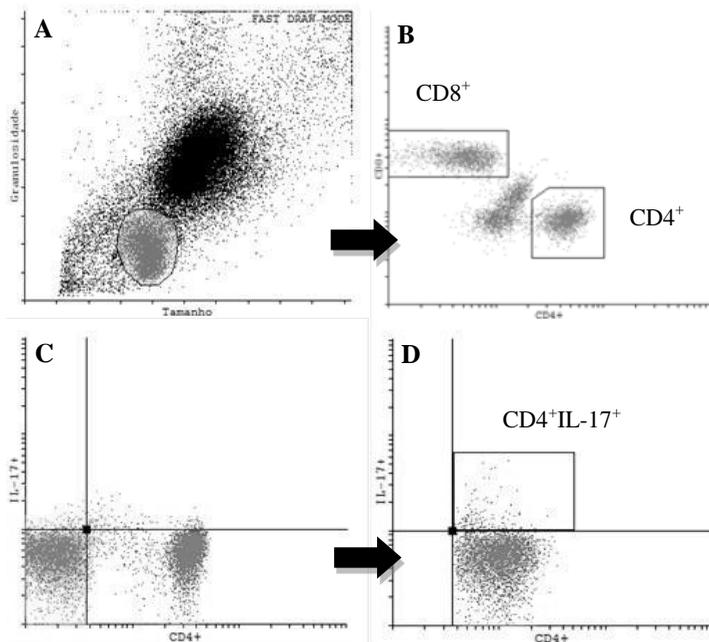
b. PEARSON, T. A., et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: application to clinical and public health practice: A startment for healthcare professionals from the centers for disease control and preventions and the American Heart Association. Circulation 2003; 107:499-511;

c. WILLEY, D.A; SAVORY, J., LASKY, F. An evaluation of a revised albumin method for the aca® discrete clinical analyzer, Du Pont Company, Wilmington, DE, August, 1982.

Tabela 3 – Descrição de proporções de células do sangue periférico com características morfológicas de linfócitos e concentrações de citocinas plasmáticas de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas. Florianópolis, 2013.

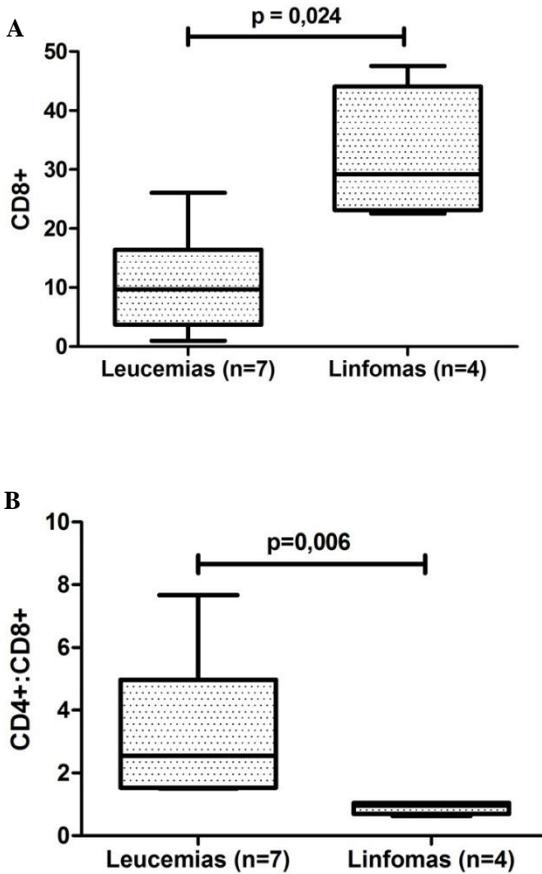
Variáveis	n	Mediana (p25-p75)
CD4 ⁺ (%)	12	30,2 (16,8; 39,6)
CD4 ⁺ IL17 ⁺ (%)	13	2,5 (2,1; 10,8)
CD8 ⁺ (%)	12	19,5 (8,2; 25,5)
CD4 ⁺ :CD8 ⁺	12	1,5 (1,0; 3,5)
IL-6 (pg/mL)	11	6,1 (4,1; 9,3)
IL-10 (pg/mL)	10	1,4 (0,0; 8,8)

Figura 2 – Gráficos de citometria de fluxo representativos das proporções de células $CD4^+$, $CD8^+$, $CD4^+IL17^+$, do sangue periférico de indivíduos com neoplasias hematológicas malignas. Florianópolis, 2013 (n=16).



(a) células consideradas com características morfológicas de linfócitos; (b) células $CD4^+$ e $CD8^+$ do total de linfócitos; (c) células não estimuladas; (d) células $CD4^+IL-17^+$ estimuladas e marcadas com os anticorpos anti- $CD4$ e anti- $IL-17$.

Figura 3 – Proporção de células CD8⁺ (A) do sangue periférico e razão CD4⁺:CD8⁺ (B) em indivíduos com leucemias e linfomas. Florianópolis, 2013 (n=11).



5 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos nossos dados, foi possível observar que indivíduos participantes do nosso estudo apresentaram, de modo geral, redução de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, em relação ao que a literatura indica para indivíduos normais, embora, em análise por diagnóstico, os indivíduos com leucemia tenham sido os maiores responsáveis por essa redução.

Os linfócitos T CD4⁺IL-17⁺, apresentaram proporções semelhantes às de indivíduos normais descritas em alguns estudos. Essas células apresentaram relação positiva com os linfócitos T CD8⁺. Outros estudos que demonstraram que essas células podem estar associadas à indução de linfócitos T CD8⁺ e à promoção uma resposta imunitária protetora.

Além disso, os linfócitos T CD4⁺IL-17⁺ foram correlacionados positivamente a CMB, pode direcionar a investigação do uso dessa proporção celular como possível fator prognóstico nutricional nessas doenças.

Além disso, constatou-se, com base em parâmetros antropométricos, que os indivíduos com neoplasias hematológicas em fase inicial não apresentaram comprometimento nutricional, embora apresentassem quadro inflamatório pronunciado pela alteração de marcadores inflamatórios (IL-6, IL-10, PCR e albumina).

Informações como as levantadas neste estudo podem representar aplicação prognóstica nas neoplasias hematológicas além da possibilidade de serem utilizadas como ferramenta de monitoramento para diversas abordagens terapêuticas como a quimioterapia, radioterapia e a imunonutrição.

Neste contexto, reforça-se a necessidade de mais estudos que sustentem a utilização desses marcadores na prática clínica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, R.; GRAY D. Immunological Memory and Protective Immunity: Understanding Their Relation. **Science**. v. 272, p. 54-60, 1996;

ALEXANDER, D. D., et al. The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature. **International Journal of Cancer**. v. 120. p. 1-39, 2007;

_____. Multiple Myeloma: A review of the epidemiologic literature. **International Journal of Cancer**. v. 120. p. 40-61, 2007;

ALLEN *et al.* The Clinical Implications of Antitumour Immunity in Head and Neck Cancer. **The Laryngoscope**. n. 122, p. 144-157, 2011;

ALMEIDA, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005;

AMOS, T. A.; GORDON, M. Y. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation-a review. **Cell Transplantation**. v. 4, n. 6, p. 547-69, 2005;

ARGILÉS, J.M.; BUSQUETS, S.; LÓPES-SORIANO, F.J. Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia. **Current Opinion of Clinical Nutrition and Metabolic Care**. n. 6, p. 401-406, 2003;

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**. n. 357, p. 539-545, 2001;

BALKWILL, F., CHARLES, K. A.; MANTOVANI, A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. **Cancer Cell**. n. 7, p. 211-217, 2005;

BAUER, J.; CAPRA, S.; FERGUSON, M. Use of the scored patient-generated Subjective Global Assessment tool in patients with cancer. **European Journal of Clinical Nutrition**. n. 56, p. 770-785, 2002.

BENCHETRIT, F. et al. Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell-dependent mechanism. **Blood**. v. 6, n. 99, p. 2114-2121, 2002;

BERENSON, J. R. **Mieloma múltiplo**, 2012. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/plasma_cell_disorders/multiple_myeloma.html> Acesso em: 19 jun. 2013;

BLACKBURN, G. L. et al. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v. 1, p. 11-22, 1977;

BOFILL, M. et al. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. **Clinical and Experimental Immunology**. n. 88, p. 243-252, 1992;

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Incorporação das curvas de crescimento da Organização Mundial da Saúde de 2006 e 2007 no SISVAN**, Brasília, DF, 2007. Disponível em: <http://nutricao.saude.gov.br/docs/geral/curvas_oms_2006_2007.pdf>. Acesso em: 03 jul. 2012;

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2011;

_____. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. **Linfoma de Hodgkin**. INCA. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=458> Acesso em 01 jun. 2013;

CABRAL, V. L. R.; CARVALHO, L.; MISZPUTEN, S. J. Importance of serum albumin values in nutritional assessment and inflammatory activity in patients with Crohn's disease. **Archives of Gastroenterology**. n. 38, p. 104-108, 2001;

CHEN, R. et al. Simultaneous Quantifications of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. **Clinical Chemistry**. v. 45, n. 9, p. 1693-1694, 1999;

COTTER, J. et al. Enterocolite neutropénica em doente transplantado hepático. **Jornal Português de Gastrenterologia**. n. 15, p. 16-19, 2008;

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**. n. 420, p. 860-867, 2002;

DEWYS, W. D. et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. **The American Journal of Medicine**, n. 69, p. 491-497, 1980;

DURAMAD, P. et al. Flow cytometric detection of intracellular Th1/Th2 cytokines using whole blood: Validation of immunologic biomarker for use in epidemiologic studies. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**. v. 13. p. 1452-1458, 2004;

EMERENCIANO, M. et al. Frequência de imunofenótipos aberrantes em leucemias agudas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. n. 50, p. 183-189, 2004;

ERSVAER, E. et al. Intense chemotherapy for acute myeloid leukemia differentially affects circulating Tc1, Th1, Th17 and Treg cells. **BMC Immunology**. v. 11, n. 38, 2010;

FLOWERS, C. R.; ARMITAGE, J. O. A Decade of Progress in Lymphoma: Advances and Continuing Challenges. **Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia**. v. 10, n. 6, p. 414-423, 2010;

FRISANCHO, A. R. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 34, p. 2540-2545, 1981;

_____. **Antropometric Standards for the assessment of growth and nutrition status**. Michigan, USA: The University of Michigan Press, 1990;

GIORGI, J. V. et al. Quality control in the flow cytometric measurement of T lymphocyte subsets: the multicenter AIDS cohort study experience. The Multicenter AIDS Cohort Study Group. **Clinical Immunology Immunopathology**. n. 5, p. 173-86, 1990;

HAFIZ, M. G.; MANNAN, M. A. Nutritional status at initial presentation in childhood acute lymphoblastic leucemia and its effect on induction of remission. **Mymensingh Medical Journal**. n. 17, p.46-57, 2008.

HAJJAJI, N.; BOUGNOUX P. Selective sensitization of tumors to chemotherapy by marine-derived lipids: A review. **Cancer Treatment Reviews**. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.07.001>>. Acesso em: 02 fev. 2013;

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genetic. **Jornal de Pediatria**. n. 84. p. S52-S57, 2008;

HARTGE, P.; DEVESA, S. S.; FRAUMENI JR., J. F. Hodgkins's and non-Hodgkins's lymphomas. **Cancer Surveys**. v. 19-20, p. 423-453, 1994;

HJALGRIM, H. On the aetiology of Hodgkin lymphoma. **Danish Medical Journal**. v. 59, p. 1-22, 2012;

HUNGRIA, V. T. M. Mieloma múltiplo no Brasil: aspectos clínicos demográficos e validação do Sistema Internacional (ISS) em pacientes brasileiros. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. n. 29, p. 10-13, 2007;

INAL, A. et al. Prognostic factor in first-line chemotherapy treated metastatic gastric cancer patients: a retrospective study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. n. 13. p. 3869-3872, 2012;

JAIN, P. et al. Th17 and non-Th17 IL-17-expressing cells in chronic lymphocytic leukemia: delineation, distribution, and clinical relevance. **Haematologica**. v. 4, n. 97, p. 599-607, 2011;

JEMAL, A., et al. Cancer statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. n. 52, p. 23-47, 2002.

JUNG Y. et al. IL-1 β mediated up-regulation of HIF-1 α via an NF κ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. **The FASEB Journal express article**.

2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1096/fj.03-0329fje>>. Acesso em: 30 jun. 2012;

KARIN M.; GRETEN, F. R. NF- κ B: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. **Nature Reviews Immunology**. n. 5, p. 749–759, 2005;

KEIBEL, A.; SINGH V.; SHARMA, M. C. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. **Current Pharmaceutical Design**. n. 15, p. 1949-1955, 2009;

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6: a pleiotropic cytokine and Th17 Cells. **Th17 Cells in Health and Disease**. p. 47-62, 2011;

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**. n. 27, p. 485-517, 2009;

LASKY, F. D. et al. Evaluation of a bromocresol purple method for the determination of albumin adapted to the DuPont aca discrete clinical analyzer. **Clinical Biochemistry**. n. 18, p. 290-296, 1985.

LAURENT, C. et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. **Blood**. v. 118 n. 205371-5379, 2011;

LEDUE, T. B. et al. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum. **Annals Clinical Biochemistry**. n. 35, p. 745-53, 1998;

LIN, W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. n. 117, p. 1175–1183, 2007;

MANTOVANI, A. et al. Cancer-related Inflammation. **Nature**, v. 454, n. 24, p. 436-444, 2008;

MARTIN-OROZCO, N. et al. Th17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. **Immunity**. v. 5, n. 31, p. 787–798, 2009;

MARUYAMA, T. et al. Distribution of Th17 cells and FoxP3⁺ regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. **Cancer Science**. v. 101, n. 9, p. 1947-1954, 2010;

MITELMAN, A. K. et al. Quantificação das citocinas séricas Th1/Th2 por citometria de fluxo no linfoma de Hodgkin clássico. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 2009; 31(4):260-266;

MONEGO, E. T. et al. **Antropometria: manual de técnicas e procedimentos**. 2 ed. Goiânia (GO): Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição da Região Centro-Oeste/ MS/ UFG, 2003;

MOUNTER, P. J.; LENNARD, A. L. Management of non-Hodgkin's Lymphomas. **The Fellowship of Postgraduate Medicine**. n. 75, p. 2-6, 1999;

MUNEGOWDA, M. A. et al. Th17 and Th17-stimulated CD8⁺ T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. **Cancer Immunology Immunotherapy**. n. 60, p. 1473-1484, 2011;

MURUGAIYAN, G.; SAHA, B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. **The Journal of Immunology**. n. 183, p. 4169-4175, 2009;

NIARAGH, J. F. et al. Downregulation of IL-17-producing T cells is associated with regulatory T cell expansion and disease progression in chronic lymphocytic leukemia. **Tumour Biology**. n. 34, p. 929-940, 2013;

NUMASAKI, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. **Blood**. v. 7, n. 101, p. 2620-2627, 2003;

NUMASAKI, M.; LOTZE, M. T.; SASAKI, H. Interleukin-17 augments tumor necrosis factor induced elaboration of proangiogenic factors from fibroblasts. **Immunology Letters**. n. 93, p. 39-43, 2004;

ONIS, M. et al. Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bulletin of the World Health Organization**. n. 85, p. 660-667, 2007;

OUYANG, W., et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annual Review of Immunology**. v. 29, p. 71-109, 2011;

PAGES, F. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. **Oncogene**. n. 29, p. 1093-1102, 2010;

PARK, H. et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. **Nature Immunology**. v. 11, n. 6, p. 1133–1141, 2005;

PECK, A.; MELLINS, E. D. Plasticity of T-cell phenotype and function: the T helper type 17 example. **Immunology**. n. 129, p. 147-153, 2009;

POLYCHRONAKIS, I. et al. Work-related leucemia: a systematic review. **Journal of Occupational Medicine and Toxicology**. n. 8, p. 1-16, 2013;

PORTLOCK, C. **Hodgkin Lymphoma**, 2012. Disponível em: http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/lymphomas/hodgkin_lymphoma.html> Acesso em: 19 jun. 2013;

PORTLOCK, C. **Non-Hodgkin Lymphomas**, 2012. Disponível em: http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/lymphomas/non-hodgkin_lymphomas.html> Acesso em: 19 jun. 2013;

READ J. A., et al. Nutritional intervention using an eicosapentaenoic acid (EPA)-containing supplement in patients with advanced colorectal cancer. Effects on nutritional and inflammatory status: a phase II trial. **Support Care Cancer**. n. 15, p. 301-307, 2007;

REICHERT, T., et al. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. **Clinical Immunology Immunopathology**. n. 60, p. 190-208, 1991;

RYTTING, M. E. **Acute leukemia**, 2012. Disponível em: http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/leukemias/acute_leukemia.html> Acesso em: 19 jun. 2013;

RYTTING, M. E. **Chronic leukemia**, 2012. Disponível em: <http://www.merckmanuals.com/professional/hematology_and_oncology/leukemias/chronic_leukemia.html> Acesso em: 19 jun. 2013;

ROSS, P. J. et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? **British Journal of Cancer**. n. 90, p. 1905–1911, 2004;

SALMINEN, A. et al. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. **Ageing Research Reviews**. n. 7, p. 83-105, 2008;

SELVIN, E.; PAYNTER, N. P.; ERLINGER, T. P. The Effect of Weight Loss on C-Reactive Protein: A Systematic Review. **Archives of Internal Medicine**. v. 167, 2007;

SILVA, G. C. et al. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas Laboratory diagnosis of acute myeloid leucemias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 42, n. 2, p. 77-84, 2006;

SUCRO, L. V. et al. Mieloma múltiplo: diagnóstico e tratamento. **Revista Médica de Minas Gerais**. n. 19, p. 58-62, 2009;

SUNDRUD, M. S. et al. Cell Differentiation T Cells Reveals Functional Plasticity in Th Genetic Reprogramming of Primary Human. **The Journal of Immunology**. n. 171, p. 3542-3549, 2003;

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4 ed. Geneva: WHO Press, 2008;

TAKAHASHIA, H. et al. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. **Immunology Letters**. n. 98, p. 189–193, 2005;

TANNO, T.; MATSUI, W. Development and maintenance of cancer stem cells under chronic inflammation. **Journal of Nippon Medical School**. n. 78, p. 138-145, 2011;

VAN DER MEIJ, B. S. et al. Oral nutritional supplements containing (n-3) polyunsaturated fatty acids affect the nutritional status of patients with stage III non-small cell lung cancer during multimodality treatment. **The Journal of Nutrition: Nutrition and Disease**. n. 110, p. 1774-1779, 2010;

WEI, G. et al. Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. **Immunity**. v. 1, n. 30, p. 155-167, 2009;

WILMORE, S. J. et al. The effect of polyunsaturated fatty acids on the progress of cachexia in patients with pancreatic cancer. **Supplement to Nutrition**. v. 12, n.1, 2006;

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Technical Report n°. 854. **Physical Status: The use and interpretation of antropometry**. Geneva, Switzerland: WHO, 1995;

_____. **BMI classification**. Geneva, Switzerland: WHO, 2008;

Disponível em:

<http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html>. Acesso em: 02 jul. 2012;

WU, C. et al. Increased frequencies of T helper type 17 cells in the peripheral blood of patients with acute myeloid leukaemia. **Clinical and Experimental Immunology**. n. 158, p. 199-204, 2009;

YANG, S. et al. Foxp3+IL-17+ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. **Journal of Leukocyte Biology**. n. 89. p. 85-91, 2011;

YU, H.; KORTYLEWSKI, M.; PARDOLL, D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**. n. 7, p. 41-51, 2007;

ZHU, J., PAUL W E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**. v. 112, n. 5, 2008;

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, numa pesquisa científica resultante de parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina e o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU). Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento (nas duas vias). Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Caso recuse participar, você não será penalizado (a) de forma alguma. Se tiver alguma dúvida procure o Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC) no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) no Campus Trindade (Florianópolis-SC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

1. Instituição sede da pesquisa: Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (LIDoC) no Departamento de Ciências Fisiológicas (CFS) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) no Campus Trindade (Florianópolis-SC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Telefone fixo: (48) 3721-2289.

2. Título do projeto: *Impacto da suplementação oral com óleo de peixe sobre a concentração de citocinas e proporção de populações linfocitárias no sangue periférico de pacientes com neoplasias hematológicas malignas em tratamento quimioterápico.*

3. Pesquisador responsável: Prof. Dr. Everson Araújo Nunes.

4. Garantia de informação e desistência: Você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer ponto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação, a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

5. Descrição do estudo: A pesquisa acontecerá no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, localizado no Campus Universitário, bairro Trindade no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina. Serão convidados a participar do estudo pessoas com

diagnóstico de câncer hematológico (no sangue), que tenham indicação de iniciar quimioterapia neste hospital.

O objetivo deste estudo é avaliar o estado nutricional e indicadores no sangue de pessoas que ingeriram ou não cápsulas de óleo de peixe durante nove semanas de tratamento. Os indivíduos serão avaliados apenas por profissionais da saúde (médicos, nutricionistas, enfermeiros, etc.) devidamente treinados e vinculados às instituições parceiras. Haverá contatos telefônicos com os pacientes uma vez por semana, a fim de acompanhar o andamento do estudo. Para avaliar o estado nutricional serão feitas medidas como: peso, altura, circunferência do braço, dobras cutâneas e questionários sobre sua alimentação e resposta ao tratamento. Essas avaliações comentadas serão realizadas em três momentos: imediatamente antes de iniciar a quimioterapia, na quarta ou quinta semana após a primeira sessão de quimioterapia e nove semanas após a primeira sessão de quimioterapia. No primeiro e no terceiro momento será necessário que você forneça 20 mL de sangue (totalizando 40 mL na soma dos dois momentos) que serão coletados pela equipe do laboratório de análises clínicas do HU. Essas amostras de sangue deverão ser coletadas em tubos de tampa verde e serão usadas para dosagem de substâncias e células que servirão de indicadores para os possíveis efeitos do óleo de peixe. Também serão avaliadas as quantidades de lipídeos (gorduras) existentes em suas células. Amostras de seu sangue e células ficarão armazenadas em freezer na UFSC por período máximo de doze meses para realização das dosagens. Posteriormente a este período, qualquer resto de amostra será descartada de maneira apropriada em lixo biológico hospitalar.

Os participantes serão distribuídos em dois grupos (suplementado e não suplementado), sendo que os pacientes do grupo suplementado serão orientados a ingerir suplemento nutricional de óleo de peixe ao longo de nove semanas na quantidade diária de 2 g. A distribuição dos voluntários para um dos dois grupos será realizada por sorteio e você não pode escolher qual dos grupos quer compor. Ainda existe dúvida se é necessário ou não recomendar óleo de peixe durante a quimioterapia, assim o resultado da pesquisa pode trazer informações importantes para pessoas que fazem quimioterapia.

6. Coleta de amostra, riscos e desconfortos: Sua principal colaboração para o estudo será possibilitando a realização de medidas, respondendo a perguntas, além de fornecer 40 mL (quarenta mililitros) de sangue venoso. O correspondente a quatro tubos próprios para coleta a vácuo de 10 mL. O sangue será coletado de veias do seu braço (esquerdo ou

direito) com o auxílio de tubos e agulhas descartáveis próprios para isso, por profissional treinado e habilitado. É importante destacar que durante a coleta de sangue pode existir certo desconforto decorrente da entrada da agulha e/ou retirada do sangue venoso. Adicionalmente, em casos raros, o local perfurado pela agulha pode apresentar formação de hematoma (roxos) e sensação de dor quando pressionado nas horas e/ou dias após a coleta. *Importante: Se você for alérgico a peixe e derivados de peixe, NÃO aceite participar do estudo.* Os procedimentos que serão realizados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade.

7. Benefícios: Ao participar desta pesquisa você não terá nenhum benefício direto (financeiro, por exemplo). Entretanto, esperamos que este estudo contribua com informações importantes à ciência. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos (mantendo sua identidade sobre sigilo). Os resultados podem trazer benefícios a todos os seres humanos envolvidos em quimioterapia no futuro.

8. Custos: O estudo não prevê custos aos sujeitos, pois os procedimentos serão realizados no próprio hospital onde já é realizado o tratamento da doença e as cápsulas (para quem fizer uso) de óleo de peixe serão fornecidas gratuitamente pelos pesquisadores.

9. Esclarecimentos e dúvidas: A participação no estudo não ocasionará custos para você e não será fornecido nenhum ressarcimento financeiro. Qualquer dúvida a respeito da pesquisa podem ser sanadas pelos seguintes meios: telefone fixo: (48) 3721-2289; telefone celular: (48) 9981-8511 ou (47) 9185-3221; e-mail: lidocufsc@gmail.com, com Prof. Dr. Everson A. Nunes, Paula Fernanda de Oliveira e Dayanne da Silva Borges Betiati.

Os pesquisadores manterão em sigilo a sua identidade. Os resultados da pesquisa serão enviados para você, se for pedido, e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você **não** será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste documento será arquivada no Laboratório de Investigação de Doenças Crônicas (CFS/CCB-UFSC) e outra cópia será fornecida a você.

Prof. Dr. Everson Araújo Nunes
(Pesquisador responsável)

Paula Fernanda de Oliveira
(Mestranda)

Dayanne da Silva Borges Betiati
(Mestranda)

CONSENTIMENTO DO SUJEITO DE PESQUISA

Eu, _____, RG nº _____ abaixo assinado, concordo de maneira livre e esclarecida em participar, na condição de sujeito de pesquisa, do estudo que tem como título “*Impacto da suplementação oral com óleo de peixe sobre a concentração de citocinas e proporção de populações linfocitárias no sangue periférico de pacientes com neoplasias hematológicas malignas em tratamento quimioterápico.*”. Fui devidamente informado (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como sobre os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento, assistência e/ou tratamento.

Florianópolis, Santa Catarina, _____ de _____ de 20____.

Nome completo e legível

Assinatura

*PARTICIPAÇÃO DE MENORES – ASSINATURA DOS
RESPONSÁVEIS LEGAIS*

Eu, _____, RG nº _____, tendo como telefone para contato o nº _____, responsável legal pelo menor _____, RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo com a sua participação, como voluntário, no projeto de pesquisa acima descrito.

(Responsável legal pelo sujeito da pesquisa)

Prof. Dr. Everson Araújo Nunes
(Pesquisador responsável)

Paula Fernanda de Oliveira
(Mestranda)

Dayanne da Silva Borges Betiati
(Mestranda)

Florianópolis, ____/____/_____.

Apêndice B – Formulário para Coleta de Dados

I – IDENTIFICAÇÃO

Nº prontuário HU: _____ Nº identificação na pesquisa:

Nome:		
Sexo:	Data de nascimento:	Cor da pele:
Telefones:		
E-mail:		
Procedência/Endereço		

Diagnóstico/Localização:

Estadiamento:

Comorbidades/ Doenças prévias:

Protocolo QT:

Outros fármacos utilizados:

Tabagista: () Sim () Não Nº cigarros/dia: _____

Consumo de bebida alcoólica (quantidade/ frequência): _____

Prática de atividade física (tempo/ frequência): _____

II – AVALIAÇÃO ANTROPOMÉTRICA:

Altura:	P. Atual:	IMC:
Classificação IMC:		
P. Usual:	% PP:	Tempo PP:
Classificação Perda de Peso:		
CB:	CB%:	Classificação CB%:
DCT:	DCT%:	Classificação DCT%:
CMB:	CMB%:	Classificação CMB:

III – AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA:**Marcadores inflamatórios:**

Marcador	Valor
IL-6	
IL-10	
IL-17A	
TNF	
Th17	

ANEXO A

Anexo A – Parecer Consubstanciado – CEP/UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Suplementação oral com óleo de peixe e seus efeitos sobre concentração de citocinas e proporção de populações linfocitárias no sangue periférico de pacientes com neoplasias hematológicas malignas em tratamento quimioterápico

Pesquisador: Everson Araujo Nunes

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 03194212.2.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 120.066

Data da Relatoria: 08/10/2012

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo denominado pelos pesquisadores como de fase 1/2 e que pretende avaliar o uso de suplementação nutricional de óleo de peixe na dieta de pacientes com doenças hematológicas malignas atendidos no Hospital universitário/UFSC sua contribuição para a melhora do processo de adoecimento.

Objetivo da Pesquisa:

Avallar status inflamatório nutricional através de citocinas plasmáticas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF- α) e variação nas populações de linfócitos Th1, Th2, Th 17, Treg e T FoxP3+IL-17A+ de indivíduos adultos com neoplasias hematológicas em tratamento quimioterápico antes e após suplementação ou não com óleo de peixe.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para os pesquisadores Não existem riscos conhecidos do protocolo proposto. Estudos anteriores envolvendo integrantes do grupo de pesquisa já efetuaram protocolo similar onde existiam. Contudo, não se pode retirar a hipótese do óleo causar algum tipo de desconforto (ex: náusea), visto que os indivíduos estarão em quimioterapia e terão que ingerir cápsulas.

Os potenciais benefícios estão nas possíveis ações imunomodulatórias dos ácidos graxos existentes no óleo de

peixe. Estas ações podem fazer com que o estado nutricional seja menos afetado pelo tratamento

Endereço: Campus Universitário Reitor Jolão David Ferreira Lima
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-5206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br

quimioterápico, o que pode diretamente melhorar o curso das diversas abordagens contra a doença

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É uma pesquisa bem estruturada, com descrição detalhada dos procedimentos para coleta de dados em todos os aspectos do projeto. Apresenta uma relevância científica inegável por tentar melhorar a qualidade de vida dos pacientes com doença hematológica maligna do ponto de vista nutricional e de desenvolvimento de competência do organismo para melhora do adoecimento

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores apresentaram toda a documentação de acordo com o solicitado, incluindo a revisão da linguagem utilizada no TCLE, tornando-a mais apropriadamente para o entendimento de pessoas não vinculadas a área da saúde.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

FLORIANÓPOLIS, 10 de Outubro de 2012

Assinador por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Campus Universitário Reitor Jolo David Ferreira Lima
Bairro: Trindade CEP: 88.040-900
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-9206 Fax: (48)3721-9696 E-mail: cep@reitoria.ufsc.br