



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

DIEGO SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DE
LINHAGEM MIELÓIDE ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA DE INDUÇÃO EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS PRECURSORAS B.**

**FORTALEZA
2018**

DIEGO SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DE LINHAGEM MIELÓIDE ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA DE INDUÇÃO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B.

Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes

Co-Orientador: Dr. Daniel Mazza Matos

**FORTALEZA
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L697a Lima, Diego Silva.
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DE LINHAGEM MIELÓIDE ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA DE INDUÇÃO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B. / Diego Silva Lima. – 2018. 100 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos - Associação UFC/UFPB/UFRN/UFRPE, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Prof. Dr. Daniel Mazza Matos.

1. leucemia linfoblástica aguda. 2. imunofenotipagem. 3. células supressoras derivadas mielóides. 4. quimioterapia de indução. I. Título.

CDD 615.1

DIEGO SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DE LINHAGEM MIELÓIDE ANTES E APÓS QUIMIOTERAPIA DE INDUÇÃO EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B.

Tese de doutorado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos (DITM) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor.

Aprovada em: ___/___/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Alcínia Braga de Lima Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Ajax Nogueira Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dra. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof^ª. Dra. Arlandia Cristina Lima Nobre de Morais
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos que residem em meu coração, Flávio,
Elisoneide, Thiago, Lícia, e dona Elisa.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio Aguiar de Lima e Elisoneide Silva Lima, pelo amor, proteção, incentivo e investimento pessoal e profissional não só durante este período, mas por toda a minha vida. Para vocês meu eterno obrigado e gratidão.

À minha orientadora Dra. Romélia Gonçalves Pinheiro, por ajudar na concretização deste projeto. Que possamos unir forças e investir ainda mais tempo e esforços em prol da pesquisa. Tenho a senhora como minha segunda mãe.

Ao Dr. Daniel Mazza Matos, meu coorientador, pela compreensão e incentivo durante toda esta trajetória, que nossos caminhos continuem se cruzando por muitas e muitas vezes.

Ao meu irmão, Thiago Silva Lima, pela amizade e companheirismo que tanto foram importantes nos momentos difíceis. Obrigado pelos momentos de descontração.

À Lícia Beserra Marques, por entender e por estar ao meu lado em vários momentos durante a execução desse projeto e torná-los mais suaves, calmos e tranquilos.

Ao Dr. Jesamar Correia, pela amizade, conselhos e brilhante profissionalismo. Obrigado por acreditar e incentivar meu crescimento profissional. Meu muito obrigado.

À Dra. Fátima Guerreiro, pessoa de fibra e dedicação profissional, amiga em todos os momentos, seus conselhos foram todos bem recebidos.

Ao Dr. Luís Xavier, pessoa e profissional excepcional, a quem sigo o exemplo. Muito obrigado pelos conselhos.

À amiga Thayna Nogueira, pelo profissionalismo e ajuda na aquisição dos dados por citometria de fluxo. Sem sua ajuda esse trabalho não teria sido concluído.

Aos amigos Pedro e Tarcísio, pela paciência em tentar me ensinar a compreender bioestatística.

Aos amigos de doutorado, Renata, Paloma, Suellen, Danielle, Babi, Eric, Mara, Laís, Malu e Robertinho, e tantos outros, muito obrigado pelo companheirismo e incentivo.

As minha colegas de trabalho diário, Juliana e Thalyta, pela compreensão e ajuda na compilação dos dados clínico-laboratoriais.

Aos demais amigos do Centro de Referência no Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins, os quais considero uma segunda família.

A todo o corpo docente do programa de Desenvolvimento e Inovação Tecnológica de Medicamentos (UFC), por transmitir o conhecimento e me levar ao amadurecimento profissional.

A todas as outras pessoas que me ajudaram e apoiaram direta ou indiretamente.

Obrigado especial ao bom Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE
INSTITUIÇÕES:**

1. Universidade Federal do Ceará (UFC).
2. Centro de Referência no Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins (CRDCCAMM) do Hospital Infantil Albert Sabin.
3. Laboratório Clementino Fraga.

"A descoberta consiste em ver o que todos
viram e em pensar no que ninguém pensou."

Albert Szent-Gyorgy

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença maligna caracterizada por proliferação clonal e acúmulo de células progenitoras que estão envolvidas na diferenciação de células linfóides na medula óssea e, conseqüentemente, na supressão da hematopoiese normal e na substituição de elementos normais, afetando outros órgãos, como fígado, baço, nódulos linfáticos, timo, testículos, sistema nervoso central e meninges. O sucesso no tratamento da LLA-B pediátrica aumentou consideravelmente nas últimas décadas e novas estratégias de tratamento e manejo alcançaram uma taxa de sobrevivência livre de doença de mais de 90% para pacientes pediátricos. Apesar disso, muitos pacientes apresentam recidiva da doença após a resposta inicial e este evento pode estar associadas à modulação imunológica no local do tumor. De fato, no microambiente tumoral, a imunossupressão é um evento comum e resulta da inibição de células imunes ativadas e da geração de células com uma capacidade imunossupressora mais forte, denominadas células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs). As MDSCs representam uma população heterogênea de células mielóides imaturas (IMCs) que derivam de um progenitor mielóide comum e que possuem forte atividade imunossupressora sobre a funcionalidade das células T CD8⁺ e das células NK (*natural killer*). A presença dessas células no microambiente tumoral foi associada à progressão tumoral, angiogênese, invasão local, metástase e resistência quimioterápica. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de células supressoras derivadas da linhagem mielóide (M-MDSCs especificamente) antes e após a quimioterapia de indução em pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-B) e, além disso, verificar se o tratamento quimioterápico possui qualquer efeito sobre estas células. Amostras de sangue periférico (PB) e medula óssea (BM) foram coletadas de 15 pacientes pediátricos não tratados e selecionados de forma randômica. A idade variou entre 1 e 17 anos, com média de 8,5 anos. A expressão de M-MDSCs foi avaliada no momento do diagnóstico e no final da quimioterapia de indução por citometria de fluxo. Nossos dados mostraram um aumento da expressão de M-MDSCs em 60% (9/15) dos pacientes ao final da terapia de indução, em ambos os compartimentos avaliados. Esses dados foram estatisticamente significativos para análise realizada em medula óssea e em sangue periférico, $p=0,0012$ e $p=0,0006$, respectivamente. No entanto, não conseguimos associar o aumento na expressão de M-MDSCs com as variáveis idade, sexo, estratificação de risco e achados genéticos. Em resumo, o aumento da expressão de M-MDSC foi observado ao final da quimioterapia de indução, o que nos leva a acreditar que essas alterações, provavelmente, possam ter sido induzidas pelo processo inflamatório gerado pelo tratamento citotóxico ou pelos fármacos utilizados no tratamento quimioterápico. Os dados apresentados em nosso estudo sugerem que a expressão de M-MDSCs deve ser avaliada na próxima revisão do protocolo GBTLI (grupo brasileiro para o tratamento de leucemias infantis) pois pode ser útil para orientar novas abordagens terapêuticas contemplando drogas imunomoduladoras que atuam na depleção dessas células.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda; imunofenotipagem; células supressoras derivadas mielóides; quimioterapia de indução.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease characterized by clonal proliferation and accumulation of progenitor cells that are involved in the differentiation of lymphoid cells in the bone marrow and consequently results in suppression of normal hematopoiesis and replacement of normal elements, affecting other organs such as liver, spleen, lymph nodes, thymus, testis, central nervous system and meninges. Success in the treatment of pediatric B-ALL has increased considerably in recent decades and new treatment and management strategies have achieved a disease-free survival rate of over 90% for pediatric patients. Despite this, many patients experience relapse of the disease after initial response and develop serious complications due to side effects and adverse treatment reactions, which may be associated with immune modulation at the tumor site. In fact, in tumor microenvironment, immunosuppression is a common event and results from the inhibition of activated immune cells and generation of cells with a stronger immunosuppressive capacity, denominated myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). MDSCs represent a heterogeneous population of immature myeloid cells (IMCs) that derive from a common myeloid progenitor and possess strong immunosuppressive activity on the functionality of CD8⁺ T cells and NK cells (natural killer). The presence of these cells in the tumor microenvironment was associated with tumor progression, angiogenesis, local invasion, metastasis and chemotherapeutic resistance. The aim of this study was to evaluate the expression of myeloid-derived suppressor cells (M-MDSCs specifically) before and after induction chemotherapy in pediatric patients with diagnosis of *de novo* B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and, moreover, verify whether the chemotherapeutic treatment has any effect on these cells. Peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were collected from 15 untreated and randomly pediatric patients. The age ranged from 1 to 17 years, with an average of 8.5 years. The expression of M-MDSCs was evaluated at diagnosis and in the end of induction chemotherapy by flow cytometry. Our data showed an increase of M-MDSCs expression in 60% (9/15) of the patients at the end of the induction therapy, in both evaluated compartments. These data were statistically significant for both bone marrow and peripheral blood analysis, $p=0,0012$ and $p=0,0006$, respectively. However, we were not able to associate the increase in M-MDSCS expression with age, gender, risk stratification and genetic findings. In resume, the increase in M-MDSC expression was observed in the end of induction chemotherapy, which leads us to believe that these changes probably could have been induced by the inflammatory process engendered by the cytotoxic treatment or by drugs used in the chemotherapy treatment. The data presented in our study suggest that M-MDSCs expression should be evaluated in the next revision of the GBTLI protocol (brazilian group for the treatment of childhood leukemias), since it may be useful to guide new therapeutic approaches contemplating immunomodulatory drugs that act in the depletion of these cells.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia; immunophenotyping; myeloid-derived supressor cells; induction chemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	- Estimativa de casos novos de leucemia para homens e mulheres por 100 mil habitante.....	24
Figura 2.	- Frequência dos principais rearranjos genéticos observados nas LLAs.....	25
Figura 3.	- Fluxograma esquemático para estratificação de risco para pacientes com LLA-B.....	30
Figura 4.	- Principais características determinantes no câncer.....	34
Figura 5.	- Modelo “dois sinais” de acúmulo e ativação de MDSCs.....	37
Figura 6.	- Mecanismos moleculares de proliferação e acúmulo de MDSCs.....	39
Figura 7.	- Mecanismos moleculares de ativação de MDSCs.....	39
Figura 8.	- Interação entre MDSCs e células T.....	45
Figura 9.	- Fluxograma de análise de amostras.....	53
Figura 10.	- Estudo citogenético paciente número 1.....	64
Figura 11.	- Resultado RT-PCR paciente número 1.....	64
Figura 12.	- <i>Dot-plots</i> paciente número 1 ao D0 e D35.....	68
Figura 13.	- Comparação de médias do número de eventos em MO em D0 e D35.....	70
Figura 14.	- Comparação de médias do número de eventos em SP em D0 e D35.....	71
Figura 15.	- Correlação do número de eventos no momento D0 no SP e MO.....	72
Figura 16.	- Correlação do número de eventos no momento D35 no SP e MO....	72
Figura 17.	- Associação entre gênero e idade com casos positivos e negativos para expressão de M-MDSCs.....	73
Figura 18.	- Associação entre grupos de risco, cariótipo e presença de mutação com os casos positivos e negativos para expressão de M-MDSCs...	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	- Painel anticorpos monoclonais para LLA-B.....	55
Tabela 2.	- Relação de fusões gênicas pesquisadas e <i>primers</i> utilizados.....	58
Tabela 3.	- Dados e estratificação de risco.....	62
Tabela 4.	- Resultados de cariótipos e estudo molecular.....	63
Tabela 5.	- Resultados de imunofenotipagem para detecção de M-MDSCs em SP e MO.....	66
Tabela 6.	- Dados consolidados de todos os pacientes.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	- Classificação da OMS para neoplasias de precursores linfóide B.....	27
Quadro 2.	- Alterações genéticas recorrentes e associação com imunofenótipo e prognóstico.....	28
Quadro 3.	- Estratificação de risco de LLA-B (Protocolo GBTLI-2009).....	29
Quadro 4.	- Identificação de MDSCs com base no perfil imunofenotípico.....	41
Quadro 5.	- Principais quimiocinas sintetizadas por tumores para recrutamento de leucócitos.....	42
Quadro 6.	- Características fenotípicas e funcionais de neutrófilos, monócitos e MDSCs.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcMo	Anticorpo monoclonal
aCGH	Hibridização genômica comparativa baseada arranjo
ARG1	Arginase-1
aSNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo baseado em arranjo
CAF	Fibroblastos associados ao tumor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CNV	Variações no número de cópias
CTH	Células tronco hematopoéticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metil-transferase
DRM	Doença residual mínima
EBV	Vírus do Epstein Barr
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
G-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítico
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância
GM-CSF	Fator estimulador de colônia granulocítico-macrofágico
HIF1 α	Fator 1-alfa induzido por hipóxia
IDO1	<i>Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase</i>
IL	Interleucina
IMC	Células mielóides imaturas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN- γ	Interferon gama
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzível
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras T
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LPS	Lipopolissacárideo

M-CSF	Fator estimulador de colônia macrofágico
mAb	Anticorpo monoclonal
MADIT	Metotrexato, citarabina e dexametasona intratecal
MAT	Microambiente tumoral
MDSC	Célula supressora derivada de linhagem mielóide
MET	Transição mesequimal-epitelial
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
miRNA	MicroRNA
MLPA	Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação
MO	Medula óssea
NK	Células natural <i>killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação da cadeia polimerase
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidil-inositol trifosfato
SNC	Sistema nervoso central
SP	Sangue periférico
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TAM	Macrófago associado a tumor
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Leucemia Linfoblástica aguda.....	22
<i>2.1.1</i>	<i>Epidemiologia.....</i>	<i>23</i>
<i>2.1.2</i>	<i>Patogênese.....</i>	<i>24</i>
<i>2.1.3</i>	<i>Diagnóstico e Classificação.....</i>	<i>27</i>
<i>2.1.4</i>	<i>Estratificação de Risco.....</i>	<i>28</i>
<i>2.1.5</i>	<i>Tratamento das LLAs.....</i>	<i>31</i>
2.2	Microambiente Tumoral.....	32
2.3	Células Supressoras Derivas de Linhagem Mielóide.....	35
<i>2.3.1</i>	<i>Origem, acúmulo e ativação das MDSCs.....</i>	<i>36</i>
<i>2.3.2</i>	<i>Classificação das MDSCs.....</i>	<i>40</i>
<i>2.3.3</i>	<i>Recrutamento das MDSCs ao Microambiente Tumoral.....</i>	<i>41</i>
<i>2.3.4</i>	<i>Mecanismos efetores de imunossupressão mediados por MDSCs.....</i>	<i>43</i>
3.	OBJETIVOS.....	49
3.1.	Objetivo Geral.....	49
3.2	Objetivos Específicos.....	49
4.	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	51
4.1	Desenho do Estudo.....	51
4.2.	Local de Realização do Estudo.....	51
4.3.	Casuística e Metodologia.....	51
<i>4.3.1</i>	<i>Casuística e captação de pacientes.....</i>	<i>51</i>
<i>4.3.2</i>	<i>Métodos.....</i>	<i>52</i>
<i>4.3.3</i>	<i>Análise citomorfológica de medula óssea.....</i>	<i>53</i>
<i>4.3.4</i>	<i>Análise imunológica (Imunofenotipagem - HIAS).....</i>	<i>54</i>
<i>4.3.5</i>	<i>Análise citogenética convencional.....</i>	<i>56</i>
<i>4.3.6</i>	<i>Biologia molecular.....</i>	<i>56</i>
<i>4.3.7</i>	<i>Avaliação da expressão de MDSCs (Imunofenotipagem - LCF).....</i>	<i>58</i>
4.4	Análise Estatística.....	59

4.5	Aspectos Éticos.....	59
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Estratificação de Risco.....	61
5.2	Estudo genético.....	62
5.3	Expressão de M-MDSCs em D0 e D35 por citometria de fluxo.....	65
5.4	Avaliação estatística	70
6	DISCUSSÃO.....	77
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	86
8	CONCLUSÃO.....	88
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
	ANEXO A - TCLE.....	98
	ANEXO B - PARECER COMITÊ DE ÉTICA.....	99
	APÊNDICE A - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO TRABALHO DE TESE.....	100

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento e diferenciação de todos os componentes celulares sanguíneos é denominado de hematopoese. Nos seres humanos, esse processo inicia no período embrionário e estende-se por toda a vida de um indivíduo, ocorrendo principalmente na medula óssea (MO), a partir de células-tronco hematopoéticas (CTH) que possuem capacidade multipotente e totipotente, isto é, de se diferenciar em diferentes tipos celulares, capacidade de auto-renovação e quiescência (JAGANNATHAN-BOGDAN; ZON, 2013).

Esse processo dinâmico é estritamente controlado e regulado tanto por fatores de crescimento e cascatas de sinalização celular quanto por células estromais presentes no microambiente medular (ANTHONY; LINK, 2014). Ambos os progenitores mielóides e linfóides derivam dessas células, que embora sejam limitadas em número na MO, conseguem se manter relativamente estáveis em número e produzir, após cerca de 20 divisões celulares, em média, aproximadamente 10^6 células sanguíneas maduras, possibilitando assim a homeostase do sistema sanguíneo (DOULATOY *et al.*, 2012).

O processo de linfopoese resulta na geração de células B, T e NK (*Natural Killer*) maduras, sendo todas estas células derivadas de um progenitor linfóide comum. Todas amadurecem na MO e posteriormente migram para órgãos linfóides secundários, como sangue periférico (SP) e linfonodos, com excessão dos linfócitos T imaturos, que antes são direcionadas ao timo, um órgão linfóide primário, para se diferenciarem e tornarem-se células maduras não reativas ao próprio, processo denominado de tolerância central e de extrema importância para o correto funcionamento do sistema imune (CIOFANI; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, 2007; DELVES; ROITT, 2000). Os programas genéticos e epigenéticos de uma CTH regulam, além da sua restrição para uma determinada linhagem, também os processos de proliferação e diferenciação em células sanguíneas maduras, isso ocorre devido ao padrão de ativação e silenciamento de genes específicos envolvidos nesses processos (KRAUSER, 2002). Defeitos nesses programas podem resultar em bloqueio maturativo e perda dos

mecanismos regulatórios entre proliferação e morte celular de células progenitoras, sendo este um dos mecanismos requeridos para a leucemogênese.

Dessa forma, a melhor compreensão sobre a biologia tumoral, os mecanismos de resistência quimioterápica e a interrelação entre as células neoplásicas com as células do hospedeiro são importantes para se estabelecer melhores estratégias terapêuticas e evitar as recaídas da doença.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leucemia Linfoblástica aguda

Apesar da grande heterogeneidade entre as diversas neoplasias humanas todas apresentam uma característica em comum: cada neoplasia constitui um *clone* derivado de uma única célula que sofreu em algum momento do seu desenvolvimento lesões críticas em seu material genético (DNA) e as transmitiu a todas as suas descendentes. Diante da complexidade inerente à ação mutacional, pode-se afirmar que essas lesões (mutações) têm como alvos genes relacionados com os processos de proliferação, diferenciação e morte celular (apoptose), sendo esses alvos facilmente agrupados da seguinte forma: genes reguladores do ciclo celular, genes reguladores da proliferação celular (*proto-oncogenes* e genes supressores tumorais), genes reguladores da apoptose e genes de reparo do DNA (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença maligna caracterizada pela proliferação clonal e acúmulo de células progenitoras comprometidas com a diferenciação de células linfóides na medula óssea e, por consequência resulta em supressão da hematopoese normal e substituição dos elementos normais, podendo, mais adiante, acometer outros órgãos como o fígado, baço, linfonodos, timo, testículos, sistema nervoso central e meninges (HUNGER; MULLIGHAN, 2015; PUI; JEHA, 2007). A transformação maligna decorre do acúmulo de lesões (mutações) e alterações epigenéticas no genoma da célula transformada, como consequência de uma complexa interação envolvendo inúmeros fatores, sejam hereditários, imunológicos, ambientais, exposição à agentes químicos, físicos e biológicos, dentre outros (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007; NAVARRETE-MENEZES; PÉREZ-VERA, 2017).

Clinicamente, a apresentação do quadro sintomatológico da doença é bastante variável, podendo ocorrer de forma insidiosa ou aguda, sendo geralmente acompanhada por

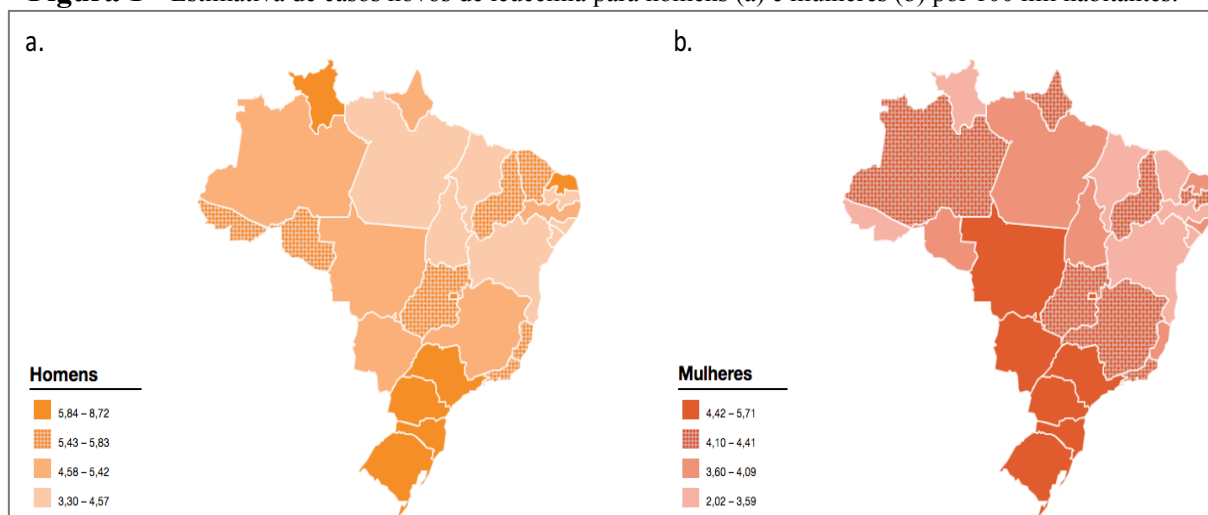
febre, fadiga, palidez, dor óssea, artralgia, mialgia, dores de cabeça, vômito e confusão mental. Linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e outros sítios extramedulares da doença são comuns, porém, o SNC e os testículos são os sítios mais comumente acometidos e que requerem modificações nos esquemas terapêuticos (HUNGER; MULLIGHAN, 2015). Ao diagnóstico, os principais achados hematológicos no sangue periférico são leucocitose, acompanhada de neutropenia, trombocitopenia e anemia, sendo esses achados observados em mais de 90% dos pacientes. As aberrações cromossômicas numéricas do tipo hipodiploidia (<46 cromossomos) e as fusões gênicas *BCR/ABL1* e *MLL/AF4* estão associadas com alta contagem de células brancas e com prognóstico desfavorável (ZHOUL *et al.*, 2012).

2.1.1 Epidemiologia

As LLAs constituem aproximadamente 80% de todas as leucemias da infância e aproximadamente 20% das leucemias em adultos. Em se tratando da população pediátrica, cerca de 80-85% das LLAs são de células precursoras B (LLA-B) e de 15-20% de células precursoras T (LLA-T) (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014; ZHOUL *et al.*, 2012). De modo geral, apresentam padrão de distribuição bimodal com pico inicial entre 2 e 5 anos de idade e um segundo aumento constante iniciando por volta dos 50 anos (HOSSAIN; XIE; McCAHAN, 2014).

No Brasil, os dados apresentados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), em sua publicação "Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil", assim como nos anos anteriores, agrupam os diversos tipos de leucemias em um grande bloco e não faz distinção quanto à faixa etária. Segundo os dados apresentados, estima-se, para cada ano do biênio 2018-2019, a ocorrência de 5.940 e 4.860 casos novos de leucemia por 100.000 habitantes para homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2017). A figura 1 apresenta as distribuições dos casos novos por região do país para ambos os sexos. É importante ressaltar que as características clínicas e biológicas da doença diferem entre os diversos grupos etários, sendo os pacientes adultos e os com idade avançada associados com prognóstico desfavorável (LARSON, 2005).

Figura 1 - Estimativa de casos novos de leucemia para homens (a) e mulheres (b) por 100 mil habitantes.



Fonte: Adaptado de INCA, 2017. Acessado em 17/03/2018.

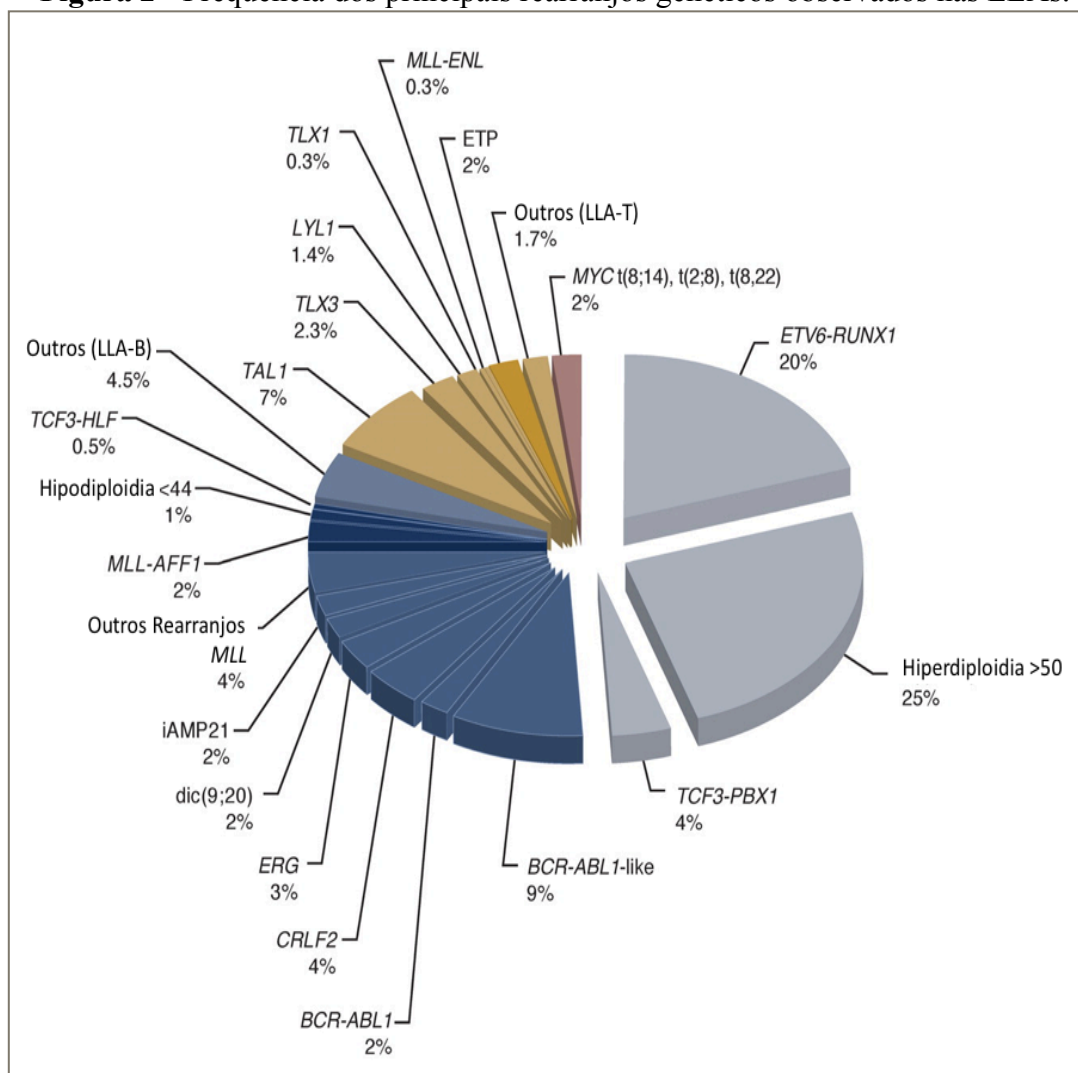
2.1.2 Patogênese

A etiopatogenia específica da doença permanece ainda desconhecida na grande maioria dos casos. Em uma extensa revisão de casos de pacientes pediátricos com LLA, Buffler e colaboradores (2005) elencaram à exposição a hidrocarbonetos, pesticidas, produtos químicos domésticos, radiação ionizante, campo magnético de baixa frequência, dieta e variações genéticas polimórficas como eventos predisponentes para o processo de leucemogênese. Agentes infecciosos têm sido relacionados com LLA em alguns casos específicos como o HTLV-1 e LLA de células T em adultos e o vírus do Epstein-Barr (EBV) e LLA de células B maduras/ linfoma de Burkitt. Uma pequena parcela dos casos de LLA ocorre em pacientes com condições genéticas predisponentes e clinicamente reconhecidas que incluem: síndrome de Down, síndromes de imunodeficiência congênita e síndromes que afetam os mecanismos de reparo do DNA (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; WIEMELS, 2012).

Aproximadamente 80% dos pacientes pediátricos com LLA-B apresentam alterações citogenéticas recorrentes representadas sob a forma de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas, que podem ser rotineiramente detectadas por técnica de bandeamento convencional. A identificação dessas alterações é importante não somente para uma melhor compreensão da biogênese tumoral, mas também para se estabelecer um diagnóstico mais

preciso e uma determinação prognóstica mais eficiente, levando-se em consideração outros fatores como a idade e a contagem global de leucócitos ao diagnóstico, dentre outros (MULLIGHAN, 2012). As principais alterações genéticas observadas na LLA-B estão demonstradas na figura a seguir.

Figura 2 - Frequência dos principais rearranjos genéticos observados nas LLAs.



Fonte: Adaptado de PUI *et al.*, 2012.

O estudo por citogenética convencional (cariótipo com bandeamento G), aliado à técnicas moleculares como FISH (hibridização *in situ* por fluorescência) e PCR (reação da cadeia polimerase), ainda são considerados os métodos de escolha para detecção de aberrações cromossômicas estruturais e/ou numéricas e rearranjos moleculares, em se tratando de doenças tumorais. Porém, com o advento das novas tecnologias mais sensíveis de

avaliação genômica tais como aCGH (hibridização genômica comparativa baseado em arranjo), aSNP (polimorfismo de um único nucleotídeo baseado em arranjo) e MLPA (amplificação multiplex de sondas dependente de ligação) foi possível demonstrar microalterações anteriormente não detectadas, além de CNVs (variações do número de cópias) de genes envolvidos nos processos de proliferação, diferenciação e controle do ciclo celular de precursores linfóides, comumente observadas na LLA-B, sendo suas detecções úteis para estratificação de risco, avaliação da resposta quimioterápica e avaliação da progressão tumoral (MULLIGHAN; DOWNING, 2007). Como exemplo, pode-se citar as alterações dos genes *IKZF1*, *PAX5*, *CDKN2A/B*, *JAK* e *CRLF2* que, em geral, conferem valor preditivo negativo ao prognóstico, no caso do *IKZF1* (gene que codifica a proteína ikaros), um fator prognóstico negativo independente de idade, leucometria e achados citogenéticos (ZHOUL *et al.*, 2012).

Alterações epigenéticas são definidas como os eventos que alteram o padrão de expressão do gene sem, contudo, alterar a sequência linear da cadeia de DNA. Um deles é o processo de metilação do DNA, processo fisiológico desempenhado por uma família de proteínas conhecidas como DNMTs (*DNA metiltransferases*) e que consiste em adicionar um radical metil (-CH₃) ao carbono 5' do anel da citosina (metilcitosina), tendo por consequência o silenciamento gênico (GARCIA-MANERO *et al.*, 2009). Alterações no padrão de metilação das ilhotas CpG (regiões promotoras) foram identificadas em pacientes pediátricos com LLA-B, e sua ocorrência pode estar associada com o processo de leucemogênese e risco de recaída tardia da doença (NORDLUND; SYVÄNEN, 2018).

Outro evento epigenético de extrema importância em se tratando de neoplasias é o papel desempenhado pelos chamados miRNAs (microRNAs), pequenos fragmentos de RNAs fita simples, não codificantes (19-25 nucleotídeos), que participam na regulação pós-transcricional da expressão gênica (NORDLUND; SYVÄNEN, 2018; SUVÀ; RIGGI; BERNSTEIN, 2013). Os miRNAs são requeridos em diversos processos biológicos que incluem proliferação e apoptose e, dessa forma, alterações na sua expressão estão diretamente associados com a transformação leucêmica e com o desenvolvimento de resistência quimioterápica em pacientes com LLA-B (BURKE; BHATLA, 2014).

2.1.3 Diagnóstico e Classificação

De acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em sua última edição revisada, o diagnóstico das LLA-B pode ser definido laboratorialmente por uma contagem de linfoblastos superior a 25% dos elementos figurados da MO e, juntamente com os achados imunofenotípicos e o perfil genético, podem ser classificadas em uma das seguintes categorias: leucemia/linfoma linfoblástico B não especificado anteriormente, leucemia/linfoma linfoblástico B com alterações genéticas recorrentes e leucemia/linfoma linfoblástico T (SWERDLOW *et al.*, 2017). O quadro 1 demonstra a classificação da OMS para neoplasias de precursores linfóides B, enquanto que o quadro 2 relaciona essas alterações com os achados imunofenotípicos e valor prognóstico.

Quadro 1 - Classificação da OMS para neoplasias de precursores linfóides B.

Leucemia/Linfoma Linfoblástico B
Leucemia/Linfoma Linfoblástico B, Sem Outras Especificações
Leucemia/Linfoma Linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR/ABL1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(v;11q23.3); Rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6/RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com Hiperdiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com Hipodiploidia
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3/IGH</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico B com t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3/PBX1</i>
<i>Entidade Provisória:</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B, <i>BCR/ABL1-like</i>
<i>Entidade Provisória:</i> Leucemia/linfoma linfoblástico B com <i>iAMP21</i>

Fonte: Adaptado de ARBER *et al.*, 2016.

Quadro 2 - Alterações genéticas recorrentes e associação com imunofenótipo e prognóstico.

Alteração Genética	Fenótipo	Prognóstico
t(9;22)(q34;q12), <i>BCR/ABL1</i>	CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , CD25 ⁺ , frequente expressão de antígenos mielóides	Desfavorável
t(v;11q23), rearranjo <i>MLL</i>	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , expressão aberrante de antígeno mielóide CD15	Desfavorável
t(12;21)(p13;q22), <i>ETV6/RUNX1</i>	CD19 ⁺ , CD10 ⁻ , expressão aberrante de antígeno mielóide CD13	Favorável
Hiperdiploidia, (>50 e <66 cromossomos)	CD19 ⁺ , CD10 ⁻	Favorável
Hipodiploidia, (<46 cromossomos)	CD19 ⁺ , CD10 ⁻	Desfavorável
t(5;14)(q31;q32), <i>IL3/IGH</i>	CD19 ⁺ , CD10 ⁻	Desfavorável
t(1;19)(q23;p13), <i>TCF3/PBX1</i>	CD19 ⁺ , CD10 ⁺ , IgM citoplasmático +	Favorável

Fonte: Adaptado de McGREGOR; McNEER; GURBUXANI, 2012.

2.1.4 Estratificação de Risco

Um dos pilares para o tratamento da leucemia linfoblástica aguda pediátrica consiste na correta estratificação desses pacientes, baseada em critérios que afetam o prognóstico e o risco de falha terapêutica, no qual os regimes terapêuticos mais agressivos e mais tóxicos são reservados à pacientes estratificados como de alto risco (COOPER; BROWN, 2015; KATO; MANABE, 2018). No Brasil, a estratificação em grupos de risco de recaída e o delineamento terapêutico de pacientes pediátricos com LLA segue o preconizado pelo protocolo multicêntrico intitulado GBTLI (Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda na Infância), e que, atualmente, encontra-se na sua sexta versão (GBTLI-2009) (BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011).

De forma breve, e em se tratando especificamente de pacientes com LLA-B, o protocolo GBTLI-2009 utiliza as informações referentes à idade, contagem leucocitária e o perfil imunofenotípico e genético das células leucêmicas ao diagnóstico (D0) para estratificar inicialmente os pacientes em baixo risco (BR) e alto risco (AR). No oitavo dia de tratamento (D8), os pacientes são avaliados quanto a resposta inicial à corticoterapia (sendo denominado de pré-fase) e então categorizados em baixo risco verdadeiro (BRV), alto risco respondedor rápido (AR-RR) ou alto risco respondedor lento (AR-RL), baseado na contagem de blastos no SP (<1.000 blastos/ mm^3 ou ≥ 1.000 blastos/ mm^3). Outros dois momentos importantes de avaliação quimioterápica ocorrem no décimo quinto dia (D15) e no trigésimo quinto dia (D35), final da última semana de indução, e se baseiam no percentual de blastos ao mielograma. Com base nesse critério, pacientes com MO M₁ (<5% de blastos) e M₂ (5-25% de blastos) possuem prognóstico favorável, enquanto que pacientes com MO M₃ (>25% de blastos) prognóstico desfavorável. Nesses mesmos pontos do protocolo, a avaliação por citometria de fluxo e biologia molecular são importantes, pois irão determinar a doença residual mínima (DRM) (BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011). O quadro 3 demonstra os principais critérios de estratificação de risco para as LLA-B e a figura 3 apresenta, de forma esquemática, o fluxograma da estratificação, segundo o protocolo GBTLI-2009.

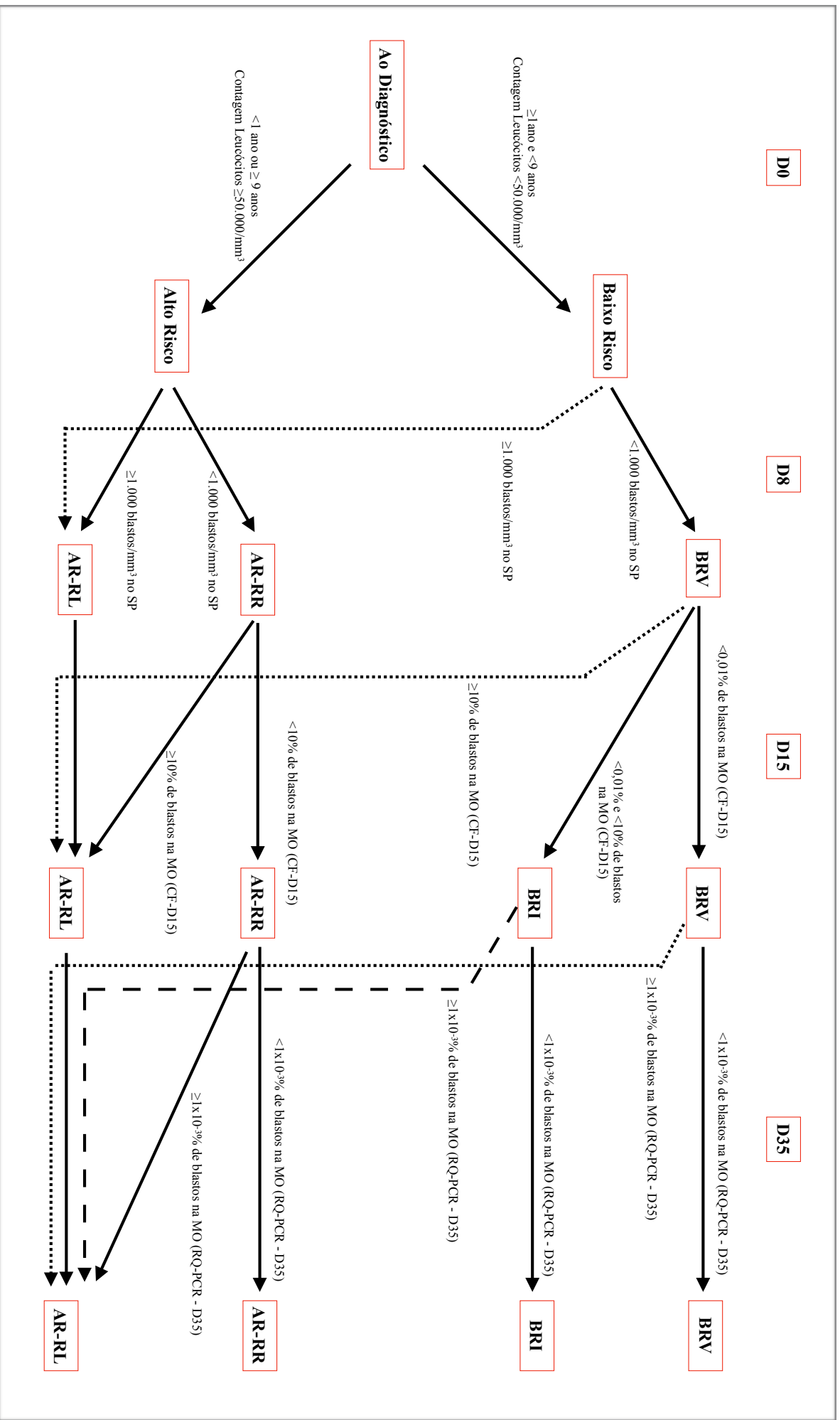
Quadro 3 - Estratificação de Risco de LLA-B (Protocolo GBTLI-2009).

Crítérios para Estratificação de Risco	Alto Risco de Recaída	Baixo Risco de Recaída
Idade	<1 ano ou ≥ 9 anos	≥ 1 ano e <9 anos
Leucometria ao Diagnóstico	≥ 50.000 células/ mm^3	<50.000 células/ mm^3
Citogenética	Presença de alterações de mau prognóstico	Cariótipo normal ou com alterações de bom prognóstico
Contagem de blastos em SP (D8)	≥ 1.000 blastos/ mm^3	<1.000 blastos/ mm^3
Contagem de blastos em MO (D15 e D35)	MO - M ₂ /M ₃	MO - M ₁

M₁ (<5% de blastos); M₂ (5-25% de blastos); M₃ (>25% de blastos); D8 (oitavo dia); D15 (décimo quinto dia); D35 (trigésimo quinto dia);

Fonte: Adaptado de BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011.

Figura 3 - Fluxograma esquemático para estratificação de risco para pacientes com LLA-B.



BRV (baixo risco verdadeiro), **BRI** (baixo risco intermediário), **AR-RR** (alto risco - respondedor rápido) e **AR-RL** (alto risco - respondedor lento).
Fonte: Adaptado de BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011.

2.1.5 Tratamento das LLAs

O tratamento das LLAs segue o preconizado no protocolo GBTLI-2009 e consiste basicamente em quimioterapia ou transplante de células-tronco hematopoéticas, ficando este último reservado para pacientes estratificados como alto risco. O protocolo é dividido em 5 (cinco) fases, a saber: indução da remissão, consolidação da remissão, intensificação, consolidação tardia e manutenção da remissão, e faz uso de poliquimioterapia, baseado na combinação de drogas com diferentes mecanismos de ação (alquilantes, antimetabólitos, antracíclicos, epipodofilotóxicos, dentre outros), com o intuito de evitar o desenvolvimento de resistência, além da administração de quimioterapia intratecal e de radiação do crânio como medidas de profilaxia para o sistema nervoso central (BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011; COOPER; BROWN, 2015; KATO; MANABE, 2018).

Via de regra, os protocolos para terapia de indução da remissão incluem, invariavelmente, glicocorticóide, vincristina e l-asparaginase, pois são drogas que não induzem mielossupressão e, através de mecanismos de ação distintos, atuam de forma sinérgica sobre os blastos leucêmicos, contribuindo para a redução das taxas de morbimortalidade (PUI *et al.*, 2012). O principal objetivo deste bloco de terapia, como o próprio nome diz, é induzir remissão completa do percentual de células leucêmicas e, de fato, aproximadamente 95% de todos os pacientes atingem essa meta, porém, para aqueles pacientes que apresentarem falha indutória, o transplante alogênico de medula óssea é o tratamento indicado (COOPER; BROWN, 2015).

Resumidamente, com base no protocolo GBTLI-2009, a quimioterapia de indução da remissão para pacientes com LLA-B de baixo risco e que dura trinta e cinco dias inclui: dexametasona (6mg/m²), prednisona (60mg/m²), vincristina (1,5mg/m²), daunorrubicina (25mg/m²), l-asparaginase (5000U/m²) e, na presença de indicação clínica, MADIT (metotrexato intratecal, citarabina e dexametasona) (10-12mg/m², 20-24mg/m², 2mg/m², respectivamente). Alternativamente, para pacientes com LLA-B de alto risco, a quimioterapia de indução inclui: prednisona (60mg/m²), vincristina (1,5mg/m²), daunorrubicina (40 mg/m²

por dia), l-asparaginase (10.000U/m²), ciclofosfamida (500mg/m²) e, na presença de indicação clínica, MADIT (metotrexato intratecal, citarabina e dexametasona) (10-15mg/m², 20-30mg/m², 2mg/m², respectivamente) (BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011).

O sucesso no tratamento das LLA-B aumentou consideravelmente nas últimas décadas e com as novas estratégias de tratamento e manejo vem se obtendo um índice de sobrevida livre de doença superior a 90% em se tratando de pacientes pediátricos. Apesar disso, muitos pacientes sofrem recaída da doença após resposta inicial e desenvolvem sérias complicações decorrentes dos efeitos colaterais e reações adversas do tratamento (PUI, 2010). Dessa forma, a busca por novas estratégias no tratamento podem aumentar os índices de cura e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Entre estas estratégias pode-se citar: melhor compreensão da biologia tumoral, identificação de novos critérios para estratificação dos grupos de risco de forma mais precisa, aprimoramento das terapias atuais por estudos de farmacogenômica e o desenvolvimento de novas terapias específicas e individualizadas, incluindo a utilização de biofármacos capazes de modular a resposta imune do hospedeiro contra as doenças neoplásicas (KATO; MANABE, 2018; MEEKER; YANG; SCHIFFMAN, 2010; PUI, JEHA, 2007).

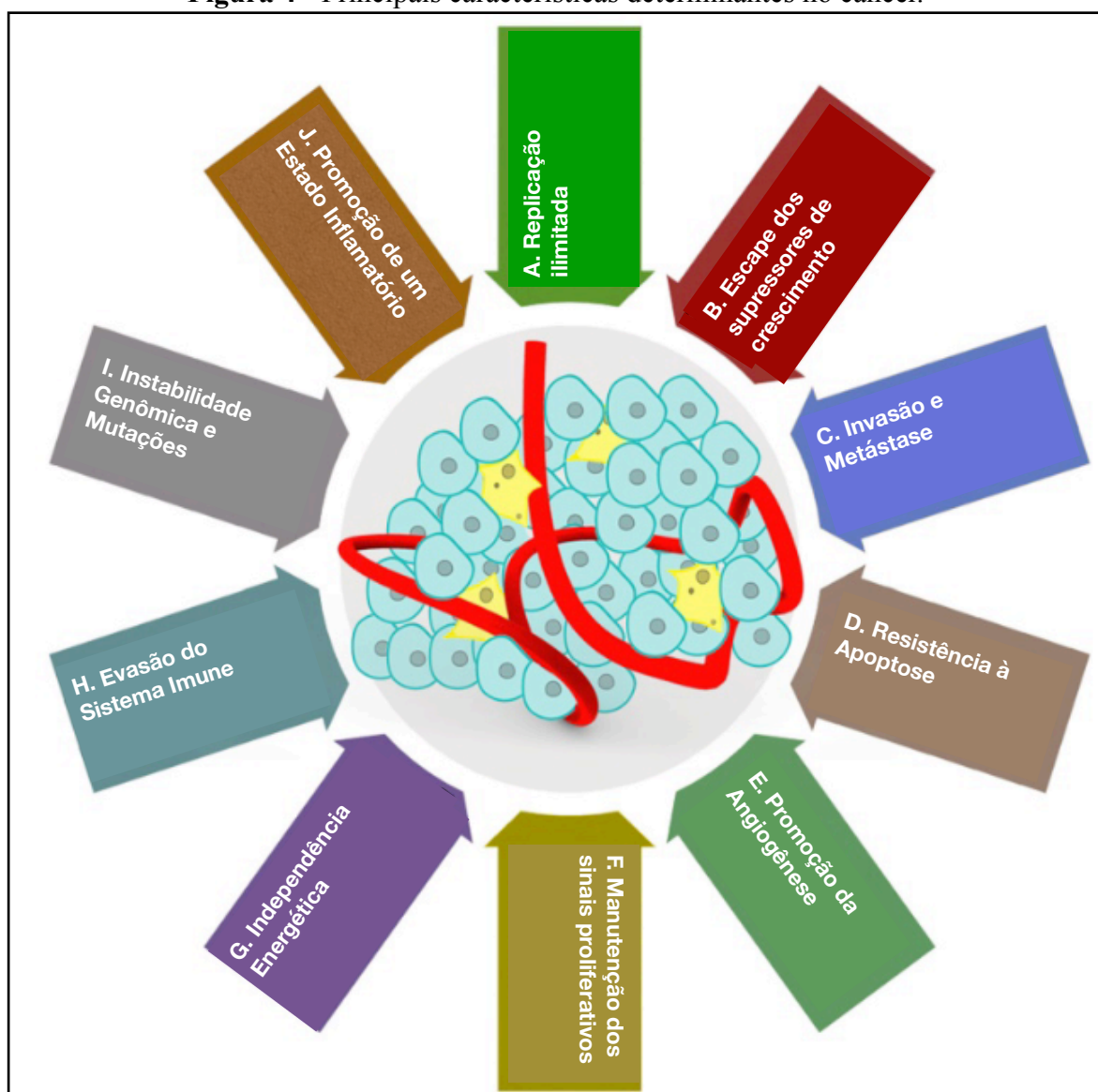
2.2 Microambiente Tumoral

Do ponto de vista histológico, a massa tumoral pode ser definida como um organismo complexo composto por células malignas e células não-malignas que se interrelacionam de tal forma que o resultado pode ser o sucesso na destruição das próprias células tumorais, mediada pelo sistema imune do hospedeiro, ou o desenvolvimento de um sítio propício e oportuno à tumorigênese, invasão tecidual e metástase, conhecido como microambiente tumoral (MAT), e, que mais adiante, pode também exercer efeito direto sobre a responsividade ao tratamento e desfecho clínico dos pacientes (CHEN *et al.*, 2015).

Via de regra, o MAT caracteriza-se por ser um ecossistema dinâmico, heterogêneo e interrelacionado constituído por células tumorais, células estromais (ex. fibroblastos), células inflamatórias e do sistema imune, células endoteliais, células adiposas, células neuroendócrinas, células dos vasos sanguíneos, periócitos, proteínas da matriz extracelular e diversas citocinas, fatores de crescimento e moléculas solúveis secretadas por células malignas e não malignas (CHEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2017). Devido a essa grande heterogeneidade, o perfil dos elementos que constituirá cada MAT irá diferir entre os diversos tipos de neoplasia, com base principalmente nas suas características intrínsecas e extrínsecas, do tipo de tecido acometido e do estágio de diferenciação celular (WANG *et al.*, 2017).

Embora o processo de gênese tumoral seja de origem multifatorial, e muita das vezes ainda de ordem desconhecida para a grande maioria das neoplasias, é de conhecimento científico que esse processo requer algumas características associadas à células tumorais e sua interrelação com o microambiente no qual estão inseridas, e incluem: capacidade proliferativa ilimitada, escape dos mecanismos supressores de crescimento, promoção da invasão e metástase, resistência aos mecanismos de apoptose, estímulo à angiogênese, manutenção da sinalização proliferativa, reprogramação energética celular, evasão do sistema imune, instabilidade genômica e promoção de um ambiente inflamatório (WANG *et al.*, 2017). A figura a seguir apresenta os principais aspectos relacionados ao câncer.

Figura 4 - Principais características determinantes no câncer.



Fonte: Adaptado de WANG *et al.*, 2017.

Dentre as principais características do câncer elencadas por Hanahan e Weinberg, em 2011, e, posteriormente revisadas por Fouad e Aanei, em 2017, muito provavelmente, a evasão do sistema imune pelas células tumorais seja um dos fatores mais importantes e requeridos para a iniciação e progressão tumoral. A capacidade modulatória que as células tumorais podem exercer sobre o sistema imune do hospedeiro é definida como edição imune e nos últimos anos vem recebendo atenção especial no tocante à pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos (imunoterapia e biofármacos) e de novas metodologias terapêuticas, como por exemplo a técnica do receptor de antígeno quimérico de células T (CAR T-cells) (DUNN *et al.*, 2002; MIRZAEI *et al.*, 2017).

Em se tratando do microambiente medular, observa-se a existência de dois sítios distintos e especializados denominados de nichos osteoblástico e vascular, ambos com componentes celulares específicos, mas que cooperam entre si para manutenção do controle da proliferação, diferenciação, auto-renovação e quiescência das CTHs (SHAFAT *et al.*, 2017). Os blastos leucêmicos conseguem induzir profundas mudanças nesses nichos criando um microambiente leucêmico imunossupressivo ao inibir a ativação de células do sistema imune e a geração e/ou expansão de células imunossupressoras, como por exemplo linfócitos T regulatórios (Treg) e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSCs) (CHIARINI *et al.*, 2016). O aumento na expressão dessas células já foi demonstrada em diversos tipos de neoplasias, incluindo leucemias, tumores de mama, ovário e próstata, dentre outros, sendo esse aumento na expressão associado com progressão tumoral, metástase e desfecho clínico desfavorável (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2015; VEIRMAN *et al.*, 2014).

2.3 Células Supressoras Derivadas de Linhagem Mielóide

Células mielóides imaturas (IMC) com forte ação inibitória sobre linfócitos T foram identificadas pela primeira vez em camundongos em 1987 (YOUNG; NEWBY; WEPSIC, 1987). Em seguida, Gibrilovich e colaboradores conceberam o termo “células supressoras

derivadas de linhagem mielóide” para designar as mesmas células supressoras em seres humanos, embora fenotipicamente distintas quando comparadas às de camundongo (GABRILOVICH *et al.*, 2007).

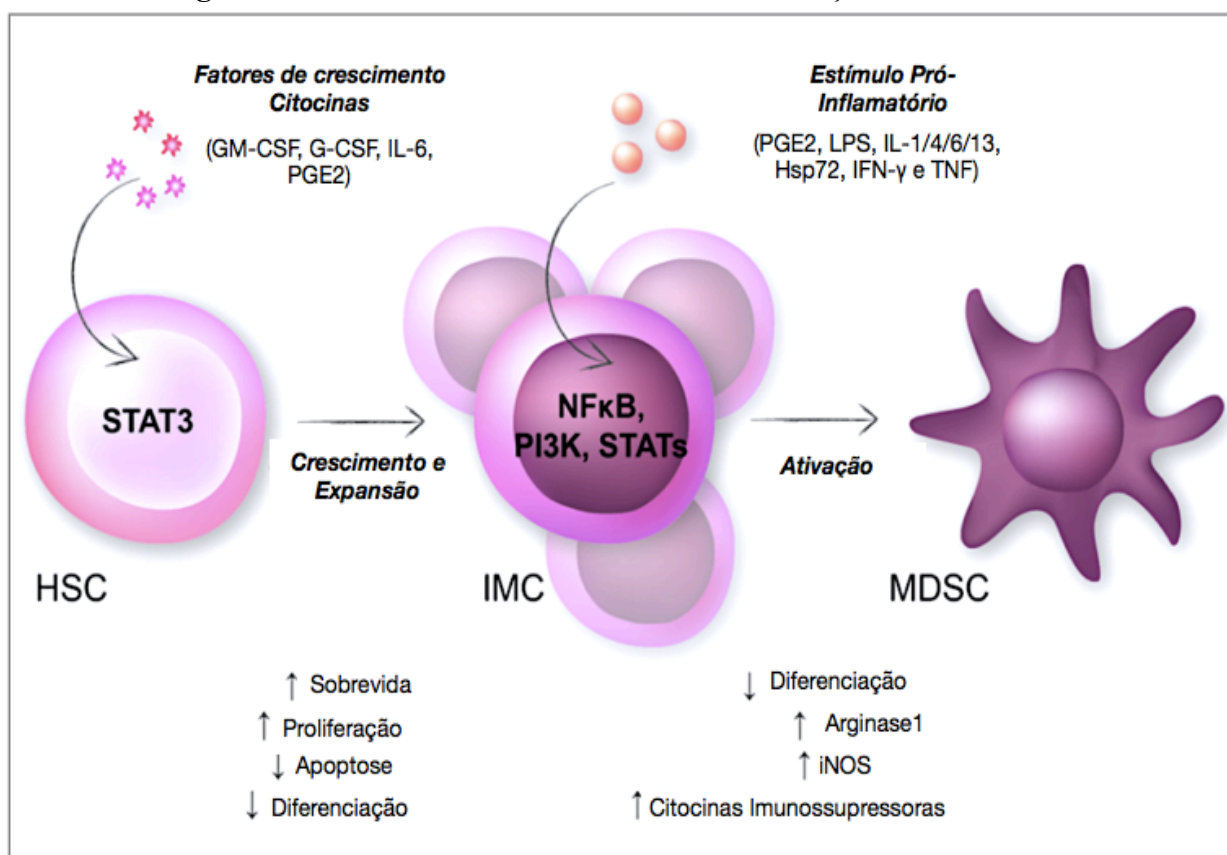
2.3.1 Origem, acúmulo e ativação das MDSCs

Por definição, as MDSCs constituem uma população heterogênea de IMCs que derivam de um progenitor mielóide comum, mas que apresentam diferenças citomorfológicas, imunofenóticas e funcionais (RAYCHAUDHURI *et al.*, 2015). Apesar da heterogeneidade, todas MDSCs caracterizam-se por exibir uma forte ação imunossupressora sobre a atividade de células T CD8⁺ e NK, por diversos mecanismos que serão descritos adiante (MONU; FREY, 2012). São denominadas imaturas por não expressarem marcadores fenotípicos de ativação ou de maturação, porém, expressam de linhagem mielóide (MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017).

Em condições fisiológicas, as IMCs seguem seu curso natural, no qual diferenciam-se em macrófagos, células dendríticas ou granulócitos em resposta à moléculas de sinalização celular e fatores de crescimento, entre eles o GM-CSF (fator estimulador de colônia granulócito-macrofágico), G-CSF (fator estimulador de colônia granulócito) e M-CSF (fator estimulador de colônia macrofágico). Esse processo, denominado mielopoiese, que ocorre tanto em ambiente medular quanto em ambiente extramedular, é de extrema importância e vital para o organismo, pois permite limitar a extensão da inflamação e com isso viabilizar o reparo e o restabelecimento da homeostase tecidual (MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017). Contudo, em se tratando de situações patológicas como inflamação crônica, sepse e câncer em que há liberação constante de sinais de estimulação, as IMCs ficam impossibilitadas de se diferenciarem e, ao invés disso, sofrem expansão e se acumulam (FLEMING *et al.*, 2018; MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017; MONU; FREY, 2012).

O acúmulo de IMCs e sua posterior ativação patológica em MDSCs resulta de uma provável reprogramação epigenética e interferência nos fatores de transcrição induzida por dois grupos de sinais distintos, porém constantes e interconectados (VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018). A figura 5 apresenta o modelo de "dois sinais" descrito por Millrud e colaboradores (2017) para expansão e ativação das MDSCs. Via de regra, o primeiro grupo de sinais são os que levam ao bloqueio de diferenciação, ao acúmulo e ao aumento na sobrevivência das IMCs, entre esses sinais temos: GM-CSF, G-CSF, M-CSF, VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), interleucina 6 (IL-6) e prostaglandina E2 (PGE2), que participam na ativação da cascata de sinalização mediada pela família STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), em especial STAT3 e STAT5, além de IR8 (fator regulatório de interferon 8), C/EBP- β (proteína ligante ao amplificador CCAAT beta) e NOTCH (MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017; VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018).

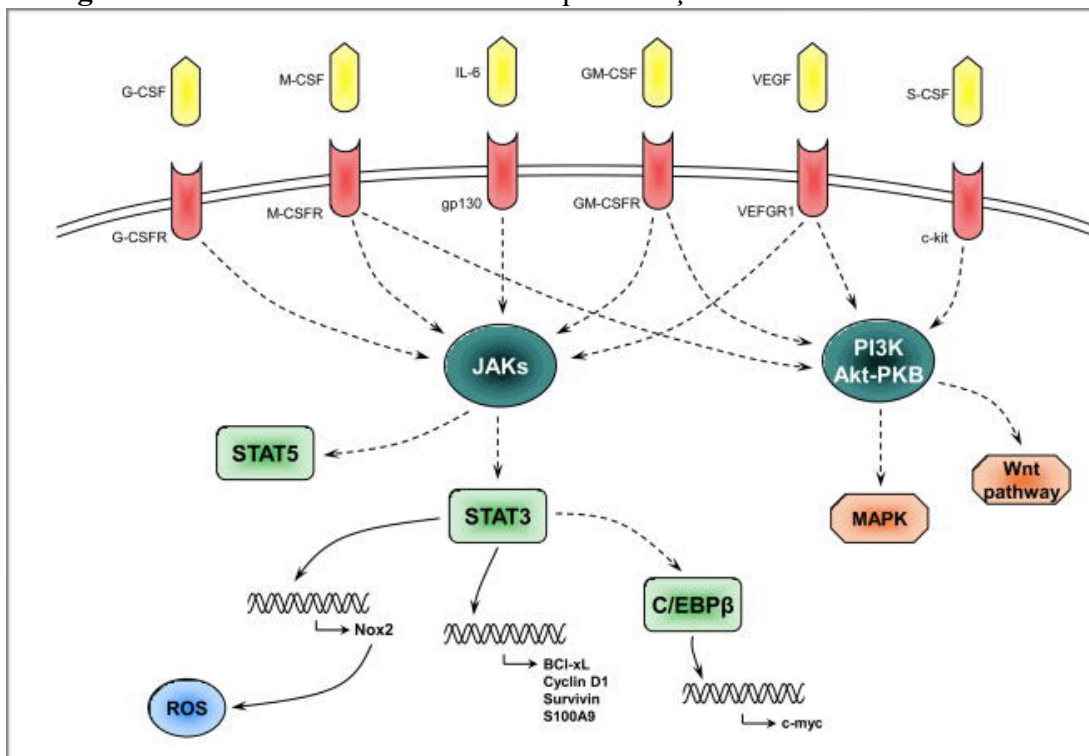
Figura 5 - Modelo “dois sinais” de acúmulo e ativação de MDSCs.



O primeiro grupo de sinais atuam sobre as HSCs de modo a bloquear sua diferenciação e estimular a proliferação. No segundo momento, os segundos sinais são responsáveis por ativar as IMCs e torná-las células imunossupressoras - MDSCs.

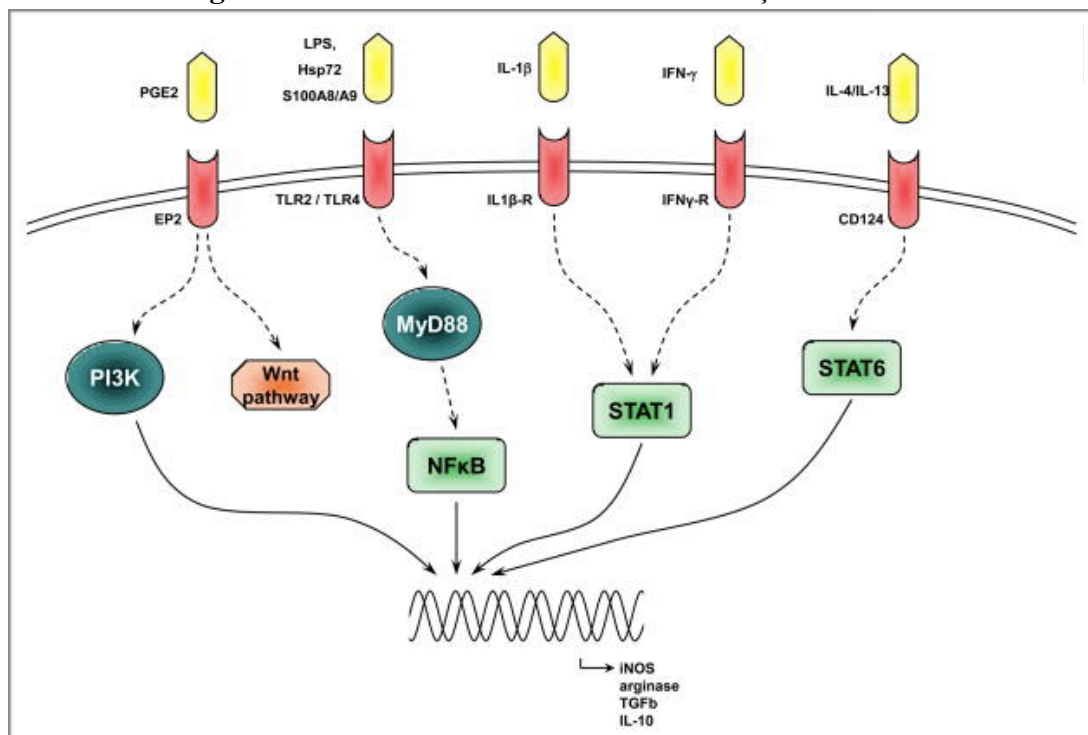
Fonte: Adaptado de MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017.

O segundo grupo de sinais, representado por PGE2, LPS (lipopolissacarídeo), IL-1, IL-4, IL-13, Hsp72 (proteína do choque térmico), IFN- γ (interferon gama) e TNF (fator de necrose tumoral), é responsável pela ativação das IMCs em MDSCs, através da ativação da cascata de sinalização mediada via STAT1, STAT6, NF- κ B (fator nuclear kappa-B) e PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase) (MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017; VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018). As MDSCs ativadas possuem forte ação imunossupressora mediada por aumento na expressão das enzimas arginase-1 (ARG1) e óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (CHEN *et al.*, 2017). As figuras 6 e 7 apresentam, de forma esquemática, as cascatas intracelulares, bem como os eventos moleculares, desencadeados pelo primeiro e segundo grupos de sinais após ligação aos seus respectivos receptores, tendo por consequência a expansão e ativação de MDSCs.

Figura 6 - Mecanismos moleculares de proliferação e acúmulo de MDSCs.

O primeiro grupo de sinais liga-se aos seus respectivos receptores e desencadeia a ativação das vias moleculares JAK/STAT e PI3K/MAPK. A primeira resulta na síntese de proteínas que produzem radicais livres (Nox2), aumentam a sobrevivência celular (Bcl-xL, Ciclina D1, Survivina e S100A9) e induzem a proliferação (c-Myc).

Fonte: Adaptado de CONDRAMINE; GABRILOVICH, 2011.

Figura 7 - Mecanismos moleculares de ativação de MDSCs.

O segundo grupo de sinais, responsável pela ativação funcional das MDSCs, ao se ligar aos seus respectivos receptores ativam cascatas de sinalização intracelular envolvendo PI3K, MyD88, NF-κB, STAT1 e STAT6, que por sua vez ativam transcionalmente genes importantes ligados à capacidade imunossupressora, são eles: iNOS, Arginase, TGF (fator de crescimento transformante) e IL-10.

Fonte: Adaptado de CONDRAMINE; GABRILOVICH, 2011.

Em se tratando de tumores, esses diversos sinais ou fatores solúveis anteriormente citados são comumente liberados no MAT pelas próprias células tumorais, por células imunes do próprio hospedeiro ou por fibroblastos associados ao tumor (CAFs) (FLEMING *et al.*, 2018). Mais adiante, tem sido demonstrado que o desenvolvimento e a ativação de MDSCs pode também ser mediada por células tumorais de forma indireta através da liberação de exossomas, pequenas vesículas de bicamada lipídica capazes de transportar moléculas bioativas, sendo então incorporadas por IMCs resultando em sua ativação, ou, em um outro cenário, as próprias MDSCs ativas podem se fazer da liberação desses mesmos exossomas, contendo proteínas, RNAs mensageiros e microRNAs, que auxiliarão na promoção da sua atividade imunossupressora (GEIS-ASTEGGIANTE *et al.*, 2017).

2.3.2 Classificação das MDSCs

Em camundongos, as MDSCs foram inicialmente identificadas como células com expressão de marcadores de superfície CD11b e Gr1 (Ly6G ou Ly6C) e, posteriormente, categorizadas em dois grupos distintos: MDSC granulocítica (PMN-MDSC ou G-MDSC) com imunofenótipo CD11b⁺/Ly6G⁺/Ly6C^{low} e MDSC monocítica (Mo-MDSC ou M-MDSC) com imunofenótipo CD11b⁺/Ly6G⁻/Ly6C^{high} (SU *et al.*, 2016).

Em humanos, devido à grande heterogeneidade imunofenotípica, a classificação das MDSCs é mais complexa do que a utilizada para camundongos. Em linhas gerais, elas são comumente definidas como células com ausência de expressão de marcadores de células mielóides maduras e expressão de marcadores CD11b⁺/CD33⁺/HLA-DR^{-low} e, similarmente ao sistema murino, podem ser subdivididas em dois grupos principais: G-MDSC com imunofenótipo CD11b⁺/CD33⁺/CD14⁻/CD15⁺/HLA-DR^{-low} e M-MDSC apresentando imunofenótipo CD11b⁺/CD33⁺/CD14⁺/CD15⁻/HLA-DR^{-low} (BRONTE *et al.*, 2016; TUETTENBERG; STEINBRINK; SCHUPPAN, 2016). As G-MDSCs e as M-MDSCs diferem de neutrófilos e monócitos, respectivamente, por apresentarem características

bioquímicas, marcadores imunofenotípicos e perfis genômico e proteômico distintos (KUMAR *et al.*, 2016).

Um terceiro subtipo de MDSCs imaturas foi recém identificado em seres humanos e caracteriza-se por não apresentarem expressão de marcadores imunofenotípicos de linhagem (CD3, CD14, CD15, CD19 e CD56), HLA-DR⁻ e CD33⁺, sendo então denominadas de MDSC "estágio imaturo" (e-MDSCs) (BRONTE *et al.*, 2016). O quadro a seguir agrupa as principais características fenotípicas das MDSCs em humanos e em camundongos.

Quadro 4 - Identificação de MDSCs com base no perfil imunofenotípico.

<i>Subtipo</i>	<i>Fenótipo em Camundongos</i>	<i>Fenótipo em Humanos</i>
G-MDSC	CD11b ⁺ /Ly6G ⁺ /Ly6C ^{low}	CD11b ⁺ /CD33 ⁺ /CD14 ⁻ /CD15 ⁺ /HLA-DR ^{-/low}
M-MDSC	CD11b ⁺ /Ly6G ⁻ /Ly6C ^{high}	CD11b ⁺ /CD33 ⁺ /CD14 ⁺ /CD15 ⁻ /HLA-DR ^{-/low}
e-MDSC	Ainda não determinado	Lin ⁻ (CD3, CD14, CD15, CD19, CD56), HLA-DR ⁻ , CD33 ⁺

Fonte: Adaptado de BRONTE *et al.*, 2016.

2.3.3 Recrutamento das MDSCs ao microambiente tumoral

A infiltração e acúmulo de MDSCs no microambiente tumoral é um fenômeno bem evidenciado e já descrito em diferentes tipos de neoplasias, incluindo adenocarcinoma pancreático, melanoma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular e renal, câncer de mama, próstata e cólon, leucemias, linfomas, dentre outros (KUMAR *et al.*, 2016; MARVEL; GABRILOVICH, 2015; UMANSKY *et al.*, 2016).

O complexo processo de recrutamento das MDSCs para o sítio tumoral primário, bem como para os nichos metastáticos, embora ainda não elucidado em sua totalidade, é resultado da ação de inúmeros fatores. Dentre estes, o perfil de quimiocinas sintetizadas e liberadas

pelas células neoplásicas, embora de forma inespecífica, é considerado um dos principais responsáveis por atrair MDSCs para o sítio tumoral (KUMAR *et al.*, 2016; QIAN *et al.*, 2011). Via de regra, o recrutamento de monócitos e M-MDSCs é mediado por CCL2 e CCL5, entre outros, enquanto que neutrófilos e G-MDSCs são recrutadas por CXCL1, CXCL5, CXCL6, CXCL8 e CXCL12 (KUMAR *et al.*, 2016). Citocinas solúveis presentes em grandes concentrações no microambiente tumoral, como por exemplo IL-6 e IL-10 β , contribuem tanto para o recrutamento das MDSCs quanto para sua função supressora, não obstante, essas mesmas citocinas são também secretadas pelas próprias MDSCs, onde irá potencializar sua atividade supressora e estimulando sua expansão e acúmulo (CHEN *et al.*, 2017). O quadro a seguir exhibe as principais quimiocinas associadas com o recrutamento de monócitos, neutrófilos e MDSCs identificadas em alguns tipos de tumores.

Quadro 5 - Principais quimiocinas sintetizadas por tumores para recrutamento de leucócitos.

Quimiocina	Tipo de Tumores	Leucócito Recrutado
CCL2	Carcinoma de próstata Câncer gástrico, mama e ovário	Monócitos/TAM MDSC*
CCL5	Câncer de mama	Monócitos
CXCL5	Câncer de pulmão de células não pequenas	Neutrófilos
CXCL6	Tumores gastrointestinais	Neutrófilos
CXCL8	Carcinoma gástrico	Neutrófilos
CCL15	Câncer colorretal	G-MDSC
CXCL12	Câncer colorretal	M-MDSC

* população total sem distinção de subtipo.

Fonte: Adaptado de BRONTE *et al.*, 2016.

Outros fatores como HIF1 α (fator 1-alfa induzido por hipóxia), S1P (esfingosina 1-fosfato) e as proteínas S100A8 e S100A9 também estão relacionados com recrutamento de MDSCs, porém, o mecanismo exato não está completamente estabelecido (CHIU *et al.*, 2016; ZHOU; GUO, 2018).

2.3.4 Mecanismos efetores de imunossupressão mediados por MDSCs

De forma geral, as células supressoras derivadas de linhagem mielóide conseguem suprimir a resposta imune através diversos mecanismos efetores diferentes, mas que podem ser agrupados da seguinte forma: 1- depleção de nutrientes essenciais para funcionalidade das células T; 2- produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; 3- interferência com os processos de migração e ativação de células T; 4- expansão de linfócitos Treg e reprogramação macrofágica M1/M2. Além desses mecanismos de ação direta e indireta sobre os linfócitos T, as MDSCs também desempenham atividade imunossupressora através da produção de moléculas imunomodulatórias (DE SANCTIS *et al.*, 2016).

As MDSCs prejudicam diretamente a função dos linfócitos T ao reduzir a concentração no meio de certos aminoácidos (aa) essenciais para sua plena atividade, bem como de seus metabólitos, são eles: L-arginina, triptofano e a cisteína (CHEN *et al.*, 2017). No tocante à L-arginina, um precursor de biossíntese de inúmeras proteínas, as MDSCs ativadas apresentam um aumento na expressão de arginase-1 (ARG1), enzima que cataboliza a conversão do aminoácido L-arginina em uréia e ornitina. Esse aminoácido é extremamente importante para os linfócitos T, pois é requerido para a síntese da cadeia CD3- ζ que compõem o TCR (receptor de células T) e também para a formação do complexo ciclina D3 com ciclina dependente de quinase 4 (CDK4). A depleção deste aminoácido acarreta diminuição da expressão de TCR e bloqueio proliferativo de células T no *checkpoint* G1/S do ciclo celular (CHEN *et al.*, 2017; MONU; FREY, 2012).

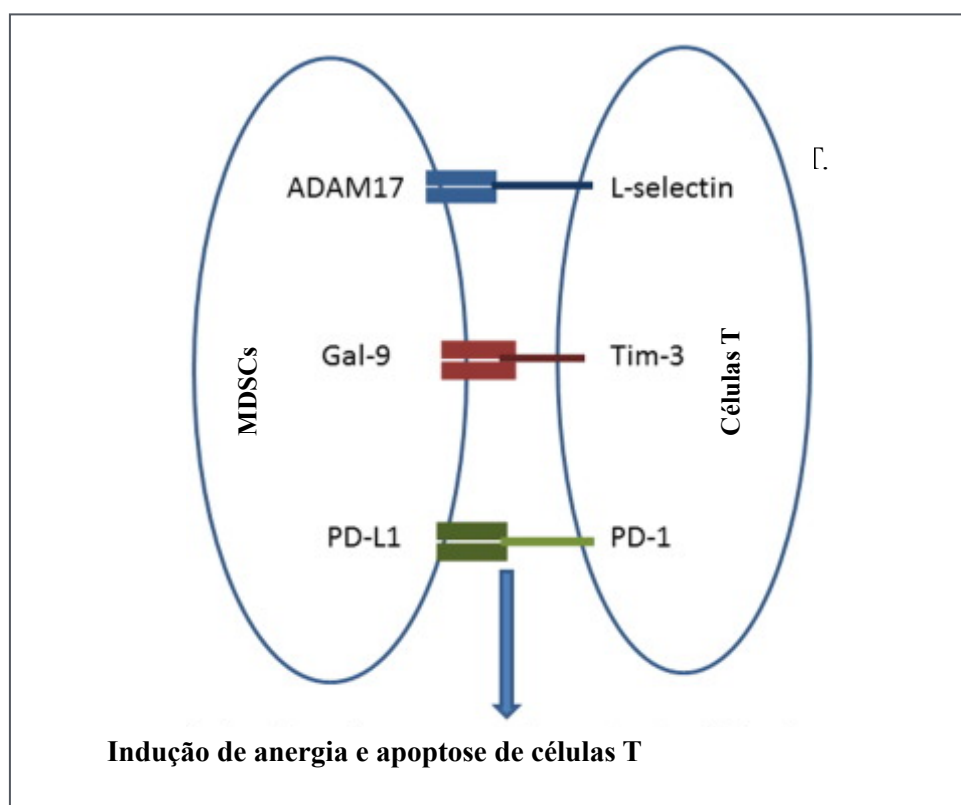
O triptofano e a cisteína são outros dois aminoácidos essenciais para a atividade normal das células T, sendo requeridos para proliferação e ativação funcional dessas células, respectivamente. No entanto, as MDSCs ativadas reduzem a concentração no microambiente de ambos os aminoácidos, no caso do primeiro, a depleção é resultado da alta expressão da enzima IDO1 (*Indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenase*) que induz à degradação do triptofano por hidrólise. No caso do segundo, as MDSCs consomem toda a cisteína, porém, sem retornar a mesma para o microambiente. O resultado da depleção de triptofano e da cisteína é a inibição da proliferação e ativação de células T, respectivamente (IBÁÑEZ-VEA *et al.*, 2018). É importante salientar que, o metabólito de degradação de triptofano por IDO1, a L-quinurenina, também possuem ação imunossupressora ao induzir a ativação de células Treg Foxp3⁺ (*forkhead box P3*) (DE SANCTIS *et al.*, 2016).

As MDSCs ativadas possuem alta expressam da enzima iNOS (óxido nítrico sintase induzível), enzima que atua sobre o aminoácido L-arginina produzindo óxido nítrico (NO) (CHEN *et al.*, 2017). Uma vez liberado, o NO desempenha diversas funções imunossupressoras, que incluem: indução da apoptose de células T, inibição da fosforilação e ativação da via JAK3/STAT5, redução na expressão de moléculas de MHC-II (complexo maior de histocompatibilidade tipo II), produção de peroxinitrito com consequente nitrosilação dos resíduos de tirosina do receptor CD8, tornando-o não responsivo ao estímulo via MHC-I, produção, juntamente com NOX2 (*NADPH oxidase 2*), de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), que promovem a perda da cadeia CD3- ζ do TCR (DE SANCTIS *et al.*, 2016; MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017). Espécies reativas de nitrogênio promovem também a nitrosilação das quimiocinas CCL2, CCL5, CCL21 e CXCL12 e/ou de receptores CXCR4 inibindo o recrutamento de linfócitos T (DE SANCTIS *et al.*, 2016).

Outro mecanismo de inibição direta dos linfócitos T ocorre através da sinalização via receptor de morte programada PD1 e seu ligante PD-L1. As MDSCs ativadas expressam em sua membrana o ligante PD-L1, que ao se ligar ao seu receptor PD1 nas células T, gera um sinal inibitório que é transmitido para dentro dessas células e acarreta redução na produção de

citocinas e inibição proliferativa (PYZER *et al.*, 2016). As MDSCs ativadas expressam metaloproteinase de domínio 17 (ADAM17), uma enzima capaz de clivar o ectodomínio da L-selectina CD62L presente na membrana de linfócitos T e assim reduzir a sua atividade. A ligação entre Gal-9 (galectina-9) e Tim-3 (domínio 3 de mucina e imunoglobulina de células T) promove a morte das células T e o fim da resposta imune via Th1 (linfócito T auxiliar 1) (CHEN *et al.*, 2017). A figura a seguir ilustra a interação de moléculas expressas por MDSCs e seus respectivos ligantes nas células T com consequente anergia e indução de morte celular dessas.

Figura 8 - Interação entre MDSCs e células T.



ADAM 17 - metaloproteinase de domínio 17, Gal-9 - Galectina 9, Tim-3 - domínio 3 de mucina e imunoglobulina de células T, PD-1 - receptor de morte programada, PD-L1 - ligante do receptor de morte programada.

Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2017.

As MDSCs ativadas podem ainda, através da liberação de TGF- β , inibir a atividade de células NK e promover a diferenciação de células T CD4⁺ *naïves* em linfócitos Treg com sua consequente ativação e com a produção concomitante de IL-10, que por sua vez induzem a

polarização de macrófagos com fenótipo M2 (imunossupressor). Tanto as células Treg, quanto os macrófagos com fenótipo M2 possuem ação imunossupressora (DE SANCTIS *et al.*, 2016).

Contudo, é importante salientar que os dois grupos de MDSCs não compartilham de todos esses mecanismos simultaneamente, isto é, enquanto G-MDSCs desempenham sua atividade somente suprimindo a resposta imune das células T antígeno-específica, as M-MDSCs suprimem tanto a resposta imune das células T anígeno-específicas quanto as não específicas, tornando-as assim mais imunossupressoras quando comparadas às G-MDSCs (KUMAR *et al.*, 2016; MARVEL; GABRILOVICH, 2015). Aliado a isso, sabe-se também que as M-MDSCs são as mais prevalentes no microambiente tumoral (KUMAR *et al.*, 2016), o que justificou a sua pesquisa nesse estudo. O quadro 6 resume as principais características fenotípicas e funcionais das MDSCs, dos monócitos e dos neutrófilos.

Quadro 6 - Características fenotípicas e funcionais de neutrófilos, monócitos e MDSCs.

	Neutrófilos	G-MDSCs	Monócitos	M-MDSCs	e-MDSCs
Fenótipo	CD11b- CD14- CD15+ CD66+ LOX1-	CD11b- CD14- CD15+ CD66+ LOX1+	CD14+ CD15- HLA-DR+	CD14+ CD15- HLA-DR- ^{LOW}	CD3- CD14- CD15- CD19- CD56- HLA-DR- CD33-
Densidade	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Imunosupressão	-	+	-	++	++
ROS	+	+++	-/+	-/+	++
NO	-	+	+	+++	++
ARG1	+	++	-	-	-
PGE2	-	++	-	+	NA
S100A8/A9	+	++	-/+	+	NA
STAT3	-/+	++	-/+	++	NA

ROS (espécies reativas de oxigênio), NO (óxido nítrico), ARG1 (arginase1), PGE2 (prostaglandina E2), STAT (transdutor de sinal e ativador de transcrição), e-MDSCs (MDSCs estágio imaturo).

Fonte: Adaptado de VEGLIA; PEREGO; GABRILOVICH, 2018.

De um modo geral, as MDSCs, uma vez recrutadas e ativadas no microambiente tumoral, irão permitir, através dos mecanismos descritos anteriormente, que as células tumorais escapem da destruição mediada pelo sistema imune, além de promoverem o crescimento e a progressão tumoral, caracterizadas por invasão tecidual, metástase, angiogênese e resistência quimioterápica (MARVEL; GABRILOVICH, 2015; UMANSKY *et al.*, 2016).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão de células supressoras derivadas de linhagem mielóide antes e após quimioterapia de indução em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar se as M-MDSCs estão presentes no microambiente tumoral medular;
- Determinar uma possível associação entre a expressão de M-MDSCs com os grupos de estratificação de alto e baixo risco;
- Investigar uma eventual associação entre expressão de M-MDSCs com dados clínico-laboratoriais (idade, gênero, alterações cromossômicas e fusões gênicas específicas);
- Determinar uma possível associação entre a expressão de M-MDSCs com eventual falha terapêutica após quimioterapia de indução.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal e observacional.

4.2. Local de Realização de Estudo

O presente estudo foi realizado no centro de referência no diagnóstico da criança e do adolescente Dr. Murilo Martins do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), pertencente à rede pública do estado do Ceará, em parceria com o setor de hematologia do laboratório Clementino Fraga (LCF), ambos situados na cidade de Fortaleza, Ceará.

4.3. Casuística e Metodologia

4.3.1. Casuística e captação de pacientes

Para a realização deste estudo foram selecionados, de forma randômica, pacientes pediátricos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B, atendidos no ambulatório de onco-hematologia/HIAS no período de agosto de 2015 a maio de 2017.

Os critérios de inclusão adotados foram: pacientes diagnosticados com LLA-B *de novo*, de ambos os sexos, idade inferior a 18 anos e não submetidos a tratamento quimioterápico prévio ou corticoterapia prévia. Entre os critérios de exclusão temos: pacientes com idade igual ou superior a 18 anos, ter o diagnóstico realizado em outro centro/

hospital, ter realizado quimioterapia ou corticoterapia prévia, não apresentar amostras de sangue periférico e/ou medula óssea suficientes para a realização das análises a que o estudo se propôs, pacientes com leucemia recidivada, pacientes com neoplasias secundárias ao tratamento e, ainda, não ter consentido para participação no estudo.

4.3.2. Métodos

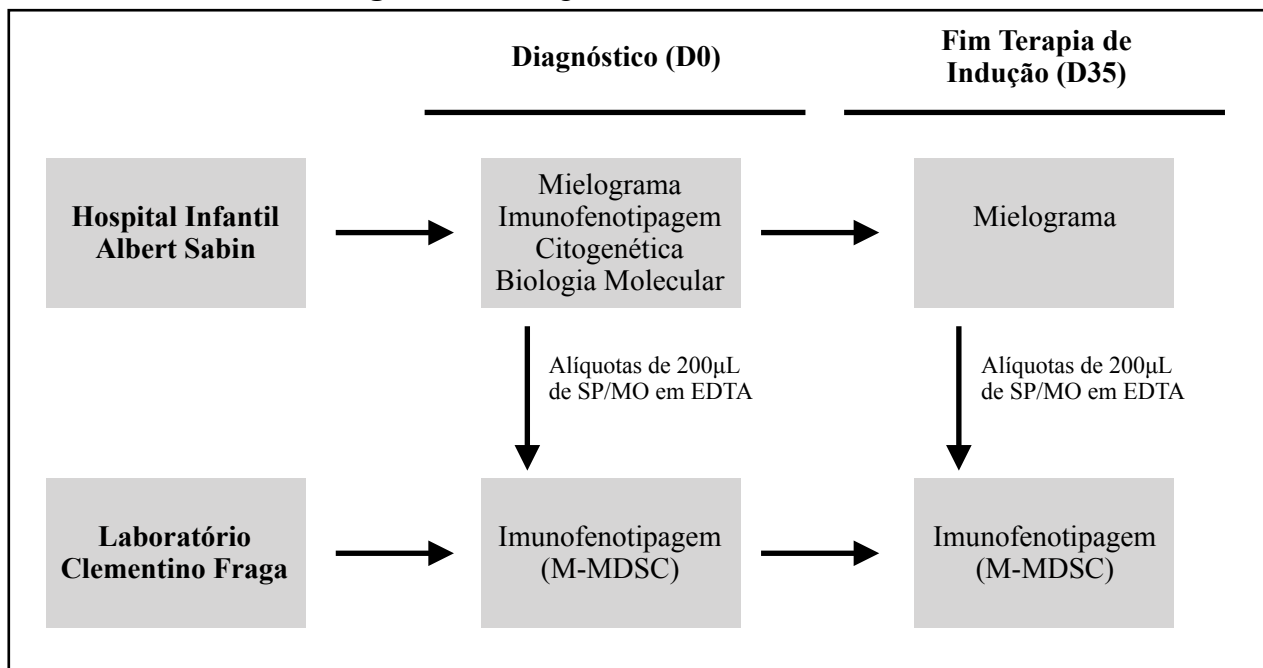
Todos os pacientes selecionados para o estudo foram diagnosticados segundo os critérios preconizados pela Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW *et al.*, 2017) e adotados pelo hospital infantil Albert Sabin, e incluem: avaliação citomorfológica e citoquímica da medula óssea (mielograma), estudo imunológico (imunofenotipagem por citometria de fluxo) e estudo genético (citogenética e biologia molecular). Para isso, amostras de SP e MO foram coletadas em centro cirúrgico por punção venosa e lombar, respectivamente, seguindo a rotina diagnóstica estabelecida pelo próprio hospital, ou seja, o presente estudo não gerou qualquer ônus aos pacientes selecionados. As coletas ocorreram sistematicamente no dia do diagnóstico (dia zero ou D0), no oitavo dia (D8), no décimo quinto dia (D15) e no trigésimo quinto dia (D35), as análises morfológicas, imunológicas e genéticas indicadas para cada dia seguiram o preconizado pelo protocolo GBTLI-2009 (BRANDALISE; PINHEIRO; LEE, 2011).

A avaliação da expressão das M-MDSCs foi realizada em amostras de SP e MO de todos os pacientes selecionados para o estudo, e ocorreram em dois momentos específicos: ao diagnóstico (D0) e ao fim da terapia de indução (D35), com o intuito de se avaliar se a quimioterapia de indução teria efeito sobre a expressão de M-MDSCs. Essas imunofenotipagens foram realizadas pelo setor de hematologia do laboratório Clementino Fraga e será detalhada mais adiante. A figura 09 apresenta o fluxograma detalhando o esquema de análises das amostras.

Os pacientes inseridos no estudo foram então agrupados de acordo com os critérios clínico-laboratoriais de estratificação adotados pelo GBTLI-2009, em alto ou baixo risco, levando-se em consideração, dentre outros fatores, a idade do paciente, a leucometria inicial,

os achados genéticos e o acometimento do SNC. Essas informações, bem como de outras pertinentes ao estudo, foram obtidas através de pesquisa direta nos prontuários dos respectivos pacientes.

Figura 9 - Fluxograma de análise de amostras.



D0 (dia zero), D35 (trigésimo quinto dia), M-MDSC (célula supressora derivada de linhagem mielóide - monocítica).
Fonte: elaborado pelo autor.

4.3.3 Análise citomorfológica de medula óssea (HIAS)

Os esfregaços de MO foram confeccionados por técnico de laboratório capacitado que identificou as respectivas lâminas com as iniciais do paciente e prontuário, logo após a coleta. Em seguida, as lâminas foram coradas utilizando o corante Leishman (Sigma-Aldrich®), seguindo os seguintes passos: em ambiente apropriado, as lâminas de cada paciente foram cobertas com aproximadamente 1mL da solução uso de Leishman (2g para 1.000mLs de álcool metílico P.A.) preparada previamente, após 3 minutos adicionou-se 1mL e homogeneizou-se, com ajuda de uma pipeta de Pasteur. Após 15 minutos lavou-se as lâminas com água destilada e foram então secadas com auxílio de papel toalha.

As análises citomorfológicas dos esfregaços de MO foram realizadas por dois hematologistas experientes que avaliaram qualitativa e quantitativamente um total mínimo de 300 células por lâmina. O percentual de blastos foi determinado ao diagnóstico, no D15 e D35, com o intuito de realizar o estadiamento medular em M₁, M₂ ou M₃, segundo os critérios do protocolo GBTLI-2009. A avaliação do esfregaço de SP ocorreu no D8, ao fim da corticoterapia, com o intuito de avaliar o percentual de blastos e assim determinar o grupo de risco inicial a que os pacientes.

4.3.4 Análise Imunológica (Imunofenotipagem - HIAS)

A imunofenotipagem por citometria de fluxo realizada ao diagnóstico teve por objetivo determinar se a linhagem dos blastos eram de origem B e qual o estágio maturativo dessas células. Para isso, utilizou-se um painel de anticorpos monoclonais (AcMo) pré-definido, montado de maneira a se ter dois AcMos por tubo, cada um conjugado ou com fluorocromo verde (FITC - isotiocianato de fluoresceína) ou com fluorocromo vermelho (TRICT - tetrametilrodamina). O painel engloba tanto marcações de antígenos de membrana, quanto de citoplasma e todos os AcMos eram das marcas DAKO® (Santa Clara, CA, USA) ou BD Biosciences® (San Jose, CA, USA). Os AcMos utilizados, bem como seus respectivos fluorocromos conjugados encontram-se detalhados na tabela 01.

Para as marcações de membrana o procedimento foi: inicialmente identificar todos os tubos com seus respectivos AcMos; adicionar a cada tubo 50µl da amostra de MO coletada em tubos com EDTA; adicionar a cada tubo a quantidade pré-definida dos respectivos AcMos, com concentrações previamente ajustadas, em temperatura ambiente e incubar por 15 minutos; após esse prazo, adicionar em cada tubo 2mL de solução de lise e incubar por 10 minutos; centrifugar por 3 minutos a 1.500 rpm; logo após remover o sobrenadante e adicionar a cada tubo 2mL de solução Azida 0,2% e homogeneizar; repetir esse último procedimento por mais duas vezes; ressuspender com 200µl de solução de paraformaldeído a 1%. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo da luz. Com relação as marcações intracitoplasmáticas, o procedimento foi o mesmo, variando somente a primeira etapa que foi antecedida de

permeabilização da membrana celular com solução de paraformaldeído a 5,5%, com o intuito de permitir a entrada dos AcMos. Todas as aquisições foram realizadas no citometro de fluxo FACSCalibur™ e as análises realizadas utilizando o software Cell-Quest (Becton-Dickinson®). Para todos os tubo um total de 10.000 eventos foram adquiridos e considerou-se um *cut-off* de 20% para determinação de positividade para todos os AcMos que compunham o painel.

Tabela 1 - Painel anticorpos monoclonais para LLA-B.

Marcação de Membrana		
<i>Tubo 1</i>	Gamma	Gamma
<i>Tubo 2</i>	CD5 (FITC)	—
<i>Tubo 3</i>	HLA-DR (FITC)	—
<i>Tubo 4</i>	—	CD45 (TRICT)
<i>Tubo 5</i>	CD19 (FITC)	CD10 (TRICT)
<i>Tubo 6</i>	CD13 (FITC)	CD22 (TRICT)
<i>Tubo 7</i>	CD33 (FITC)	CD3 (TRICT)
<i>Tubo 8</i>	m.IgM (FITC)	CD34 (TRICT)
<i>Tubo 9</i>	CD7 (FITC)	CD56 (TRICT)
<i>Tubo 10</i>	CD1a (FITC)	aNG2 (TRICT)
<i>Tubo 11</i>	CD4 (FITC)	CD8 (TRICT)
<i>Tubo 12</i>	—	CD123 (TRICT)
<i>Tubo 13</i>	—	CD20 (TRICT)
<i>Tubo 14</i>	—	CD2 (TRICT)
Marcação Intracitoplasmática		
<i>Tubo 15</i>	Gamma-cy	Gamma-cy
<i>Tubo 16</i>	—	cyCD3 (TRICT)
<i>Tubo 17</i>	cy.IgM (FITC)	—
<i>Tubo 18</i>	—	CD79a (TRICT)
<i>Tubo 19</i>	—	aMPO

Gamma: Controle negativo sem AcMos; m= membrana; cy = citoplasma; MPO = mieloperoxidase; FITC (isotiocianato de fluoresceína); TRICT (tetrametilrodamina).

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3.5 Análise Citogenética Convencional (HIAS)

A citogenética convencional utilizando técnica de banda G com resolução de 400-450 bandas foi realizada segundo o preconizado por Chauffaille e colaboradores (1997), isto é, cerca de 1mL das amostras de medula óssea previamente colhida em tubos Vacutainer® (BD Company), contendo heparina sódica jateada na parede interna, de forma estéril, foi lançada em duas garrafas de cultura de 25mm² (TPP®) contendo em cada um 4mLs de meio RPMI 1640 com Hepes (Vitrocell®) e 1mL de soro fetal bovino (Vitrocell®). Este material foi cultivado por 24 e 48 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 100uLs de colchicina (Vitrocell®) (ou análogo sintético - Colcemid® - GIBCO), por 45 minutos e mantidas em banho-maria a 37°C. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensionado em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de Carnoy, ácido acético e metanol na proporção de 3:1, por 3 vezes. Após a última lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado no volume final de aproximadamente 1mL.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia, flambadas com auxílio de bico de Bunsen e envelhecidas em microondas por 1 minuto e potência máxima. O bandeamento foi realizado com técnica de banda G utilizando o corante Wright, sendo posteriormente analisadas, quando possível, um total de 20 metáfases por paciente. Os laudos foram emitidos seguindo os critérios preconizados pelo Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana (ISCN, 2016). As metáfases foram capturadas e analisadas em sistema computadorizado CytoVision® (Leica Biosystems).

4.3.6 Biologia Molecular (HIAS)

Todos os pacientes inseridos no estudo realizaram investigação molecular por técnica de RT-PCR (reação da cadeia polimerase - transcriptase reversa) ao diagnóstico, com o intuito de detectar fusões gênicas recorrentes em LLA-B pediátrica que possuem importante

valor preditivo clínico e terapêutico. Foram investigadas as seguintes alterações gênicas: *E2A/PBX1*, *AF4/MLL*, *BCR/ABL1* p190 e p210 e *ETV6/RUNX1*. A tabela 02 apresenta os *primers* utilizados para cada reação.

Resumidamente, a técnica é dividida em 4 (quatro) passos: extração do RNA total, reação de transcriptase reversa para produção de cDNA (DNA complementar fita simples), amplificação do DNA e revelação em gel de agarose. A extração do RNA total foi realizada utilizando o Trizol® (Invitrogen, CA, USA) e seguiu-se as recomendações descritas no manual do próprio fabricante. Para todas as amostras de SP e MO prosseguiu-se, inicialmente, com a separação das células linfocitárias com auxílio de 1mL de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences) e, posteriormente, adicionado 1mL de Trizol. O passo seguinte foi adicionar 200µL de clorofórmio anidro (Sigma-Aldrich®) para cada 1mL de Trizol a essas amostras, que ficaram incubadas por 10 minutos. O RNA total obtido por esse processo foi quantificado com ajuda de um espectrofotômetro e seguiu-se para a próxima etapa. Tanto a síntese de cDNA quanto a amplificação por PCR foram realizadas simultaneamente em uma única reação, para isso utilizou-se o kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ com *Taq* High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen, CA, USA), e adotou-se as recomendações fornecidas pelo próprio fabricante. Uma vez preparado os *mixes* em tubos eppendorfs®, contendo os volumes de RNA total, de *primers* e do kit, foram então levados ao termociclador (ThermoFisher Scientific), no qual as temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, bem como a quantidade de ciclos por reação, foram ajustadas seguindo as especificações do fabricante. O último passo foi a visualização dos produtos de amplificação após corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% e sua consequente revelação em equipamento com luz ultra-violeta. Para todas as reações realizou-se controle negativo e positivo.

Tabela 2 - Relação de fusões gênicas pesquisadas e *primers* utilizados.

Fusão	Primers
Controle ABL	ABL-Ia - ATC TGC CTG AAG CTG GTG GGC T ABL-D - TGT GAT TAT AGC CTA AGA CCC GGA G
Fusão <i>E2A/PBX1</i>	E2A-A - CAC CAG CCT CAT GCA CAA C PBX-B - TCG CAG GAG ATT CAT CAC G
Fusão <i>AF4/MLL</i>	MLL-A - CCG CCT CAG CCA CCT AC AF4-B - TGT CAC TGA GCT GAA GGT CG
Fusão <i>BCR/ABL1 p190</i>	BCR-e1-A - GAC TGC AGC TCC AAT GAG AAC ABL-a3-B - GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC
Fusão <i>BCR/ABL1 p210</i>	BCR-b1-A - GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C ABL-a3-B - GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC
Fusão <i>ETV6/RUNX1</i>	TEL-A - TGC ACC CTC TGA TCC TGA AC AML1-B - AAC GCC TCG CTC ATC TTG C

Fonte: elaborado pelo autor.

4.3.7 Avaliação da expressão de M-MDSCs (Imunofenotipagem - LCF)

As amostras em EDTA de SP e MO necessárias para a avaliação da expressão de M-MDSCs foram obtidas a partir das amostras já colhidas rotineiramente no hospital. Para isso, alíquotas de aproximadamente 200µL foram reservadas e armazenadas em tubos eppendorfs®, mantidas em ambiente seco, temperatura ambiente e ao abrigo da luz e então encaminhadas, no prazo máximo de 4 (quatro) horas, para o setor de hematologia do laboratório Clementino Fraga, onde se procedeu com o processamento, aquisição e análise. A marcação de antígenos de membranas seguiu o mesmo procedimento técnico anteriormente descrito. Para a avaliação da expressão de M-MDSCs, foram utilizados os seguintes AcMos: CD45 (PE-Cy5), CD14 (PE) e HLA-DR (FITC), todos adquiridos da BD Biosciences® (San Jose, CA, USA). Todas as aquisições foram realizadas com auxílio do citometro de fluxo FACSCalibur™ e as análises realizadas utilizando o software Cell-Quest (Becton-Dickinson®).

A estratégia utilizada para detecção de M-MDSCs foi montada pelo hematologista responsável técnico pela citometria de fluxo, e iniciou com a definição da região (R1) no *dot-plot* com CD45 versus complexidade interna (SSC), para determinar a população de células de linhagem linfomonocítica. Em seguida, a população especificamente de monócitos foi delimitada através da definição da região (R2) no *dot-plot* CD14 versus SSC. No terceiro *dot-plot*, a população de interesse, M-MDSCs (monócitos CD14⁺/HLA-DR^{-low}), foi delimitada e quantificada. As amostras de todos os pacientes foram avaliadas utilizando a mesma estratégia acima descrita. Para todas as análises realizou-se a aquisição de 100.000 eventos e, baseado nas padronizações sugeridas para avaliação de doença residual mínima em pacientes pediátricos com LLA-B por Theunissen e colaboradores (2017), considerou-se um mínimo de 40 eventos com concomitante CD14⁺ e HLA-DR^{-low} para se considerar a presença de M-MDSCs nas amostras avaliadas.

4.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* científico GraphPad Prism®, em sua versão 6.0. Os testes estatísticos utilizados foram definidos de acordo com a normalização dos dados, sendo selecionado o teste não paramétrico de Wilcoxon para realizar a comparação entre os grupos, o coeficiente não paramétrico de Spearman para determinar a correlação e o teste de Fisher para associações. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão.

4.5 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Hospital Infantil Albert Sabin, sob o número: 006.02.10, estando o projeto que resultou neste trabalho em conformidade com as orientações preconizadas na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

Ao fim do prazo estipulado para a captação de pacientes foram pré-selecionados para o estudo 33 (trinta e três) pacientes pediátricos atendidos e diagnosticados com LLA-B *de novo* no ambulatório de onco-hematologia/HIAS, e que atenderam aos critérios de inclusão. Entretanto, 18 (dezoito) pacientes foram posteriormente removidos do estudo por não ter sido possível a realização das imunofenotipagens para avaliação da expressão de M-MDSCs no D35 do SP ou MO. Do total de 18 (dezoito) pacientes excluídos, 56% (10/18) dos pacientes foram a óbito antes de concluir a terapia de indução, sendo a principal causa relatada a sepse. Os outros 44% (8/18) dos pacientes não compareceram aos retornos avaliativos pré-determinados pelo protocolo GBTLI-2009, o que interferiu nas coletas que deveriam ter ocorrido no D35, bem como, na aderência ao tratamento, portanto, também foram excluídos do estudo.

Dos 15 (quinze) pacientes que permaneceram no estudo, 53% (8/15) eram do sexo masculino e 47% (7/15) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou entre 1 e 17 anos, com média de idade de 8,5 anos. 20% (3/15) dos pacientes apresentavam idade inferior a 2 anos de vida, 67% (10/15) apresentavam idade entre 2 e 10 anos de vida e 13% (2/15) com idade superior a 10 anos.

5.1. Estratificação de Risco

Baseado nos critérios de estratificação de risco adotados pelo protocolo GBTLI-2009, 40% (6/15) dos pacientes foram estratificados como de baixo risco de recaída, enquanto que 60% (9/15) dos pacientes como alto risco relativo de recaída da doença. Todos os pacientes foram acompanhados até a conclusão da pesquisa por um período de até 22 meses (tempo de *follow-up*). Apenas um paciente (paciente número 5) foi a óbito um mês após a conclusão da terapia de indução, e, portanto foi o menor *follow-up* da pesquisa. A

tabela a seguir apresenta os dados dos pacientes e estratificação de risco até aqui demonstrados.

Tabela 3 - Dados e estratificação de risco.

ID	Sexo	Idade	Estratificação de Risco
1	M	9 anos	Alto Risco
2	M	9 anos	Alto Risco
3	F	15 anos	Alto Risco
4	M	3 anos	Baixo Risco
5	M	1 ano	Alto Risco
6	M	17 anos	Alto Risco
7	F	7 anos	Alto Risco
8	M	6 anos	Alto Risco
9	F	1 ano	Alto Risco
10	M	3 anos	Alto Risco
11	F	3 anos	Baixo Risco
12	F	2 anos	Baixo Risco
13	F	1 ano	Baixo Risco
14	F	5 anos	Baixo Risco
15	M	3 anos	Baixo Risco

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2. Estudo genético

O estudo citogenético revelou cariótipo aberrante em aproximadamente 47% (7/15) dos pacientes, que incluíram tanto alterações cromossômicas numéricas quanto estruturais. Cerca de 40% (6/15) apresentaram cariótipo sem aparentes alterações e 13% (2/15) não apresentaram crescimento celular, o que resultou em ausência de metáfases. No tocante ao estudo molecular, realizado por técnica de RT-PCR, aproximadamente 53% (8/15) dos pacientes apresentaram positividade para uma das fusões gênicas pesquisadas, desse total, 37,5% (3/8) demonstraram positividade para a fusão gênica *E2A/PBX1*, 37,5% (3/8)

positividade para fusão gênica *ETV6/RUNX1* e 25% (2/8) fusão gênica *AF4/MLL*. Nenhum paciente apresentou positividade para fusão gênica *BCR/ABL1*. A tabela a seguir apresenta os resultados citogenéticos e de RT-PCR de todos os pacientes inseridos no estudo. A figura 10 e 11 apresentam, respectivamente, os resultados de citogenética e RT-PCR do paciente número 1, que foi escolhido aleatoriamente.

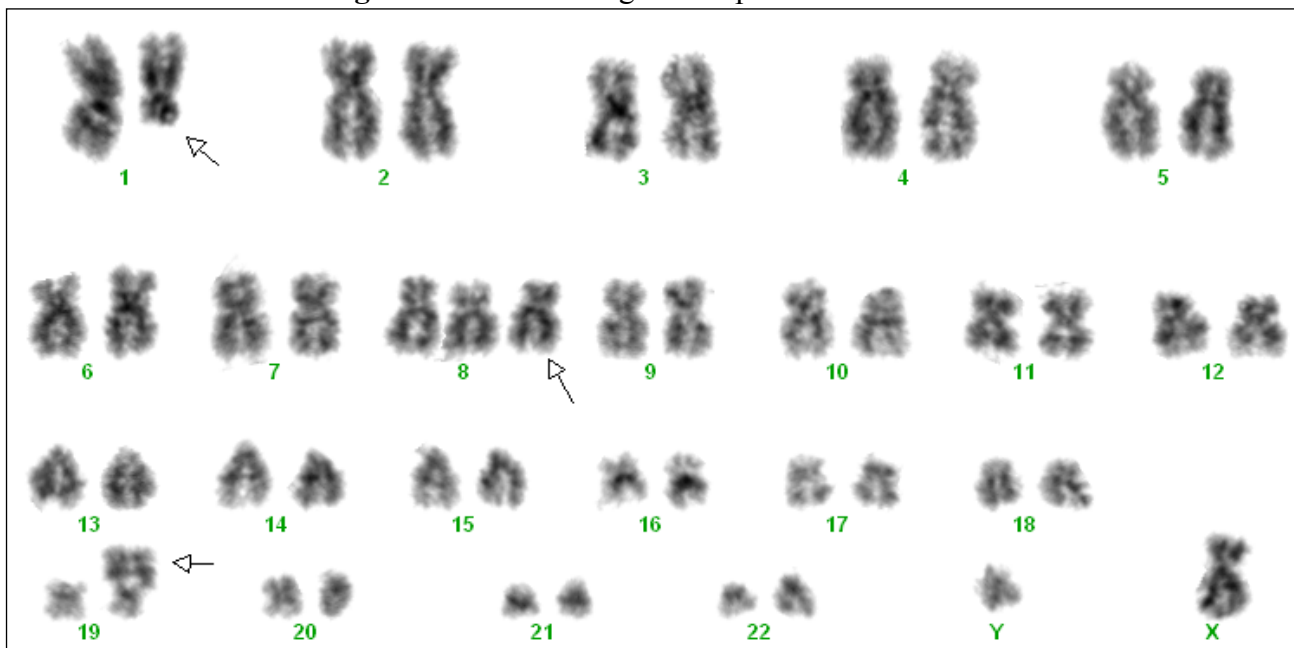
Tabela 4 - Resultados de cariótipo e estudo molecular.

ID	Análise Citogenética	RT-PCR
1	47,XY,t(1;19)(q23;q13),+8[16]	Positivo <i>E2A/PBX1</i>
2	46,XY,der(19)t(1;19)(q23;p13)[18]	Positivo <i>E2A/PBX1</i>
3	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[12]	Positivo <i>AF4/MLL</i>
4	55,XY,+X,+4,+6,+8,+9,+10,+13,+21+22[9]/46,XY[3]	Negativo
5	80,XXY,+X,+1,+2,+3,t(4;11)(q21;q23),+8,+12,+17,18,+19,+21,+22,+mar1,+mar2[9]/46,XY[3]	Positivo <i>AF4/MLL</i>
6	AM	Negativo
7	46,XX[20]	Negativo
8	46,XY,inv(9)(p12q13)c[20]	Positivo <i>E2A/PBX1</i>
9	AM	Positivo <i>ETV6/RUNX1</i>
10	54,XY,+X,+6,+14,+17,+18,+21,+21,+mar[10]/46,XY[10]	Negativo
11	46,XX[14]	Positivo <i>ETV6/RUNX1</i>
12	46,XX[16]	Negativo
13	46,XX[18]	Negativo
14	59,XX,+1,+4,+5,+6,+9,+11,+12,+14,+16,+17,+18,+21,+22[12]/46,XX[3]	Negativo
15	46,XY[18]	Positivo <i>ETV6/RUNX1</i>

AM: ausência de metáfases.

Fonte: Imagem obtida do banco de dados do setor de citogenética/HIAS.

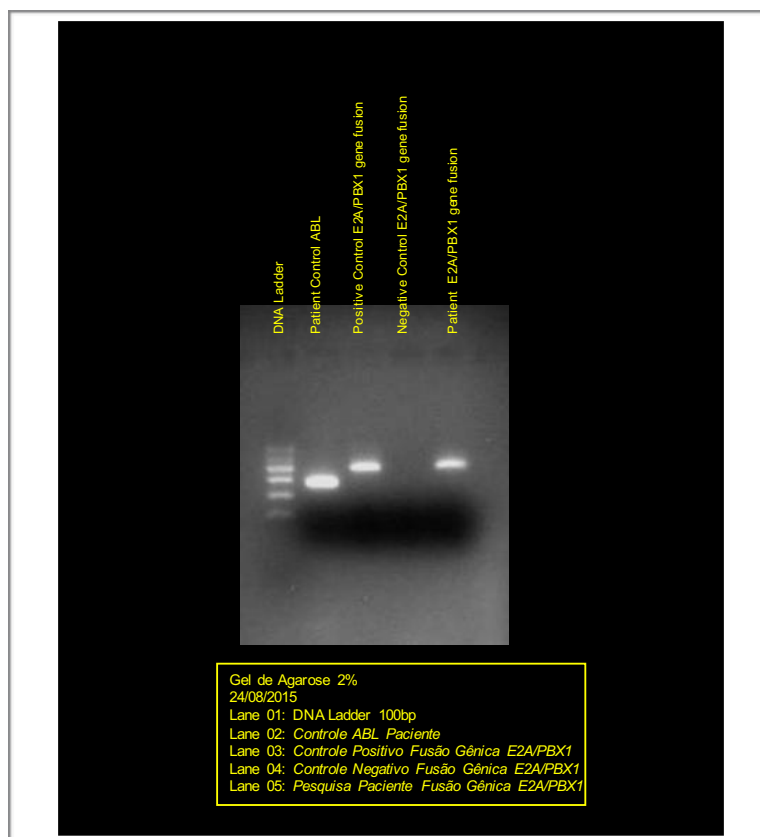
Figura 10. Estudo citogenético paciente número 1.



Análise citogenética revelou cariótipo com complemento sexual masculino apresentando em 100% das metáfases examinadas clone hiperdiplóide contendo translocação envolvendo os cromossomo 1 e 19 e trissomia do cromossomo 8 (47,XY,t(1;19)(q23;p13),+8).

Fonte: Imagem obtida do banco de dados do setor de citogenética/HIAS.

Figura 11 - Resultado RT-PCR paciente número 1.



Estudo molecular realizado por técnica de RT-PCR demonstrou positividade para fusão gênica E2A/PBX1, como resultado da translocação envolvendo os cromossomos 1 e 19.

Fonte: Imagem obtida do banco de dados do setor de genética molecular/HIAS.

5.3. Expressão de M-MDSCs em D0 e D35 por citometria de fluxo

Observou-se que 60% (9/15) dos pacientes inseridos no estudo apresentaram expansão de M-MDSCs ao final da terapia de indução (D35) quando comparado à avaliação realizada ao diagnóstico (D0). Desse total, identificou-se que aproximadamente 67% (6/9) apresentaram expansão concomitante no SP e na MO (pacientes números 1, 7, 9, 10, 11 e 12). Por outro lado, cerca de 33% (3/9) apresentaram expansão isolada no sangue periférico (pacientes números 2, 6 e 15). Nenhum paciente apresentou expansão isolada na medula óssea. A tabela a seguir, apresenta os resultados das imunofenotipagens para avaliação de M-MDSCs tanto do SP, quanto da MO em ambos os momentos de avaliação. Os resultados são apresentados em quantidade relativa e absoluta.

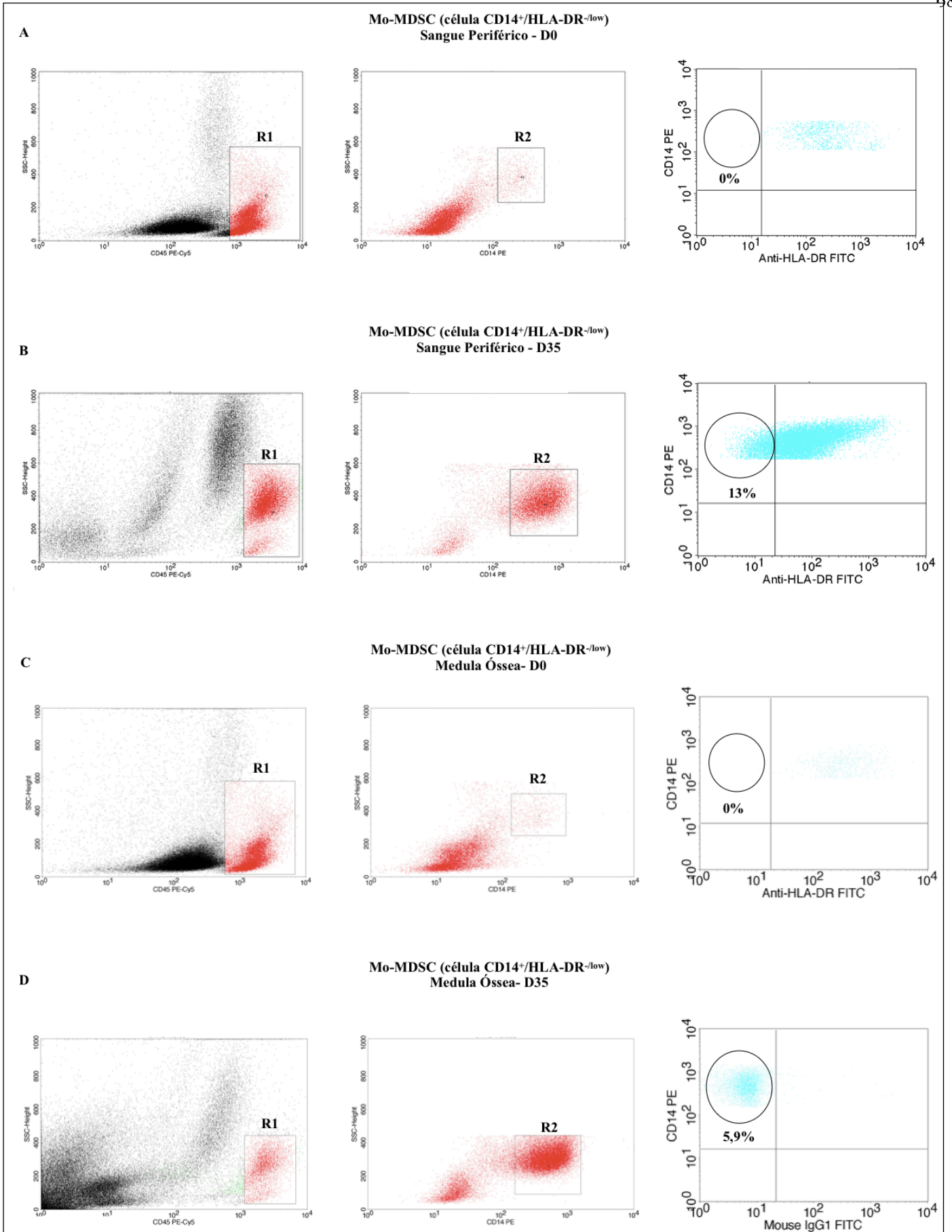
Tabela 05. Resultados de imunofenotipagem para detecção de M-MDSCs em SP e MO.

ID	Avaliação M-MDSCs em Sangue Periférico		Avaliação M-MDSCs em Medula Óssea	
	D0 (%) / (mm ³)	D35 (%) / (mm ³)	D0 (%) / (mm ³)	D35 (%) / (mm ³)
1	0% / (0 células/mm ³)	13% / (2.860 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	5.9% / (944 células/mm ³)
2	0% / (0 células/mm ³)	2.3% / (62 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
3	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
4	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
5	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
6	0% / (0 células/mm ³)	2.1% / (73 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
7	0% / (0 células/mm ³)	23.6% / (5.475 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	16% / (848 células/mm ³)
8	7.9% / (126 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
9	0% / (0 células/mm ³)	4.7% / (583 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	2.2% / (143 células/mm ³)
10	0% / (0 células/mm ³)	60.6% / (16.241 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	25.4% / (6.959 células/mm ³)
11	0% / (0 células/mm ³)	7.5% / (1.260 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	5.7% / (296 células/mm ³)
12	9.9% / (118 células/mm ³)	6.9% / (227 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	9.9% / (1.603 células/mm ³)
13	6.9% / (110 células/mm ³)	0.9% / (48 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
14	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)
15	0% / (0 células/mm ³)	0.6% / (78 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)

D0 = Dia zero do tratamento; D35 = Dia trinta e cinco do tratamento (final da terapia de indução). Valores apresentados em quantidade relativa e absoluta.

Fonte: elaborado pelo autor.

O paciente número 10 foi o que apresentou os maiores valores relativos e absolutos referente à expansão de M-MDSCs ao se comparar D0 e D35, partindo de uma situação em que não foram detectadas no D0 do SP e MO para 16.241 células/mm³ e 6.959 células/mm³ no D35 de SP e MO, respectivamente. Identificou-se que 20% (3/15) dos pacientes (pacientes 8, 12 e 13) demonstraram presença de M-MDSCs no D0, e que ficou confinado ao SP. Diferentemente dos pacientes 12 e 13 que mantiveram a presença de M-MDSCs no D35 do SP, o paciente número 8 não apresentou expansão de M-MDSCs ao fim da terapia de indução. A figura a seguir apresenta os *dot-plots* de análise individual do paciente número 1, em ambos os momentos e em ambos os compartimentos avaliados. A tabela 06 apresenta os dados de todos os pacientes de forma consolidada.



Análise por citometria de fluxo de SP no D0 (A), D35 (B) e de MO no D0 (C) e D35 (D). Em A, o primeiro dot-plot (CD45 vs. SSC) delimitou a região correspondente à população de células linfomonocitárias (R1). O segundo dot-plot (CD14 vs. SSC) delimitou a região referente à população de células monocitárias (R2). O terceiro dot-plot (HLA-DR vs. CD14) delimitou a região de interesse (M-MDSCs), que está demonstrada na região de círculo. A mesma estratégia foi utilizada em B, C e D.

Fonte: Imagens obtidas do banco de dados do setor de hematologia/LCF.

Tabela 6 - Dados consolidados de todos os pacientes.

ID	Sexo	Idade	Estratificação de Risco	Análise Citogenética	RT-PCR	Avaliação Mo-MDSCs em Sangue Periférico		Avaliação Mo-MDSCs em Medula Óssea		Follow-Up
						D0 (%) / (mm ³)	D35 (%) / (mm ³)	D0 (%) / (mm ³)	D35 (%) / (mm ³)	
1	M	9 anos	Alto Risco	47,XY,t(1;19)(q23;q13)+8 16	E24/PBX1 positive	0% / (0 células/mm ³)	13% / (2.860 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	5,9% / (944 células/mm ³)	22 meses
2	M	9 anos	Alto Risco	46,XY,der(19)t(1;19)(q23;p13)[18]	E24/PBX1 positive	0% / (0 células/mm ³)	2,3% / (62 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	21 meses
3	F	15 anos	Alto Risco	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[12]	AF4/MLL positive	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	20 meses
4	M	3 anos	Baixo Risco	55,XY,+X,+4,+6,+8,+9,+10,+13,+21+22[9]/46,XY[3]	Negative	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	20 meses
5	M	1 ano	Alto Risco	80,XXY,+X,+1,+2,+3,(4;11)(q21;q23)+8,+12,+17,-18,+19,+21,+22,+mar1,+mar2[9]/46,XY[3]	AF4/MLL positive	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	2 meses*
6	M	17 anos	Alto Risco	AM	Negative	0% / (0 células/mm ³)	2,1% / (73 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	15 meses
7	F	7 anos	Alto Risco	46,XX[20]	Negative	0% / (0 células/mm ³)	23,6% / (5.475 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	16% / (848 células/mm ³)	14 meses
8	M	6 anos	Alto Risco	46,XY,inv(9)(p12q13)[20]	E24/PBX1 positive	7,9% / (126 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	12 meses
9	F	1 ano	Alto Risco	AM	ETV6/RUNX1 positive	0% / (0 células/mm ³)	4,7% / (583 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	2,2% / (143 células/mm ³)	10 meses
10	M	3 anos	Alto Risco	54,XY,+X,+6,+14,+17,+18,+21,+21,+mar1[10]/46,XY[10]	Negative	0% / (0 células/mm ³)	60,6% / (16.241 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	25,4% / (6.959 células/mm ³)	10 meses
11	F	3 anos	Baixo Risco	46,XX[14]	ETV6/RUNX1 positive	0% / (0 células/mm ³)	7,5% / (1.260 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	5,7% / (296 células/mm ³)	10 meses
12	F	2 anos	Baixo Risco	46,XX[16]	Negative	9,9% / (118 células/mm ³)	6,9% / (227 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	9,9% / (1.603 células/mm ³)	7 meses
13	F	1 ano	Baixo Risco	46,XX[18]	Negative	6,9% / (110 células/mm ³)	0,9% / (48 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	6 meses
14	F	5 anos	Baixo Risco	59,XX,+1,+4,+5,+6,+9,+11,+12,+14,+16,+17,+18,+21,+22[12]/46,XX[3]	Negative	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	6 meses
15	M	3 anos	Baixo Risco	46,XY[18]	ETV6/RUNX1 positive	0% / (0 células/mm ³)	0,6% / (78 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	0% / (0 células/mm ³)	3 meses

D0 = Diagnóstico

D35 = Dia 35 do tratamento (Final Terapia de Indução)

AM = Ausência de Metáfases

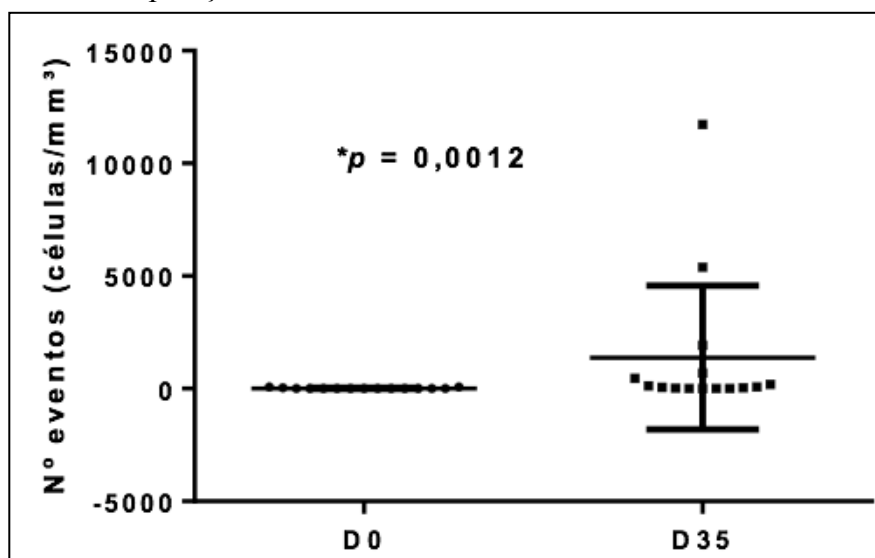
*Óbito

Fonte: elaborado pelo autor.

5.4. Avaliação estatística

Quando comparou-se a expressão de M-MDSCs na medula óssea entre D0 e D35, observou-se um aumento, estatisticamente significativo ($p=0,0012$), na expressão dessas células (em número absoluto de eventos) ao fim dos 35 dias da terapia de indução. Em se tratando do sangue periférico, observou-se também um aumento, estatisticamente significativo ($p=0,0006$), na expressão de M-MDSCs (em número absoluto de eventos) no D35. As figuras 13 e 14 apresentam as comparações realizadas através do teste não paramétrico de Wilcoxon entre D0 e D35 na MO e SP, respectivamente.

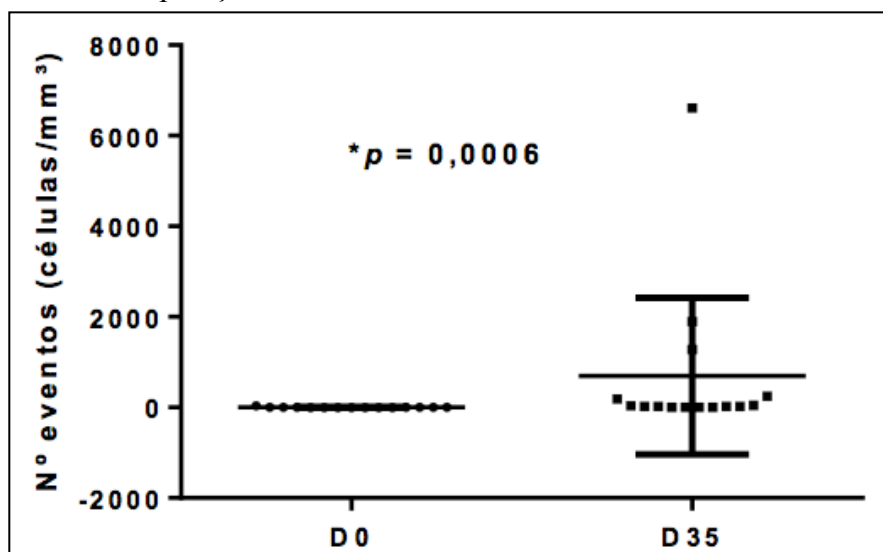
Figura 13 - Comparação de médias do número de eventos em MO em D0 e D35.



Comparação de médias do número de eventos na medula óssea nos momentos D0 e D35 ($15,93 \pm 7,033$ versus $1383 \pm 823,4$; $n=15$). Valor de p obtido através do teste de Wilcoxon. * $p=0,0012$.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 14 - Comparação de médias do número de eventos em SP no D0 e D35.

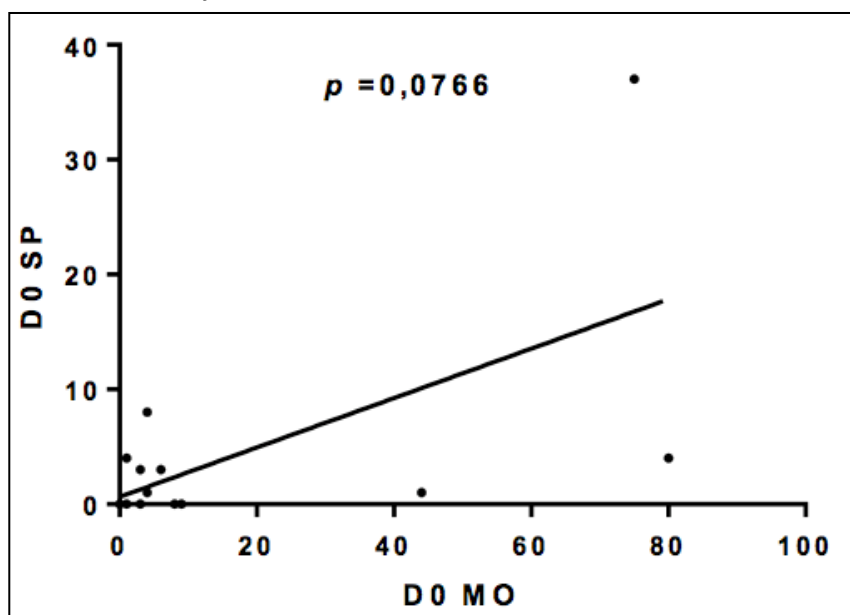


Comparação de média do número de eventos no sangue periférico nos momentos D0 e D35 ($4,067 \pm 2,427$ versus $693 \pm 446,4$; $n=15$). Valor de p obtido através do teste de Wilcoxon. * $p=0,0006$.

Fonte: elaborado pelo autor.

Aplicou-se o coeficiente de Spearman para correlacionar o aumento na expressão de M-MDSCs (quantidade absoluta em número de eventos) nos dois momentos de análise, ou seja, se o aumento na expressão em SP se correlaciona com o aumento na MO, concomitantemente em D0 e/ou em D35. Observou-se somente no D35 a ocorrência de uma correlação positiva, estatisticamente significativa ($p<0,0001$), em que o aumento na expressão de M-MDSCs em SP se correlaciona com aumento também na MO. As figuras 15 e 16 apresentam os resultados das análises estatísticas de correlação realizadas em D0 e D35, respectivamente.

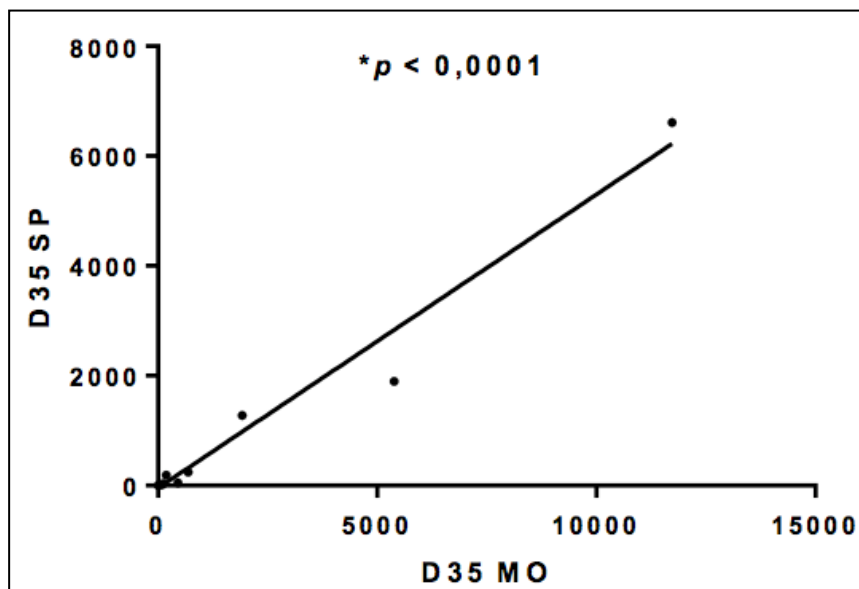
Figura 15 - Correlação do número de eventos no momento D0 no SP e MO.



Correlação do número de eventos no momento D0 no sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) ($r = 0,4731$; $Y = 0,2151X + 0,6397$; $n = 15$). Valor de p obtido através da correlação de Spearman. $p=0,0766$.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 16 - Correlação do número de eventos no momento D35 no SP e MO.

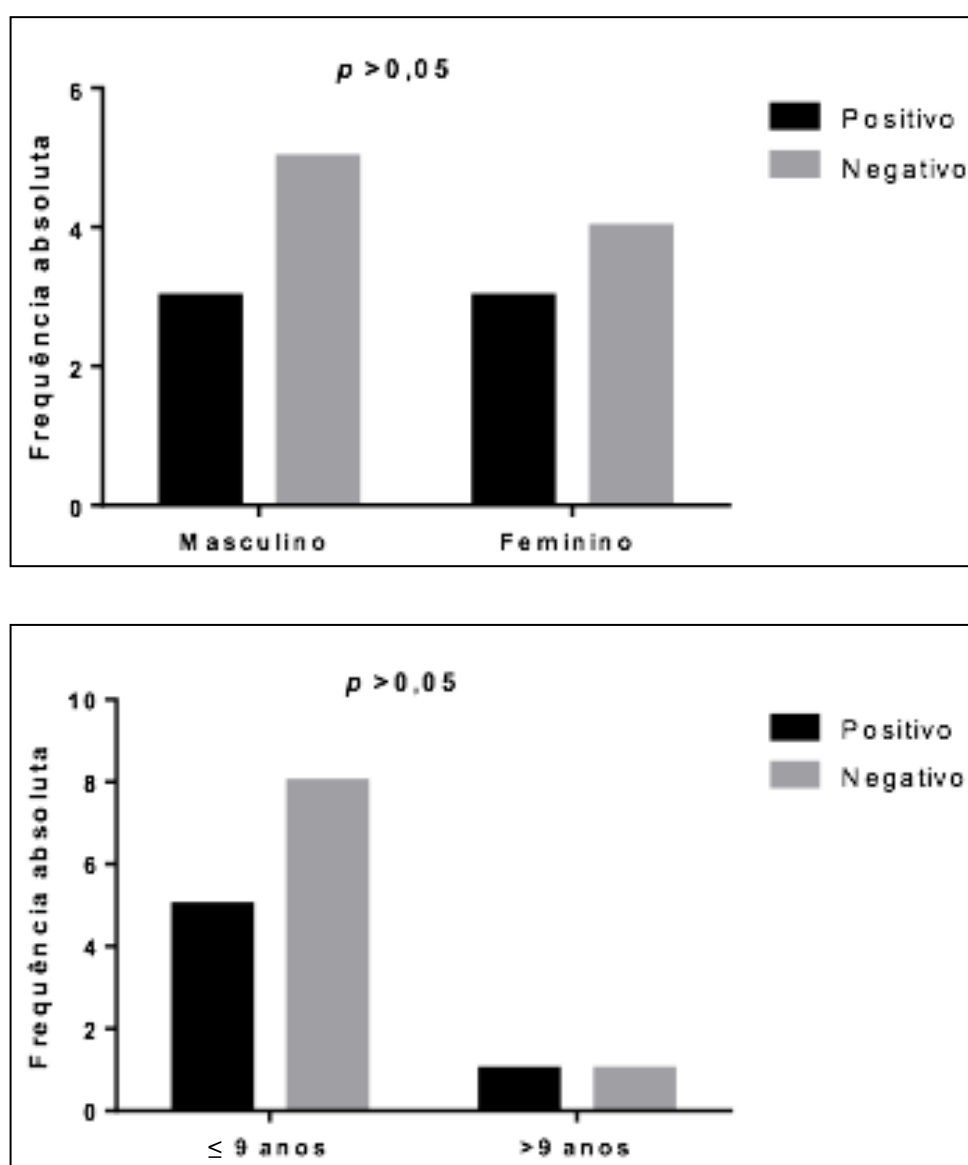


Correlação do número de eventos no momento D35 no sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) ($r = 0,8750$; $Y = 0,5345X - 46,12$; $n = 15$). Valor de p obtido através da correlação de Spearman. $*p < 0,0001$.

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao se tentar associar dados clínicos e laboratoriais como gênero, idade, estratificação de risco, achado citogenético e achado molecular com aumento na expressão de M-MDSCs, nenhuma das variáveis acima apresentou valor estatisticamente significativo, ou seja, o aumento na expressão dessas células não foi associado com essas variáveis. As figuras 17 e 18 demonstram os resultados das análises estatísticas de associação utilizando teste de Fisher para cada variável avaliada.

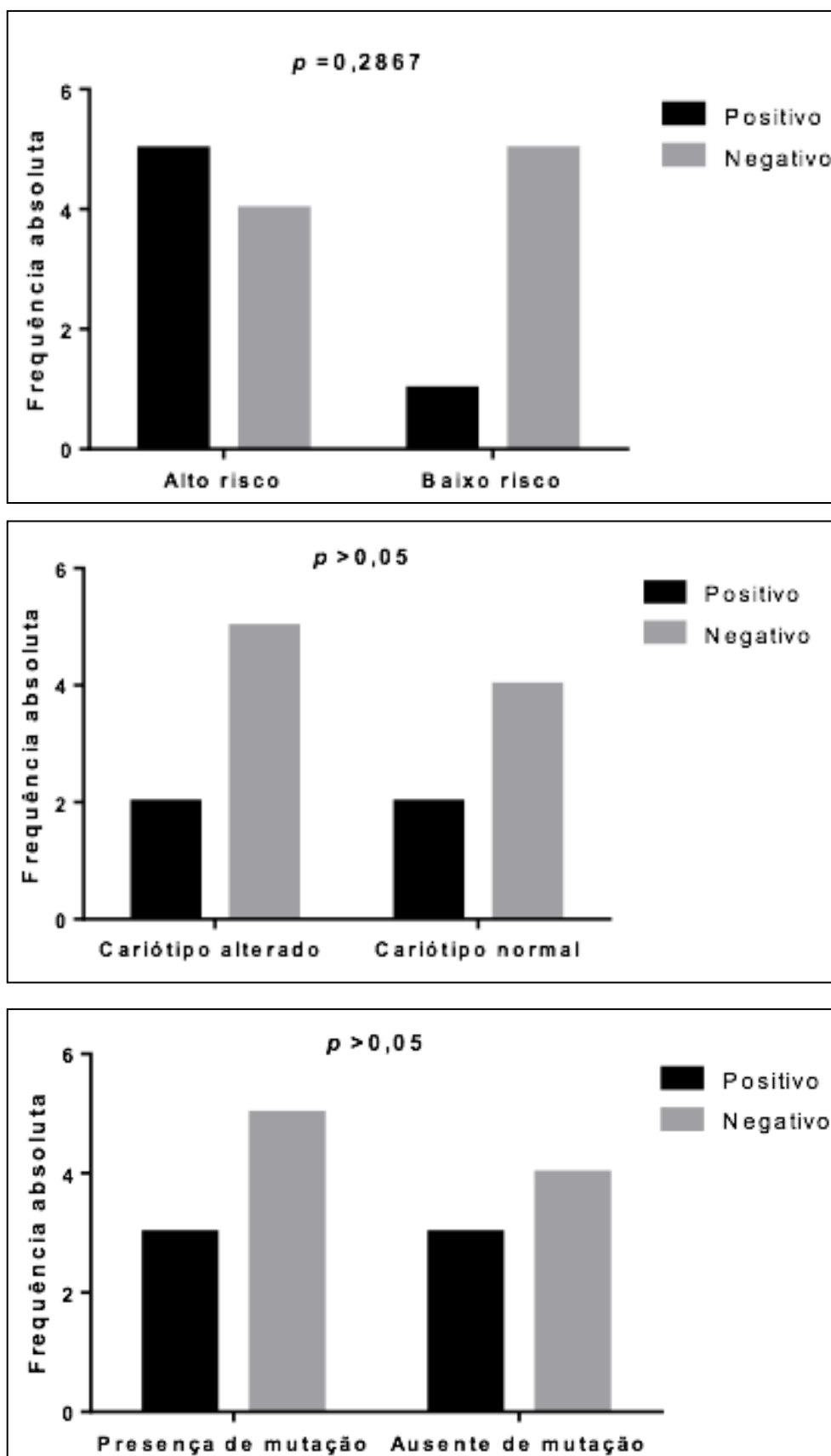
Figura 17 - Associação entre gênero e idade com casos positivos e negativos para expressão de M-MDSCs.



Sem distinção se em MO ou SP.

Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 18 - Associação entre grupos de risco, cariótipo e presença de mutação com os casos positivos e negativos para expressão de M-MDSCs.



Sem distinção se em MO ou SP.

Fonte: elaborado pelo autor.

Não foi possível estabelecer uma curva de sobrevida (Kaplan-Meyer), pois para isso é necessário que seja estipulado um desfecho a ser avaliado em um determinado período de tempo. Em nosso estudo só foi possível realizar duas análises em momentos específicos (D0 e D35), uma vez que as coletas de amostras para diagnóstico e avaliação de resposta ocorrem de acordo com o protocolo de tratamento vigente no hospital, não se admitindo coletas fora das datas estipuladas.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-B) é uma doença caracterizada pela transformação maligna e consequente proliferação aberrante de células precursoras linfóides, que se acumulam na medula óssea, sangue periférico e em outros sítios extramedulares, incluindo sistema nervoso central, testículos e baço. Representa o principal tipo de câncer em crianças, possuindo, atualmente, altas taxas de cura e desfecho clínico favorável, porém, quando em se tratando da população adulta, as taxas são inferiores e o desfecho clínico geralmente é desfavorável (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Embora as taxas de cura possam ultrapassar 85% dos pacientes pediátricos com LLA-B, devido, principalmente, aos avanços tecnológicos que permitem diagnósticos mais precoces e precisos, melhorias nos esquemas terapêuticos atuais, melhores critérios de estratificação de risco e avaliação da doença residual mínima, aproximadamente 15 a 20% desses pacientes sofrem recaída da doença, usualmente no sistema nervoso central, sendo justamente a falha terapêutica a principal causa (COOPER; BROWN, 2015).

A etiopatologia específica da doença permanece desconhecida e, assim como em outros tipos de neoplasias, resulta da ação direta de inúmeros fatores e agentes (químicos, físicos e biológicos) com reconhecida ação clastogênica e genotóxica sobre o DNA de um progenitor linfóide, tendo como consequência alteração dos mecanismos regulatórios dos processos de proliferação e morte celular, controle do ciclo celular e reparo do DNA, sendo essa a base genética de desenvolvimento do *pool* monoclonal leucêmico (WIEMELS, 2012). Ressalta-se ainda que, em se tratando de LLA-B, existem situações de predisposição genética associada com maior risco de leucemogênese, entre elas pode-se citar os pacientes portadores de síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, ataxia telangiectasia, entre outras, além dos polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) em genes específicos, pois contribuem para a instabilidade genômica e favorecem a ocorrência de novas lesões genéticas (mutações) que poderão, mais adiante, favorecer a progressão tumoral (PUI; ROBISON; LOOK, 2008; WIEMELS, 2012).

A grande heterogeneidade observada entre os diversos subtipos de LLA-B, com base nos achados morfológicos, imunológicos e genéticos, exerce impacto direto sobre os diferentes tipos de desfechos clínicos observados em pacientes acometidos com essa patologia, contudo, é sensato afirmar que a evolução da doença, incluindo o risco de recaída tardia e a responsividade ao tratamento, também pode ser considerada dependente de outros fatores não relacionados somente com as propriedades intrínsecas dos blastos leucêmicos. Recentemente, uma revisão realizada por Fouad e Aanei (2017) descreveu de forma mais precisa as características compartilhadas pelos diversos tipos de neoplasias e que são necessárias para o processo de iniciação e progressão tumoral. Dentre estas características, pode-se afirmar que o escape da imunovigilância, por meio de evasão do sistema imune pelas células tumorais, seja um dos eventos mais importantes clinicamente, pois irá inabilitar quaisquer tentativas do sistema imune em eliminar o clone tumoral e poderá, por consequência, contribuir também para a evolução da doença, interferir na resposta ao tratamento e ser decisório no desfecho clínico (MUNST *et al.*, 2016; VINAY *et al.*, 2015).

Essa imunomodulação realizada pelas células tumorais sobre o sistema imune do hospedeiro consiste em um processo dinâmico, mediado por diferentes mecanismos, mas que, via de regra, podem ser simplificados como sendo a secreção de moléculas imunomoduladoras e o recrutamento e ativação de células inflamatórias imunossupressoras para o sítio tumoral, onde todos esses elementos irão cooperar sinergicamente entre si para criar um ambiente imunossupressivo propício à progressão tumoral, invasão tecidual e metástase (CHEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017). Em se tratando especificamente da LLA-B, foi demonstrado que as células leucêmicas são capazes de moldar o microambiente tumoral de acordo com suas necessidades, com o intuito de obter suporte para sua proliferação e sobrevivência (PURIZACA; MEZA; PELAYO, 2012; SISON; BROWN, 2011). Essa moldagem resulta de uma íntima interação entre células leucêmicas e as diversas outras células, bem como, de outros constituintes, que constituem o microambiente tumoral (MAT) e que aliado à instabilidade genômica, as alterações cromossômicas e as mutações genéticas, poderão repercutir no desenvolvimento de resistência quimioterápica e acarretar falha terapêutica (DUAN *et al.*, 2014; MUDRY *et al.*, 2000; TESFAI *et al.*, 2012).

Dentre as células inflamatórias imunossupressoras que são recrutadas e ativadas pelas células neoplásicas e que irão se acumular no MAT, destacam-se as células supressoras derivadas de linhagem mielóide (MDSCs), uma população heterogênea de células mielóides imaturas com forte atividade imunossupressora sobre a função de células T CD8⁺ e NK, e consequentemente sobre a resposta imune celular antitumoral (DE SANCTIS *et al.*, 2016). De forma generalizada, a atividade imunossupressora exercida pelas MDSCs é oriunda de diversos mecanismos que incluem depleção de nutrientes essenciais para funcionalidade das células T, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, interferência nos processos de migração e ativação de células T, expansão de linfócitos Treg, reprogramação macrofágica M1/M2, secreção de moléculas imunomodulatórias, entre outros (BRONTE *et al.*, 2016). Entretanto, salienta-se que esses mecanismos não são executados uniformemente pelos dois principais subtipos de MDSCs em humanos descritos até o presente momento, G-MDSC e M-MDSC, e embora os dois subtipos possam ser encontrados no sangue periférico, sabe-se que o subtipo M-MDSC é o mais prevalente no MAT e também o que apresenta atividade imunossupressora mais pronunciada, quando se comparada às G-MDSCs (KUMAR *et al.*, 2016; MARVEL; GABRILOVICH, 2015; QU; WANG; LIN, 2016).

A infiltração dessas células no MAT já foi descrita em diversos tipos de neoplasias incluindo adenocarcinoma pancreático, melanoma, glioblastoma, carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de cólon, leucemias e linfomas (CONDAMINE *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; MARVEL; GABRILOVICH, 2015; UMANSKY *et al.*, 2016). Uma vez acumuladas e ativadas no sítio tumoral, as MDSCs induzem um estado de imunossupressão que favorece a sobrevivência das células tumorais ao permitirem que elas escapem da destruição celular mediada pelo sistema imune, através de mecanismos anteriormente descritos, contudo, as MDSCs podem também promover a angiogênese tumoral, via secreção de metaloproteinase-9 (MMP-9) e Bv8, esse último atuando na regulação de STAT3 e secreção de VEGF (CONDAMINE *et al.*, 2015; KUJAWSKI *et al.*, 2008; QU *et al.*, 2012), e podem também promover a invasão tecidual e metástase ao desregular as proteínas de adesão e as caderinas endoteliais, além de induzir a transição epitélio-mesenquimal (EMT) e a transição mesenquimal-epitelial (MET) (GAO *et al.*, 2012; TOH *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, nos propomos a avaliar a expressão de M-MDSCs em pacientes pediátricos com LLA-B *de novo* em dois momentos distintos, o primeiro ao diagnóstico (paciente sem tratamento prévio) e o segundo ao fim da terapia de indução, correspondendo ao trigésimo quinto dia (D35), segundo o preconizado pelo grupo brasileiro de tratamento das leucemias infantis (GBTLI-2009). Diferentemente da grande maioria dos estudos que avaliaram a expressão de MDSCs em pacientes com câncer em apenas um compartimento, geralmente o sangue periférico, nós incluímos em nosso estudo a avaliação desse compartimento e também o compartimento medular, que no caso dos pacientes portadores de LLA-B, corresponde ao próprio microambiente tumoral.

Com os dados obtidos em nossa pesquisa, foi possível observar que as M-MDSCs não faziam parte da constituição celular do microambiente tumoral dos pacientes pediátricos com LLA-B avaliados, uma vez que essa população de células não foi detectada no compartimento medular de nenhum dos pacientes ao diagnóstico. Tal observação nos faz acreditar, que os mecanismos envolvidos com a desregulação do sistema imune, que é um dos eventos requerido para a tumorigênese, esteja associado com outras vias que não aquelas reguladas por M-MDSCs. Em um estudo recente, Liu e colaboradores (2017) avaliaram a expansão de M-MDSCs e G-MDSCs no SP e MO de pacientes pediátricos com LLA-B, incluindo avaliação ao diagnóstico, e demonstraram que as M-MDSCs não estão expandidas em quantidade absoluta ou em frequência em nenhum dos dois compartimentos avaliados quando comparados aos pacientes controles, tal observação se assemelha àquela evidenciada em nossa pesquisa. Entretanto, esses pesquisadores conseguiram demonstrar que as G-MDSCs, de forma específica, estavam expandidas em quantidade absoluta e em frequência ao diagnóstico e em ambos os compartimentos avaliados, nos levando a crer que esse subtipo de MDSC, em especial, possa estar associado com os mecanismos iniciais de imunossupressão requeridos para o processo de leucemogênese.

Diferentemente dos achados reportados por Liu e colaboradores (2017), demonstramos em nosso estudo que 60% (9/15) dos pacientes pediátricos com LLA-B avaliados, apresentaram expansão em quantidade absoluta e relativa de M-MDSCs ao fim da terapia de indução e em ambos os compartimentos avaliados, de forma concomitante em

67% dos pacientes (pacientes 1, 7, 9, 10, 11 e 12), e de forma isolada no sangue periférico em 33% dos pacientes (pacientes 2, 6 e 15), sendo o aumento ao fim do D35 estatisticamente significativo tanto para a MO ($p=0,0012$), quanto para o SP ($p=0,0006$). Essa expansão isolada no SP pode estar associada com o processo de mielopoiese extramedular, ou seja, a mielopoiese que ocorre em sítios diferentes da medula óssea e que pode ser observada durante a resposta imune, em casos de sepse e também de inflamação crônica, onde progenitores mielóides migram da MO para tecidos periféricos ou vasos linfáticos e então diferenciam-se em MDSCs, para, somente em seguida, serem recrutadas e ativadas pelas células tumorais e assim modularem o microambiente medular a favor do tumor (KIM, 2010; MILLRUD; BERGENFELZ; LEANDERSSON, 2017; QU; WANG; LIN, 2016). Acreditamos, entretanto, que a expansão das M-MDSCs observada em nossos pacientes após o fim da terapia de indução da remissão, tenha sido induzida por um processo de inflamação, gerada em decorrência da exposição às drogas quimioterápicas citotóxicas utilizadas nos regimes terapêuticos preconizados pelo GBTLI-2009. Essa suposição se alicerça em dados recentes que demonstraram que a exposição a certos drogas antineoplásicas parece induzir a produção de fatores de crescimento e inúmeras citocinas e quimiocinas inflamatórias, como o GM-CSF, G-CSF, IL-1, IL-6 e CCL2, que, por sua vez, favorecem o recrutamento, ativação e expansão das MDSCs (DING; MUNN; ZHOU, 2014).

Em um estudo prévio utilizando modelo animal, Ding e colaboradores (2014) demonstraram que a ciclofosfamida, um agente alquilante utilizado para o tratamento de diversos tipos de malignidades, e que também é adotada pelo GBTLI-2009 para tratamento da LLA-B pediátrica, foi capaz de induzir a expansão de células mielóides monocíticas imunossupressoras (CD11b⁺/LYCC^{hi}/CCR2^{hi}), que são equivalentes às M-MDSCs em humanos, porém não iguais, em camudongos com linfoma de células B estágio avançado ou câncer de colón metastático. Em outro estudo, Mougiakakos e colaboradores (2013) evidenciaram um aumento na frequência de M-MDSCs (monócitos CD14⁺/HLA-DR^{low/-}) no SP de pacientes submetidos a transplante alogênico de células tronco hematopoéticas, em decorrência de um processo inflamatório. Ressaltamos ainda que, outras drogas quimioterápicas, como o mephalan (um agente alquilante), a doxorubicina (antraciclina) e o sunitinibe (inibidor tirosino-quinase), também já foram descritas na literatura como sendo capazes de induzir o aumento na quantidade de MDSCs circulantes (DING; MUNN; ZHOU,

2014; MARVEL; GABRILOVICH, 2015). Dessa forma, podemos especular que outros agentes quimioterápicos, incluindo aqueles utilizados terapia de indução da remissão e também dos outros blocos terapêuticos adotados pelo protocolo GBTLI-2009, possam também contribuir para a expansão dessas células.

Corroborando os nossos achados e sustentando nossa suposição de que drogas quimioterápicas citotóxicas parecem exercer papel crucial no recrutamento, ativação e expansão de MDSCs, Salem e colaboradores (2018), recentemente, demonstraram a expansão em quantidade absoluta de MDSCs circulantes no sangue periférico de pacientes pediátricos com LLA-B, após a terapia de indução. Curiosamente, os autores também observaram que a quantidade absoluta de células Treg, que são células recrutadas e ativadas pelas MDSCs para promover suas ações imunossupressivas, diminuíram em quantidade absoluta após a terapia. Contudo, tanto nesse estudo quanto no nosso, ficou impossível determinar se o agente alquilante ciclofosfamida e/ou outros agentes citotóxicos utilizados no tratamento desse tipo de leucemia seriam os responsáveis pela expansão das M-MDSCs e, mais adiante, também se tornou impossível avaliar se essa expansão poderia contribuir para a progressão tumoral, para perda de responsividade terapêutica ou para recaída tardia da doença, embora acreditemos que esses sejam eventos passíveis de ocorrência nesses pacientes, uma vez que já foi demonstrado que o número de MDSCs circulantes no sangue periférico correlaciona-se com o estágio clínico e a carga tumoral metastática de diversos tipos de tumores (DIAZ-MONTERO *et al.*, 2009). Para elucidar esses questionamentos, são requeridos mais estudos que contemplem um número maior de pacientes, com maior tempo de *follow-up* e que incluam avaliações seriadas da expressão das M-MDSCs em cada bloco do tratamento.

Interessantemente, três pacientes do nosso estudo (pacientes 8, 12 e 13) demonstraram presença de M-MDSCs ao diagnóstico e que ficaram confinadas ao sangue periférico. Não temos uma hipótese para esse fenômeno, porém podemos especular que a não detecção dessas células em amostras de medula óssea, provavelmente possa ser justificada pelo fato de que as M-MDSCs, uma vez acumuladas no sítio tumoral (microambiente medular), tenham sido rapidamente recrutadas pelas células tumorais e

entrado em um processo de diferenciação, que as transformou em um tipo específico de macrófagos, conhecidos como macrófagos associados a tumores (TAMs), como sugerido por dados recentes (KUMAR *et al.*, 2016).

Intrigantemente, verificamos uma cinética incomum e inesperada das M-MDSCs em dois pacientes inseridos na pesquisa (pacientes 8 e 13). Nesses pacientes, a quantidade absoluta e relativa de M-MDSCs diminuíram após a terapêutica inicial de indução. Curiosamente, um achado semelhante foi detectado em pacientes com diagnóstico de leucemia linfocítica crônica (LLC), em que foi observada uma redução na frequência de M-MDSCs (monócitos CD14⁺/HLA-DR^{low/-}) após o tratamento quimioterápico (GUSTAFSON *et al.*, 2012). Em nosso estudo não foi possível estabelecer nenhuma associação estatisticamente significativa entre o aumento na expressão de M-MDSCs e variáveis clínico-laboratoriais como idade, gênero, estratificação de risco, alterações citogenéticas ou rearranjos gênicos, muito provavelmente como consequência do número reduzido de pacientes investigados (n=15). Também não conseguimos associar, de forma estatisticamente significativa, a expansão de M-MDSCs com a falha da quimioterapia indutória, uma vez que nenhum dos pacientes inseridos no estudo apresentou falha da remissão.

Diversos ensaios clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que os regimes terapêuticos utilizando drogas quimioterápicas, para tratamento de diversos tipos de neoplasias, tornam-se mais eficazes quando associados com estratégias terapêuticas direcionadas às MDSCs (MARVEL; GABRILOVICH, 2015; WESOLOWSKI; MARKOWITZ; CARSON, 2013). De modo geral, essas estratégias podem ser divididas em 4 (quatro) grupos, que incluem a eliminação das MDSCs, a inativação das MDSCs, a inibição da diferenciação de células mielóides em MDSCs e indução da diferenciação de MDSCs em células maduras (FLEMING *et al.*, 2018; WESOLOWSKI; MARKOWITZ; CARSON, 2013). Em um estudo recente, Wang e colaboradores (2018) conseguiram demonstrar em modelo animal, que a eficácia imunoterapêutica do agente anti-PD1 sobre o câncer de pulmão é elevada quando administrado concomitantemente com antagonista de CCL2, uma citocina quimioatrativa, que reduz a quantidade e a funcionalidade das MDSCs. Sade-Feldman e colaboradores (2016), demonstraram que pacientes com melanoma estágio

IV tratados com o anticorpo monoclonal ipilimumabe (anti-CTLA4) também se beneficiaram com a redução na quantidade e funcionalidade das MDSCs. Esses dados são de extrema importância pois confirmam que as MDSCs podem ser úteis tanto como marcadores biológicos de prognóstico, quanto alvos terapêuticos para o tratamento adjuvante em de diversas neoplasias, incluindo também, no futuro, a própria LLA-B pediátrica, uma vez que, nos últimos anos, as MDSCs receberam um enfoque especial ao serem consideradas um alvo potencial em diversas malignidades hematológicas, pois melhoram os efeitos dos agentes imunomoduladores usados na atualidade (VEIRMAN *et al.*, 2014).

Por fim, ressaltamos que o presente estudo foi pioneiro ao demonstrar a ocorrência de expansão em quantidade absoluta e relativa das M-MDSCs em pacientes pediátricos com LLA-B, e, não obstante, que essa expansão tenha sido, muito provavelmente, induzida pela terapia de indução da remissão, o que foi observado em ambos os compartimentos avaliados, ou seja, ficou evidenciado que as drogas citotóxicas que estão incluídas no protocolo de tratamento preconizado pelo GBTLI-2009, possam estar contribuindo para a criação de um microambiente medular imunossupressivo e tornando as células leucêmicas aptas a evadir da destruição celular mediada pelo sistema imune, além de poderem estar colaborando para a progressão da doença, para a perda de responsividade ao tratamento e para o desfecho clínico desfavorável, através de mecanismos ainda não totalmente elucidados, mas que foram brilhantemente revisados por Katoh e Watanabe (2015).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, sugerimos que os resultados produzidos nessa pesquisa, aliados a outros dados aqui apresentados, possam ser utilizados pelo comitê organizador do protocolo GBTLI durante a próxima revisão, pois poderão orientar novas abordagens terapêuticas no futuro, e com isso aumentar as taxas de curas e a sobrevida livre de doença, bem como reduzir o índice de recaída tardia e os efeitos genotóxicos associados à quimioterapia.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

- A expressão das células supressoras derivadas de linhagem mielóide (MDSCs), especificamente as M-MDSCs (subtipo monocítico - CD14⁺/HLA-DR^{low/-}), foi detectada ao final da quimioterapia de indução da remissão, como consequência de um processo inflamatório induzido por um ou mais agentes citotóxicos utilizados nessa primeira fase do tratamento preconizado pelo GBTLI-2009;
- As M-MDSCs não representam constituintes do microambiente medular em pacientes pediátricos com LLA-B;
- Não foi visto uma possível associação, estatisticamente significativa, entre o aumento da expressão das M-MDSCs e os grupos de estratificação de risco;
- Não foi observado associação, estatisticamente significativa, entre o aumento da expressão das M-MDSCs e os dados clínicos-laboratoriais, de idade, gênero, aberrações cromossômicas e fusões gênicas específicas;
- Também não se conseguiu estabelecer uma eventual associação, estatisticamente significativa, entre o aumento na expressão de M-MDSCs e a falha de resposta indutória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTHONY, B.A.; LINK, D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. **Trends Immunol.** v.35(1), p.32-37, 2014.

ARBER, D.A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M.J.; LE BEAU, M.M.; BLOOMFIELD, C.D.; CAZZOLA, M.; VARDIMAN, J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood.** v. 127(20), p.2391-2405, 2016.

BELSON, M.; KINGSLEY, B.; HOLMES, A. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect.** v .115(1), p. 138-145, 2007.

BRANDALISE, S.R.; PINHEIRO, V.R.; LEE, M.L. GBTLI. Grupo Brasileiro para o Tratamento de Leucemia Infantil. Protocolo de tratamento da leucemia linfóide aguda em crianças. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica; 2011.

BRONTE, V.; BRANDAU, S.; CHEN, S.H.; COLOMBO, M.P.; FREY, A.B.; GRETEN, T.F. *et al.* Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nat Commun.** v.7: p.1-10, 2016.

BUFFLER, P.A.; KWAN, M.L.; REYNOLDS, P.; URAYAMA, K.Y. Environmental and genetic risk factors for childhood leukemia: appraising the evidence. **Cancer Invest.** v.23(1), p.60-75, 2005.

BURKE, M.J.; BHATLA, T. Epigenetic Modifications in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Front Pediatr.** v.2(42), p. 1-7, 2014.

CHAUFFAILE, M.L.L.F.; COUTINHO, V.; YAMAMOTO, M.; KERBAUY, J. Combined method for simultaneous morphology, immunophenotype and karyotype (MAC) in leukemias. **São Paulo Med. J.** v. 115(1), p. 1336-1342, 1997.

CHEN, F.; ZHUANG, X.; LIN, L.; YU, P.; WANG, Y.; SHI, Y.; HU, G.; SUN, Y. New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. **BMC Med.** v.5, p.13-45, 2015.

CHEN, J.; YE, Y.; LIU, P.; YU, W.; WEI, F.; LI, H.; YU, J. Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer. **Hum Immunol.** v.78(2), p.113-119, 2017.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis.** v.6(1), e2014073, 2014.

CHIARINI, F.; LONETTI, A.; EVANGELISTI, C.; BUONTEMPO, F.; ORSINI, E.; EVANGELISTI, C.; CAPPELLINI, A.; *et al.* Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. **Biochim Biophys Acta.** v.1863(3), p.449-463, 2016.

CHIU, D.K.; XU, I.M.; LAI, R.K.; TSE, A. P.; WEI, L.L.; KOH, H.Y. et al. Hypoxia induces myeloid-derived suppressor cell recruitment to hepatocellular carcinoma through chemokine (C-C motif) ligand 26. **Hepatology**. v.64(3), p.797-813, 2016.

CIOFANI, M; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J.C. The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. **Annu Rev Cell Dev Biol**. v.23, p.463-93, 2007.

CONDAMINE, T.; GABRILOVICH, D. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. **Trends Immunol**. v.32(1), p.19-25, 2011.

CONDAMINE, T.; RAMACHANDRAN, I.; YOUN, J.; GABRILOVICH, D. Regulation of Tumor Metastasis by Myeloid-derived Suppressor Cells. **Annu Rev Med**. v.66. p.97–110, 2015.

COOPER, S.L.; BROWN, P.A. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Clin North Am**. v.62(1), p.61–73, 2015.

DE SANCTIS, F.; SOLITO, S.; UGEL, S.; MOLON, B.; BRONTE, V.; MARIGO, I. MDSCs in cancer: Conceiving new prognostic and therapeutic targets. **Biochim Biophys Acta**. v. 1865(1), p.35-48, 2016.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. Second of two parts. **N Engl J Med**. v.343, p.108-117, 2000.

DIAZ-MONTERO, C.M; SALEM, MB.; NISHIMURA, M.I.; GARRETT-MAYER, E.; COLE, D.J.; MONTERO, A.J. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. **Cancer Immunol Immunother**. v.58(1), p.49–59, 2009.

DING, ZC.; LU, X.; YU, M.; LEMOS, H.; HUANG, L.; CHANDLER, P. et al. Immunosuppressive myeloid cells induced by chemotherapy attenuate antitumor CD4+ T cell responses through the PD-1/PD-L1 axis. **Cancer Res**. v.74(13), p.3441–3453, 2014.

DING, ZC.; MUNN, D. H.; ZHOU, G. Chemotherapy-induced myeloid suppressor cells and antitumor immunity: The Janus face of chemotherapy in immunomodulation. **Oncoimmunology**. v.3(8), e954471, 2014.

DOULATOY, S.; NOTTA, F.; LAURENTI, E.; DICK, J.E. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell Stem Cell**. v.10(2), p120-36, 2012.

DUAN, C.W.; SHI, J.; CHEN, J.; WANG, B.; YU, Y.H.; QIN, X. et al. Leukemia propagating cells rebuild an evolving niche in response to therapy. **Cancer Cell**. v.25(6) p.778–793, 2014.

DUNN, G.P.; BRUCE, A.T.; IIKEDA, H.; OLD, L.J.; SCHREIBER, R.D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**. v. 3(11), p. 991-998, 2002.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2017.

FLEMING, V.; HU, X.; WEBER, R.; NAGIBIN, V.; GROTH, C.; ALTEVOGT, P.; UTIKAL, J.; UMANSKY, V. Targeting Myeloid-Derived Suppressor Cells to Bypass Tumor-Induced Immunosuppression. **Front Immunol.** v.2; p.9:398, 2018.

FOUAD, Y.A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **Am J Cancer Res.** v. 7(5), p. 1016–1036, 2017.

GABRILOVICH, D.I.; BRONTE, V.; CHEN, SH.; COLOMBO, M.P.; OCHOA, A.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; SCHREIBER, H. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. **Cancer Res.** v. 67(1), p.425–426, 2007.

GAO, D.; JOSHI, N.; CHOI, H.; RYU, S.; HAHN, M.; CATENA, R. et al. Myeloid progenitor cells in the premetastatic lung promote metastases by inducing mesenchymal to epithelial transition. **Cancer Res.** v.72(6), p.1384-94, 2012.

GARCIA-MANERO, G.; YANG, Y.; KUANG, SO.; O'BRIEN, S.; THOMAS, D.; KANTARIJIAN, H. Epigenetics of acute lymphocytic leukemia. **Semin Hematol.** v.46(1), p. 24-32, 2009.

GEIS-ASTEGGIANTE, L.; BELEW, A.T.; CLEMENTS, V.K.; EDWARDS, N.J.; OSTRAND-ROSENBERG, S.; EL-SAYED, N.M.; FENSELAU, C. Differential Content of Proteins, mRNAs, and miRNAs Suggests that MDSC and Their Exosomes May Mediate Distinct Immune Suppressive Functions. **J Proteome Res.** v.17(1), p.486-498, 2017.

GUSTAFSON, M. P.; ABRAHAM, R. S.; LIN, Y.; WU, W.; GASTINEAU, D. A.; ZENT, C. S.; DIETZ, A. Association of an increased frequency of CD14⁺HLA-DR^{lo/neg} monocytes with decreased time to progression in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). **Br J Haematol.** v.156(5), p. 674–676, 2012.

HANAHAH, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** v.144(5), p.646-74, 2011.

HOSSAIN, M.J.; XIE, L.; McCAHAN, S.M. Characterization of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Survival Patterns by Age at Diagnosis. **J Cancer Epidemiol.** 865979, 2014.

HUNGER, S.P.; MULLIGHAN, C.G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **N Engl J Med.** v.373, p.1541-1552, 2015.

IBÁÑEZ-VEA, M.; ZUAZO, M.; GATO, M.; ARASANZ, H.; FERNÁNDEZ-HINOJAL, G.; ESCORS, D.; KOCHAN, G. Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment: Current Knowledge and Future Perspectives. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** v.66(2), p.113-123, 2018.

ISCN. In: McGOWAN-JORDAN, J.; SIMONS, A.; SCHMID, M. (EdS.). **An international system for human cytogenomic nomenclature**. Basel; New Yorker: Karger, 2016.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; ZON, L.I. Hematopoiesis. **Development**. v. 140(12), p. 2463–2467, 2013.

KATO, M.; MANABE, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Int**. v.60(1), p.4-12, 2018.

KATO, H.; WATANABE, M. Myeloid-Derived Suppressor Cells and Therapeutic Strategies in Cancer. **Mediators Inflamm**. 159269, 2015.

KIM, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. **J Blood Med**. v.1, p. 13–19, 2010.

KRAUSER, D.S. Regulation of hematopoietic stem cell fate. **Oncogene**. v.21, p.3262-69, 2002.

KUJAWSKI, M.; KORTYLEWSKI, M.; LEE, H.; HERRMANN, A.; KAY, H.; YU, H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. **J Clin Invest**. v.118(10), p. 3367-77, 2008.

KUMAR, V.; PATEL, S.; TCYGANOV, E.; GABRILOVICH, D.I. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. **Trends Immunol**. v. 37(3), p. 208-20, 2016.

LARSON, R. A. Acute lymphoblastic leukemia: older patients and newer drugs. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. p. 131-136, 2005.

LIU, Y.F.; CHEN, Y.Y.; WANG, J.Y.; YANG, J.P.; ZHONG, S.L. et al. Expansion and activation of granulocytic, myeloid-derived suppressor cells in childhood precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. **J Leukoc Biol**. v.102(2), p.449-458, 2017.

MARVEL, D.; GABRILOVICH, D.I. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. **J Clin Invest**. v.125(9), p.3356–3364, 2015.

McGREGOR, S.; McNEER, J.; GURBUXANI, S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. **Semin Diagn Pathol**. v. 29(1), p. 2–11, 2012.

MEEKER, N. D.; YANG, J.J.; SCHIFFMAN, J. D. Pharmacogenomics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Expert Opin Pharmacother**. v. 11(10), p. 1621-1632, 2010.

MILLRUD, C.R.; BERGENFELZ, C.; LEANDERSSON, K. On the origin of myeloid-derived suppressor cells. **Oncotarget**. v. 8, p. 3649-3665, 2017.

MIRZAEI, H.R.; RODRIGUEZ, A.; SHEPPHARD, J.; BROWN, C.E.; BADIE, B. Chimeric Antigen Receptors T Cell Therapy in Solid Tumor: Challenges and Clinical Applications. **Front Immunol**. v.8, p.1850, 2017.

MONU, N.R.; FREY, A.B. Myeloid-derived suppressor cells and anti-tumor T cells: a complex relationship. **Immunol Invest.** v.41(6), p.595-613, 2012.

MOUGIAKAKOS, D.; JITSCHIN, R.; von BAHR, L.; POSCHKE, I.; GARY, R.; SUNDBERG, B.; et al. Immunosuppressive CD14+HLA-DRlow/neg IDO+ myeloid cells in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Leukemia.** v.27(2), p. 377-88, 2013.

MUDRY, R.E.; FORTNEY, J.E.; YORK, T.; HALL, B.M.; GIBSON, L.F. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. **Blood.** v.96(5), p.1926–1932, 2000.

MUENST, S.; LÄUBLI, H.; SOYSAL, S.D.; ZIPPELIUS, A.; TZANKOV, A.; HOELLEER.; S. The immune system and cancer evasion strategies: therapeutic concepts. **J Intern Med.** v. 279(6), p.541-62, 2016.

MULLIGHAN, C. G. DOWNING, JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature.** v. 446, p. 758–764, 2007.

MULLIGHAN, C. G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Invest.** v.122(10): p.3407–3415, 2012.

NAVARRETE-MENEZES, M.D.P.; PÉREZ-VERA, P. Epigenetic alterations in acute lymphoblastic leukemia. **Bol Med Hosp Infant Mex.** v.74(4), p.243-264, 2017.

NORDLUND, J.; SYVÄNEN, AC. Epigenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Semin Cancer Biol.** v.51, p.129-138, 2018.

PUI, C. H. Recent advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. **J Formos Med Assoc.** v. 103(2), p. 85-95. 2010.

PUI, C. H.; JEHA, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. **Nat Rev Drug Discov.** v. 6(2), p. 149-165, 2007.

PUI, C. H.; ROBISON, L. L.; LOOK, A. T. Acute lymphoblastic leukemia. **Lancet.** v. 371, p. 1030-1043, 2008.

PUI, C.H.; MULLIGHAN, C.; EVANS, W.; RELLING, M. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? **Blood Journal of Hematology.** v. 120(6), p.1165-74, 2012.

PURIZACA, J.; MEZA, I.; PELAYO, R. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Arch Med Res.** v.43(2), p. 89–101, 2012.

PYZER, A.R.; COLE, L.; ROSENBLASTT, J.; AVIGAN, D.E. Myeloid-derived suppressor cells as effectors of immune suppression in cancer. **Int J Cancer.** v. 139(9), p.1915-26, 2016.

QIAN, B.Z.; LI, J.; ZHANG, H.; KITAMURA, T.; ZHANG, J.; CAMPION, L.R. et al. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**. v.475(7355), p.222-225, 2011.

QU, P.; WANG, L.; LIN, P.C. Expansion and functions of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. **Cancer Lett**. v.380(1), p.253-6, 2016.

QU, X.; ZHUANG, G.; YU, L.; MENG, G.; FERRARA, N. Induction of Bv8 expression by granulocyte colony-stimulating factor in CD11b+Gr1+ cells: key role of Stat3 signaling. **J Biol Chem**. v.287(23), p.19574-84, 2012.

RAYCHAUDHURI, B.; RAYMAN, P.; HUANG, P.; GRABOWSKI, M.; HAMBARDZUYAN, D.; FINKE, JH.; VOGELBAUM, MA. Myeloid derived suppressor cell infiltration of murine and human gliomas is associated with reduction of tumor infiltrating lymphocytes. **J. Neurooncol**. v.122, p. 293–301, 2015.

SADE-FELDMAN, M.; KANTERMAN, J.; KLIEGER, Y.; ISH-SHALOM, E.; OLGA, M.; SARAGOVI, A.; et al. Clinical Significance of Circulating CD33+CD11b+HLA-DR-Myeloid Cells in Patients with Stage IV Melanoma Treated with Ipilimumab. **Clin Cancer Res**. v.22(23), p.5661-5672, 2016.

SALEM, M. L.; EL-SHANSHORY, M. R.; ABDOU, S. H.; ATTIA, M. S.; SOBHY, S. M.; ZIDAN, M. F.; ZIDAN, A. A. Chemotherapy alters the increased numbers of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. **Immunopharmacol Immunotoxicol**. v. 40(2), p.158-167, 2018

SHAFAT, M.S.; GNANESWARAN, B.; BOWLES, K.M.; RUSHWORTH, S.A. The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. **Blood Rev**. v.31(5), p.277-286, 2017.

SISON, E.A.; BROWN, P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. **Expert Rev Hematol**. v.4(3), p.271–283, 2011.

SU, Z.; NI, P.; ZHOU, C.; WANG, J. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancers and Inflammatory Diseases: Angel or Demon? **Scand J Immunol**. v.84(5), p.255-261, 2016.

SUVÀ, M.L.; RIGGI, N.; BERNSTEIN, B.E. Epigenetic reprogramming in cancer. **Science**. v.339(6127), p.1567-70, 2013.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S.A.; STEIN, H.; THIELI, J., (Eds): WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th edition). IARC: Lyon 2017.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer J**. v.7(6), p.e577, 2017.

TESFAI, Y.; FORD, J.; CARTER, K.W.; FIRTH, M.J.; O'LEARY, R.A.; GOTTARDO, N.G.; et al. Interactions between acute lymphoblastic leukemia and bone marrow stromal cells influence response to therapy. **Leuk Res**. v.36(3), p.299–306, 2012.

THEUNISSEN, P.; MEJSTRIKOVA, E.; SEDEK, L.; van der SLUIJS-GELLING, A.J.; GAIPA, G.; BARTELS, M.; et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**. v.129(3), p.347–57, 2017.

TOH, B.; WANG, X.; KEEBLE, J.; SIM, W.J.; KHOO, K.; WONG W.C. et al. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. **PLoS Biol**. v.9(9), e1001162, 2011.

TUETTENBERG, A.; STEINBRINK, K.; SCHUPPAN, D. Myeloid cells as orchestrators of the tumor microenvironment: novel targets for nanoparticulate cancer therapy. **Nanomedicine (Lond.)**. v. 11(20), p. 2735–275, 2016.

UMANSKY, V.; BLATTNER, C.; GEBHARDT, C.; UTIKALL, J. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. **Vaccines (Basel)**. v.4(4), p.36, 2016.

VEGLIA, F.; PEREGO, M.; GABRILOVICH, D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. **Nat Immunol**. v.19(2), p.108-119, 2018.

VEIRMAN, K. D.; VALCKENBORGH, E. V.; LAHMAR, Q.; GEERAERTS, X.; BRUYNE, E. D.; MENU, E.; RIET, I. V.; VANDERKERKEN, K.; GILDERACHTER, J. A. V. Myeloid-derived suppressor cells as therapeutic target in hematological malignancies. **Front Oncol**. v. 4(349), p.1-11, 2014.

VINAY, D.S.; RYAN, E.P.; PAWELE, G.; TALIB, W.H.; STAGG, J.; ELKORD, E.; et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Semin Cancer Biol**. v.35, p.185-198, 2015.

WANG, M.; ZHAO, J.; LISHEN, Z.; WEI, F.; LIAN, Y.; WU, Y.; et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **J Cancer**. v.8(5), p.761–773, 2017.

WANG, Y.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; LI, H.; KONG, L.; YANG, X. et al. The status and development of tumor microenvironment simulation platforms. **Int J Clin Exp Pathol**. v. 10(2), p.842-852, 2017.

WANG, Y.; ZHANG, X.; YANG, L.; XUE, J.; HU, G. Blockade of CCL2 enhances immunotherapeutic effect of anti-PD1 in lung cancer. **J Bone Oncol**. v.11, p.27–32, 2018.

WESOLOWSKI, R.; MARKOWITZ, J.; CARSON, W.E. Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. **J Immunother Cancer**. 2013; v.1(1): p. 10, 2013.

WIEMELS, J. Perspectives on the Causes of Childhood Leukemia. **Chem Biol Interact**. v. 196(3), p.59-67, 2012.

YANG, L.; HUANG, J.; REN, X.; GORSKA, A.E., CHYTIL, A.; AAKRE, M.; et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. **Cancer Cell**. v.13(1), p.23-35, 2008.

YOUNG, M. R.; NEWBY, M.; WEPSIC, H. T. Hematopoiesis and Suppressor Bone Marrow Cells in Mice Bearing Large Metastatic Lewis Lung Carcinoma Tumors. **Cancer Res.** v. 47, p.100-105, 1987.

ZHOU, Y.; GUO, F. A selective sphingosine-1-phosphate receptor 1 agonist SEW-2871 aggravates gastric cancer by recruiting myeloid-derived suppressor cells. **J Biochem.** v. 163(1), p.77-83, 2018.

ZHOU, Y.; YOU, M. J.; YOUNG, K. H.; LIN, P.; LU, G.; MEDEIROS, L. J.; BUESO-RAMOS, C. E. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. **Human Pathology.** v. 43, p. 1347-1362, 2012.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Convidamos o (a) seu/sua filho (a) (ou menor de idade que está sob sua responsabilidade) para participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada: **“Avaliação da expressão de células supressoras derivadas mielóides em pacientes portadores de leucemia linfóide aguda”**. Esse estudo visa uma melhor compreensão do desenvolvimento dessa doença nas crianças, ajudando no acompanhamento desses pacientes e em escolhas de tratamentos mais eficazes.

Esta pesquisa é orientada pela Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, que reside na Rua Pereira Valente, 640, Apto 701, bairro Meireles, Fortaleza, CE; telefone: (085) 33668264. Também participará o seguinte pesquisador: Diego Silva Lima, telefone (085) 9875454375.

Para que a criança possa participar da pesquisa necessitamos que o (a) senhor (a) autorize a obtenção e uso das amostras coletadas nos exames periódicos que o (a) seu/sua filho (a) já irá fazer no hospital, pela própria rotina do diagnóstico e acompanhamento clínico, não sendo necessária nenhuma coleta extra de material, portanto, não trará nenhum ônus ou inconveniência. As amostras serão utilizadas para a realização de exames que visam buscar alterações na medula óssea. A coleta será realizada no Hospital Infantil Albert Sabin do Estado do Ceará, localizado na Rua Tertuliano Sales, 544, Vila União.

A participação na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto a riscos, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de assistência médica. Sua identidade e de seu/sua filho (a) serão mantidas em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar com todos os termos acima expostos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

Assinatura de quem obteve o termo

ANEXO B - PARECER COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL INFANTIL ALBERT
SABIN - CE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS GENOTÓXICOS INDUZIDOS PELA POLIQUIMIOTERAPIA UTILIZADA NO TRATAMENTO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LLA-B E SUA IMPORTÂNCIA COMO PREDITORES

Pesquisador: Diego Silva Lima

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 15182213.4.0000.5042

Instituição Proponente: Hospital Infantil Albert Sabin - CE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 271.124

Data da Relatoria: 08/05/2013

Apresentação do Projeto:

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLA-B) é uma doença maligna que se desenvolve como resultado de mutações em células progenitoras comprometidas com a diferenciação de células linfóides B, e caracteriza-se pela proliferação clonal e pelo acúmulo de linfócitos imaturos na medula óssea, resultando em supressão da hematopoese normal e substituição dos elementos normais, podendo acometer outros órgãos como o fígado, baço, linfonodos, timo, gônadas e as meninges.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os efeitos genotóxicos ocasionados pela poliquimioterapia utilizada no tratamento de pacientes pediátricos com LLA-B e sua importância como preditores prognósticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

No presente estudo não se prevê riscos uma vez que o material a ser analisado já se encontra coletado em amostras rotineiramente utilizadas para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico, a saber: amostras de sangue periférico e medula óssea.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante para o hospital, uma vez que os novos exames contribuirão para o

Endereço: Rua Tertuliano Sales, 544
Bairro: Vila União **CEP:** 60.410-790
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (853)101-4212 **Fax:** (853)101-4212 **E-mail:** cep@hias.ce.gov.br

APÊNDICE A - PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA RESULTANTE DO TRABALHO DE TESE

Medical Oncology (2018) 35:36
<https://doi.org/10.1007/s12032-018-1092-9>

SHORT COMMUNICATION



Immunosuppressive monocytes (CD14⁺/HLA-DR^{low/-}) increase in childhood precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia after induction chemotherapy

D. S. Lima^{1,2} · R. P. G. Lemes² · D. M. Matos³

Received: 18 January 2018 / Accepted: 31 January 2018 / Published online: 10 February 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

In tumor microenvironment, immunosuppression is a common event and results from the inhibition of activated immune cells and generation of cells with immunosuppressive capacity, as some subtypes of monocytes. The aim of this study was to evaluate the presence of immunosuppressive CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes in pediatric patients with the diagnosis of B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) and, moreover, verify whether the chemotherapeutic treatment has any effect on these cells. Peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were collected from 15 untreated pediatric patients. The presence of CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes was evaluated at diagnosis and in the end of induction chemotherapy by flow cytometry. CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes increase was observed in 60% (9/15) of the patients at the end of the induction therapy. We were able to detect an increase in CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes values in BM and PB samples of pediatric patients with B-ALL. This increase was observed in the end of induction chemotherapy, which leads us to believe that these changes probably could have been induced by the inflammatory process engendered by the cytotoxic treatment or by drugs used in the chemotherapy treatment. This finding may be useful to guide new therapeutic approaches contemplating immunomodulatory drugs that act in the depletion of immunosuppressive monocytes.

Keywords Acute lymphoblastic leukemia · Immunosuppressive monocytes · Flow cytometry

Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is an abnormal proliferation and accumulation of clonal progenitor cells compromised with the differentiation of lymphoid cells in the bone marrow [1]. The immunosuppressive state observed in tumor microenvironment plays an important role in cancer initiation, progression and therapeutic failure [2]. CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes mediate immunosuppression through a range of mechanisms as, for example, release of interleukin-10 [3] and induction of T-cell regulatory populations [4].

The presence of immunosuppressive CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes was previously described in malignant solid tumors as melanoma and prostate cancer [3, 5], and also in hematologic cancers as multiple myeloma [5], non-Hodgkin lymphoma [6] and chronic lymphocytic leukemia [7].

Here, we evaluated the presence of CD14⁺/HLA-DR^{low/-} monocytes in pediatric patients with the diagnosis of precursor B-ALL and, besides, we sought for any effect of chemotherapeutic treatment with regard to this population of monocytes.

Patients and methods

Patients

From August 2015 to May 2017, peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were collected from 33 untreated pediatric patients who fulfill the World Health Organization diagnostic criteria for de novo precursor

✉ D. M. Matos
 dmazza@alumni.usp.br

¹ Oncohematology Section, Albert Sabin Children Hospital, Ceará, Brazil

² Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Ceará, UFC, Ceará, Brazil

³ Flow Cytometry Section, Clementino Fraga Laboratory, Ceará, Brazil