



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA  
PROGRAMA DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

**ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA**

EXPRESSÃO DAS CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DA LINHAGEM  
MIELÓIDE (MDSC'S) E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  E  
VEGF EM PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSICAS

**FORTALEZA  
2021**

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)

---

M871e Mota, Anacélia Gomes de Matos.

Expressão das células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC'S) : e sua relação com os níveis de IL-10, IL-13, IFN-gamma e VEGF em pacientes adultos portadores de Síndromes Mielodisplásicas. / Anacélia Gomes de Matos Mota. – 2021.

136 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2021.

Orientação: Prof. Dr. Sílvia Maria Meira Magalhães.

1. Síndromes Mielodisplásicas. 2. Hematologia. 3. Imunologia. I. Título.

CDD 610

---

**ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA**

**EXPRESSÃO DAS CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DA LINHAGEM  
MIELÓIDE (MDSC'S) E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  E  
VEGF EM PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

**FORTALEZA**

**2021**

ANACÉLIA GOMES DE MATOS MOTA

**EXPRESSÃO DAS CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS DA LINHAGEM  
MIELÓIDE (MDSC'S) E SUA RELAÇÃO COM OS NÍVEIS DE IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  E  
VEGF EM PACIENTES ADULTOS PORTADORES DE SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSICAS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado Acadêmico em Ciências Médicas, do Departamento de Medicina Clínica, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Médicas.

Orientador: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Juliana Cordeiro de Souza  
Gestora Técnica e Científica do Lab. Argos Patologia

---

Prof. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Júnior  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dra. Lidiany de Souza Araújo Linhares  
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

*A gratidão é o gesto mais nobre do ser humano.*

*À Deus,  
À minha mãe e irmãos,  
Ao meu filho,  
Ao meu pai (in memoriam).  
Sem eles nada disso seria possível.*

## AGRADECIMENTOS

- À Deus por sempre iluminar meu caminho e nunca me deixar desistir diante das derrotas, pois acredito que tudo tem seu momento para acontecer.
- À minha mãe Ofélia, que sempre foi exemplo de mãe, mulher e profissional, a minha maior incentivadora dos meus estudos. Sempre me ensinou a ser forte e nunca desistir dos meus ideais.
- Aos meus irmãos, Narcélio, Carlos Alberto e Nárlia, que sempre me apoiam e estão ao meu lado em todos momentos importantes e decisivos em minha vida.
- Ao meu filho Gabriel, por ser meu estímulo para que eu sempre possa dar o meu melhor.
- Ao meu namorado Joel, por suas demonstrações de companheirismo, paciência e compreensão. Obrigada por poder compartilhar com você esse momento tão delicado de minha vida.
- À Dra Silvia Magalhães, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, realização profissional e pela confiança em mim depositada. Sou grata pelos seus ensinamentos e pelas horas gastas junto à mim durante o desenvolvimento desse trabalho. Terás sempre o meu respeito e admiração por ser um exemplo de profissional, mulher e acima de tudo, HUMANA.
- Ao Dr Michael e todos que compõem o laboratório de Patologia e Biologia Molecular da *Queen's University* pela oportunidade de realizar o doutorado sanduiche e pelo enorme crescimento profissional adquirido com essa experiência.
- Ao Dr. Ronald Feitosa, por toda sua dedicação e palavras de incentivo aos seus alunos. Sua participação foi fundamental durante todo esse percurso. Obrigada pelas suas contribuições técnicas, laboratoriais, e de estatística.
- A cada um que compõe o Laboratório de Citogenômica do Câncer, em especial: à amiga Mayara, pela sua amizade, dedicação, preocupação e disponibilidade sempre em ajudar;
- Ao amigo Howard, pela sua amizade e por seus conhecimentos e contribuições que tanto fizeram importante para o enriquecimento do meu trabalho;
- A todos do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, em especial a Ivone e a Rita, por sempre acolher e atender com muita educação, paciência e dedicação aos alunos.

- Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Infantil Albert Sabin, em especial à Dra. Vânia Feijó, pela compreensão e paciência em minha ausência, e suas palavras de apoio e incentivo.
- Aos colegas de trabalho, Paulo Afonso, Fernanda, Juliana, Anquises e Mônica, o meu muito obrigada pelas palavras de apoio e força.
- Aos colegas de pesquisa, Raysa, Priscila, Luciana, Mirele, Patrícia e Emanuel, meu muito obrigada pela amizade, companheirismo e ajuda nesse momento tão importante para mim.
- Aos amigos Jânio, Carlos José, Cleber Cunha e Daniel Pordeus que sempre me apoiaram nesse árduo trabalho de conclusão do doutorado com palavras de incentivo e apoio.
- Aos colegas brasileiros e canadenses que me acolheram no período do doutorado sanduiche, Rodrigo Alves, Cindy, Jacqueline e Travis, meu muito obrigada pela torcida, orações e apoio em todos momentos.
- “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

## RESUMO

Um processo inflamatório tem como objetivo recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação da imunidade inata e adquirida. À medida que o processo de inflamação prossegue, várias células são estimuladas e recrutadas resultando em uma resposta imunológica com a participação de mediadores da inflamação. Outro importante grupo de células participantes do processo inflamatório é formado pelas células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC's). O conhecimento sobre o papel das MDSC's nas doenças hematológicas é ainda pouco conhecido. A patogênese da síndrome mielodisplásica (SMD) é complexa e multifatorial e depende da interação entre células hematopoéticas e seu microambiente. **Objetivo:** Avaliar a expressão das células (MDSC's), correlacioná-las com os níveis séricos de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF e com as variáveis clínicas em pacientes adultos portadores de SMD. **Metodologia:** Foram incluídos 93 pacientes com SMD de novo (2 SMD com del 5q; 2 SMD inclassificável, 11 SMD-DU, 18 SMD-SA; 23 SMD-EB e 37 SMD-DM) de acordo com classificação da OMS. 50 voluntários sadios foram incluídos como grupo controle. As análises das interleucinas foram quantificadas por ELISA. A fenotipagem das células MDSC's foi realizada pela marcação com os anticorpos monoclonais e avaliada por citômetro de fluxo-FACSVerse. **Resultados:** Observou-se um predomínio de 55,9% do sexo feminino entre os pacientes. A média de idade nesse grupo foi de 72,4 anos. Pacientes com SMD mostraram níveis séricos de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF significativamente mais elevados do que o grupo controle. ( $p < 0.001$ ) Não foi observada uma expressão significativa das células MDSC's quando comparados os pacientes ao grupo controle ( $p = 0.0388$ ). A expressão das células MDSC's foi significativamente maior nos pacientes com SMD do sexo masculino ( $p = 0.041$ ). Quanto ao IPSS-R, houve uma associação significativa entre a expressão das MDSC's em pacientes de alto e muito alto risco quando comparados com aqueles categorizados como muito baixo, baixo e risco intermediário conforme IPSS-R ( $p = 0.011$ ). Observou-se que a expressão das células PMN-MDSC's foi significativamente maior nos pacientes com SMD do que no grupo controle ( $p < 0.001$ ). Quanto à estratificação do risco, houve um aumento significativo da expressão das PMN-MDSC's em pacientes de muito baixo, baixo e risco intermediário do que em pacientes categorizados como alto e muito alto risco conforme IPSS-R. ( $p = 0.041$ ). A expressão das M-MDSC's foi significativamente maior nos pacientes com SMD quando comparada aos controles ( $p < 0.001$ ). Pela correlação de Spearman, observou-se: uma correlação positiva e significativa entre a IL-10 e a produção de IL-13 ( $r = 0,564$ ;  $p < 0.001$ ); uma correlação forte, positiva e significativa entre a IL-10 e a produção de IFN- $\gamma$  ( $r = 0,252$ ;  $p = 0,004$ ); uma correlação positiva entre IL-10 e o VEGF ( $r = 0,275$ ;  $p < 0.001$ ); uma correlação negativa significativa entre a IL-10 e o nível sérico de ferritina ( $r = -0,410$ ;  $p < 0.001$ ); uma correlação significativa entre as dosagens de IL-13 e INF- $\gamma$  ( $r = 0,239$ ;  $p = 0.007$ ); uma correlação positiva entre IFN-  $\gamma$  e o VEGF com  $r = 0,253$  e  $p = 0.004$ ; uma correlação positiva e significativa entre o VEGF e a produção de neutrófilos, com  $r = 0,233$  e  $p = 0.028$ . **Conclusão:** Os resultados desse estudo demonstram a importância da relação das MDSC's e a secreção de citocinas inflamatórias na patogênese da SMD. É provável que as células MDSC's atuem no processo inflamatório como parte da patogênese da SMD e possam constituir futuros alvos terapêuticos.

**Palavras-chave:** síndrome mielodisplásica, sistema imunológico, interleucinas, células supressoras derivadas da linhagem mielóide.

## Abstract

An inflammatory process aims to restore the homeostasis of the injured tissue through the activation of innate and acquired immunity. As the inflammation process proceeds, several cells are stimulated and recruited resulting in an immune response with the participation of inflammation mediators. Another important group of cells participating in the inflammatory process is formed by suppressor cells derived from the myeloid lineage (MDSC's). Knowledge about the role of MDSC's in hematological diseases is still poorly understood. The pathogenesis of myelodysplastic syndrome (MDS) is complex and multifactorial and depends on the interaction between hematopoietic cells and their microenvironment. **Objective:** To evaluate cell expression (MDSC's) and correlate them with serum levels of IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  and VEGF in adult MDS patients, correlate them with clinical variables. **Methods:** 93 patients with MDS *de novo* were included (2 MDS with del 5q; 2 Unclassifiable MDS, 11 MDS-DU, 18 MDS-AS; 23 MDS-EB and 37 MDS-DM) according to WHO classification and IPSS-R. 50 healthy volunteers were included as a control group. Interleukin analyzes were quantified by ELISA. The phenotyping of MDSC's cells was performed by labeling with monoclonal antibodies and evaluated by flow cytometer-FACSVerse. **Results:** There was a predominance of 55.9% females among the patients. The mean age in this group was 72.4 years. Patients with MDS showed significantly higher serum levels of IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  and VEGF than the control group. ( $p < 0.001$ ) There was no significant expression of MDSC's cells when compared to the control group ( $p = 0.0388$ ). The expression of MDSC's cells was significantly higher in male patients with MDS than in female patients ( $p = 0.041$ ). As for the IPSS-R, there was a significant association between the expression of MDSC's in high and very high risk patients when compared with those categorized as very low, low and intermediate risk according to IPSS-R ( $p = 0.011$ ). It was observed that the expression of PMN-MDSC's cells was significantly higher in patients with MDS than in the control group ( $p < 0.001$ ). As for risk stratification, there was a significant association of PMN-MDSC's expression between high and very high-risk patients than in patients categorized as very low, low and intermediate risk according to IPSS-R. ( $p = 0.041$ ). The expression of M-MDSC's was significantly higher in MDS patients compared to controls ( $p < 0.001$ ). By Spearman's correlation, it was observed: a moderate, positive and significant correlation between IL-10 and IL-13 production ( $r = 0.564$ ;  $p < 0.001$ ); a positive and significant correlation between IL-10 and IFN- $\gamma$  production ( $r = 0.252$ ;  $p = 0.04$ ); a positive correlation between IL-10 and VEGF ( $r = 0.275$ ;  $p < 0.001$ ); a significant negative correlation between IL-10 and serum ferritin level ( $r = -0.410$ ;  $p < 0.001$ ); a significant correlation between IL-13 and INF- $\gamma$  levels ( $r = 0.239$ ;  $p = 0.007$ ); a positive correlation between IFN- $\gamma$  and VEGF with  $r = 0.253$  and  $p = 0.004$ ; a positive and significant correlation between VEGF and neutrophils, with  $r = 0.233$  and  $p = 0.028$ . **Conclusion:** The results of this study demonstrate the importance of the relationship between MDSC's and the secretion of inflammatory cytokines in the pathogenesis of MDS. Through these results, it is likely that MDSC's cells act in the inflammatory process as part of the pathogenesis of MDS and may constitute future therapeutic targets.

**Keywords:** myelodysplastic syndrome, immune system, interleukins, myeloid derived suppressors cells.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Representação esquemática da patogênese da Síndrome Mielodisplásica.....	19
<b>Figura 2</b>	Patogênese da SMD de alto risco x baixo risco.....	20
<b>Figura 3</b>	Esquema ilustrando as transformações da hematopoese normal para desenvolvimento da LMA.....	23
<b>Figura 4</b>	Células que participam da resposta imune inata e adaptativa.....	32
<b>Figura 5</b>	Ilustração dos lados ' <i>yin</i> ' e ' <i>yang</i> ' da inflamação aguda.....	34
<b>Figura 6</b>	Associação da inflamação e o surgimento do câncer.....	35
<b>Figura 7</b>	Mecanismo de ativação da IL-10 através de seus receptores.....	39
<b>Figura 8</b>	Mecanismo de ativação da IL-13 através da ligação com seus receptores.....	42
<b>Figura 9</b>	Mecanismos de ação envolvidos no mecanismo de ação do IFN- $\gamma$ .....	46
<b>Figura 10</b>	Membros da família do VEGF e o papel das células tumorais na ativação dessas proteínas.....	48
<b>Figura 11</b>	Ilustração esquemática da geração das MDSC's.....	51
<b>Figura 12</b>	Representação esquemática do envolvimento dos fatores de crescimento e citocinas na produção e ativação das células MDSC's....	54
<b>Figura 13</b>	Ilustração esquemática do processamento de amostras.....	61
<b>Figura 14</b>	Ilustração esquemática da técnica de ELISA.....	63
<b>Figura 15</b>	Ilustração de dot-plot de análise individual de um paciente.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Anormalidades genéticas mais frequentes na SMD.....	25
<b>Tabela 2</b>	Classificação da SMD de acordo com a OMS 2016.....	27
<b>Tabela 3</b>	Estratificação prognóstica na SMD.....	28
<b>Tabela 4</b>	Principais células participantes da resposta imunológica do sistema inato e adquirido.....	30
<b>Tabela 5</b>	Painel de anticorpos monoclonais para MDSC's.....	64
<b>Tabela 6</b>	Caracterização descritiva dos pacientes com SMD.....	67
<b>Tabela 7</b>	Caracterização das variáveis laboratoriais em pacientes com SMD.....	68
<b>Tabela 8</b>	Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.....	69
<b>Tabela 9</b>	Estratificação dos pacientes com SMD quanto à classificação OMS.....	69
<b>Tabela 10</b>	Estratificação dos pacientes com SMD quanto ao grupo de risco pelo IPSS-R.....	70
<b>Tabela 11</b>	Caracterização das variáveis clínicas com as Interleucinas IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ e VEGF em pacientes com SMD e grupo controle.....	75
<b>Tabela 12</b>	Caracterização das variáveis clínicas com os marcadores das células MDSC's em pacientes com SMD e grupo controle.....	86
<b>Tabela 13</b>	Correlações entre dosagens de interleucinas versus variáveis clínicas.....	96
<b>Tabela 14</b>	Correlações entre a expressão das células MDSC's versus variáveis clínicas.....	99
<b>Tabela 15</b>	Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD – SA.....	100
<b>Tabela 16</b>	Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD - DU.....	101
<b>Tabela 17</b>	Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD – EB.....	102
<b>Tabela 18</b>	Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD – DM.....	103

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Análise de IL-10 em pacientes com SMD versus grupo controle.....	71
<b>Gráfico 2</b>	Análise de IL-13 em pacientes com SMD versus grupo controle....	72
<b>Gráfico 3</b>	Análise de IFN- $\gamma$ em pacientes com SMD versus grupo controle....	73
<b>Gráfico 4</b>	Análise de VEGF em pacientes com SMD versus grupo controle...	74
<b>Gráfico 5</b>	Expressão das MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle.....	79
<b>Gráfico 6</b>	Expressão das MDSC's em pacientes com SMD do sexo masculino versus pacientes do sexo feminino.....	80
<b>Gráfico 7</b>	Expressão das MDSC's em pacientes com SMD estratificados pelo grupo de risco conforme o IPSS-R.....	81
<b>Gráfico 8</b>	Expressão das PMN-MDSC's em pacientes com SMD versus controle.....	83
<b>Gráfico 9</b>	Expressão das PMN-MDSC's em pacientes com SMD estratificados pelo grupo de risco conforme o IPSS-R.....	84
<b>Gráfico 10</b>	Expressão das M-MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle.....	85
<b>Gráfico 11</b>	Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e IL-13.....	88
<b>Gráfico 12</b>	Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ .....	89
<b>Gráfico 13</b>	Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e VEGF.....	90
<b>Gráfico 14</b>	Correlação entre IL-10 e ferritina em pacientes com SMD.....	91
<b>Gráfico 15</b>	Correlação entre IL-13 e a concentração de IFN- $\gamma$ em pacientes com SMD.....	92
<b>Gráfico 16</b>	Correlação entre IL-13 e a produção de VEGF em pacientes com SMD.....	93
<b>Gráfico 17</b>	Correlação entre IFN- $\gamma$ e a produção de VEGF em pacientes com SMD.....	94
<b>Gráfico 18</b>	Correlação entre ativação de VEGF e a contagem de neutrófilos em pacientes com SMD.....	95
<b>Gráfico 19</b>	Correlação entre a expressão de M-MDSC's e a idade em pacientes com SMD.....	97

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AcMo	Anticorpos monoclonais
APCs	Células apresentadoras de antígeno
AREB-1	Anemia refratária com excesso de blastos -1
AREB-2	Anemia refratária com excesso de blastos -2
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
CHIP	Hematopoese clonal de potencial indeterminado
COVID-19	Coronavírus
CRDM	Citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens
CRDU	Citopenia refratária com displasia em uma linhagem
CSIF	Fator inibidor da síntese de citocina
CTLs	Células T citotóxicas CD8+
DCs	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT3A	DNA metiltransferase3
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HSC	Células tronco hematopoéticas
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
iMC's	Células mielóides progenitoras imaturas
IPSS-R	<i>International Prognostic Score System Revised</i>
ISGs	Genes estimulados por IFN
JAK	Proteínas da via Janus Kinase
LMA	Leucemia mielóide aguda
LPS	Lipopolissacarídeos
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MDSC's	Células supressores derivadas da linhagem mielóide
M-MDSC's	Células supressores mononucleares derivadas da linhagem mielóide
NF-kB	Fator de transcrição kB
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Oxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PMN-MDSC's	Células supressores polimorfonucleares derivadas da linhagem mielóide
RONS	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAV-HRP	<i>Streptavidin horseradish peroxidase conjugate</i>
SDRA	Síndrome dificuldade respiratória aguda
SMD	Síndrome mielodisplásica

---

---

SMD -I	SMD inclassificável
SMD-DM	SMD com displasia em múltiplas linhagens
SMD-DU	SMD com displasia em única linhagem
SMD-EB	SMD com excesso de blastos
SMD-N	Síndrome mielodisplásica não classificável
SMD-SA	SMD com sideroblastos em anel
STAT	Fator de transcrição de sinal e transdutores de ativação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TET2	<i>Tet metilcitosina dioxigenase 2</i>
TLR	Receptores <i>toll-like</i>
TME	Microambiente tumoral
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
Treg	Células T regulatórias
VAF	Fração alélica variante
VEGF	Fator crescimento endotelial vascular

---

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Síndrome Mielodisplásica.....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Patogênese da SMD.....	18
1.2.2 Diagnóstico.....	24
1.2.3 Classificação e fatores de prognóstico na SMD.....	26
<b>1.2 Inflamação e Câncer.....</b>	<b>29</b>
<b>1.3 Mediadores da inflamação.....</b>	<b>37</b>
1.3.1 Interleucina 10 - (IL-10).....	38
1.3.2 Interleucina – 13 (IL-13).....	41
1.3.3 IFN- $\gamma$ .....	43
1.3.4 VEGF.....	47
<b>1.4 Células supressoras derivadas mielóides (MDSC's).....</b>	<b>50</b>
1.4.1 SMD e as células MDSC's.....	56
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>58</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
3.1 Objetivo geral.....	59
3.2 Objetivos Específicos.....	59
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>60</b>
4.1 Casuística.....	60
4.2 Aspectos éticos.....	60
4.3 Critérios de inclusão.....	60
4.4 Coleta e processamento de amostras.....	61
4.4.1 Determinação de interleucinas por ELISA.....	62
4.4.2 Imunofenotipagem – Análise das MDSC's.....	64
4.5 Variáveis analisadas.....	65
4.6 Análise estatística.....	66
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>67</b>
5.1 Caracterização dos pacientes.....	67
5.2 Análise da IL-10.....	71
5.3 Análise da IL-13.....	72
5.4 Análise de IFN- $\gamma$ .....	73

5.5	Análise do VEGF.....	74
5.6	Análise de Citometria de Fluxo.....	79
5.6.1	Expressão de MDSC's.....	79
5.6.2	Expressão de PMN-MDSC's.....	83
5.6.3	Expressão de M-MDSC's.....	84
5.7	Correlação entre Interleucinas.....	88
5.7.1	Análise da correlação entre IL-10 e IL-13.....	88
5.7.2	Análise da correlação entre IL-10 e IFN- $\gamma$ .....	89
5.7.3	Análise da correlação entre IL-10 e VEGF.....	90
5.7.4	Análise da correlação entre IL-10 e Ferritina.....	91
5.7.5	Análise da correlação entre IL-13 e IFN- $\gamma$ .....	92
5.7.6	Análise da correlação entre IL-13 e VEGF.....	93
5.7.7	Análise da correlação entre IFN- $\gamma$ e VEGF.....	94
5.7.8	Análise da correlação entre VEGF e a contagem de neutrófilos...	95
5.8	Correlação entre as células MDSC's e variáveis clínicas.....	97
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>128</b>
	<b>Anexo I: Instrumento de coleta dos dados pacientes.....</b>	<b>129</b>
	<b>Anexo II: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFC.....</b>	<b>130</b>
	<b>Anexo III: Artigos publicados.....</b>	<b>133</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas clonais, caracterizado por distúrbios na proliferação e diferenciação da célula-tronco. Uma sequência de alterações genéticas adquiridas resulta na geração de um clone anômalo e geneticamente instável com potencial para evolução para leucemia mielóide aguda (GANGAT, 2016). A idade média dos indivíduos acometidos varia entre 65 e 80 anos sendo incomum em indivíduos com menos de 50 anos e sua incidência é crescente com a idade, variando de 4,1 a 12,6 novos casos/100.000 habitantes/ano, com aumento para cerca de 90 novos casos/100.000 habitantes/ano na população com idade superior a 80 anos (GERMING *et al.*, 2013; MALCOVATI *et al.*, 2013; ADÈS *et al.*, 2014). É, atualmente, considerada a doença onco-hematológica mais comum em idosos, superando as leucemias agudas e crônicas mielóides e linfóides.

Embora a doença afete ambos os sexos, assim como outras leucemias, a SMD é mais comum em homens, devido provavelmente à maior exposição a fatores ocupacionais, ambientais e ao estilo de vida (BELLI *et al.*, 2015). As diferentes propostas de classificação, a falta de registros de base populacional e a resistência em indicar procedimentos diagnósticos invasivos em idosos dificultam o conhecimento da incidência e pressupõe sub-diagnóstico e sub-notificação (BELLI *et al.*, 2015).

A incidência e características clínicas da SMD variam de acordo com a área geográfica, questões étnicas e genéticas, bem como seu estilo de vida (BELLI *et al.*, 2015). No Brasil, não existem estudos epidemiológicos que deem o dimensionamento do problema ou forneçam um suporte para um planejamento de ações. Magalhães e cols (2010) realizaram o primeiro levantamento de SMD no Brasil, um estudo retrospectivo em 12 centros de atenção terciária de referência, em que se avaliaram dados demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos. A idade mediana ao diagnóstico nos 476 casos avaliados foi 68,3 anos, inferior ao que se observa em estudos americanos ou europeus (MAGALHÃES, 2010). Dados de um único centro

do nordeste brasileiro foram publicados, e a idade mediana ao diagnóstico foi 67 anos (variação 15 a 88 anos), similar ao encontrado no estudo multicêntrico brasileiro, embora se acredite que variações regionais ocorram (MAGALHÃES, 2013).

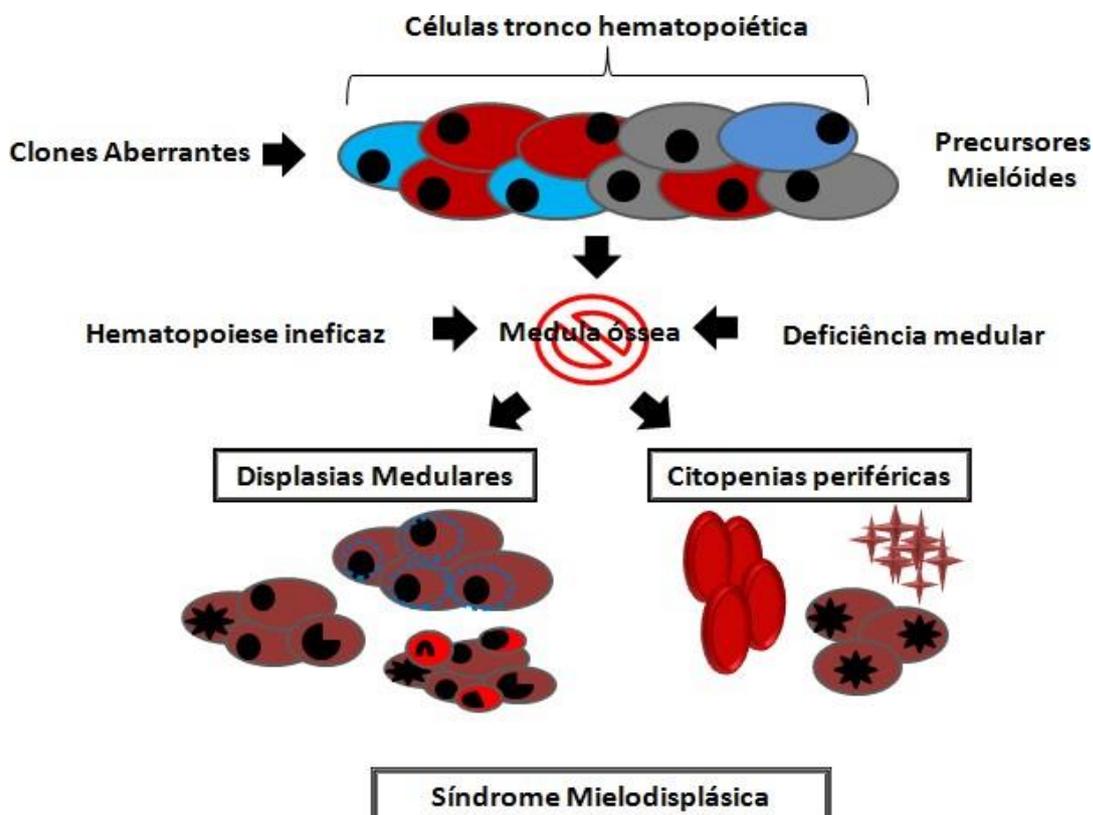
O estudo do perfil epidemiológico mais recente realizado em países da América Latina (Chile – Brasil – Argentina) foi conduzido por BELLI et al., em 2015. Nesse estudo, foram avaliados retrospectivamente um total de 1.080 pacientes, sendo 635 argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos. A mediana de idade foi 69 anos, com valores ainda inferiores para os pacientes chilenos e com leve predomínio do sexo feminino (BELLI, 2015).

As causas da SMD não são conhecidas (ADÈS et al., 2014). A idade é considerada o mais fator de risco isolado mais importante, seguida pelo sexo masculino e pela exposição prévia à quimio ou radioterapia (INVERNIZZI et al., 2015). Esse último grupo é considerado doença secundária ou SMD relacionada à terapia (SMD-t) e constitui de 10% a 15% de todos os casos.

### 1.1.1 Patogênese da SMD

As neoplasias são, geralmente, oriundas de uma predisposição genética constitucional seguida de mutações somáticas adquiridas ou de um acúmulo de mutações somáticas que levam ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico (YANG et al., 2016; LI 2017; HASSERJIAN et al, 2018).

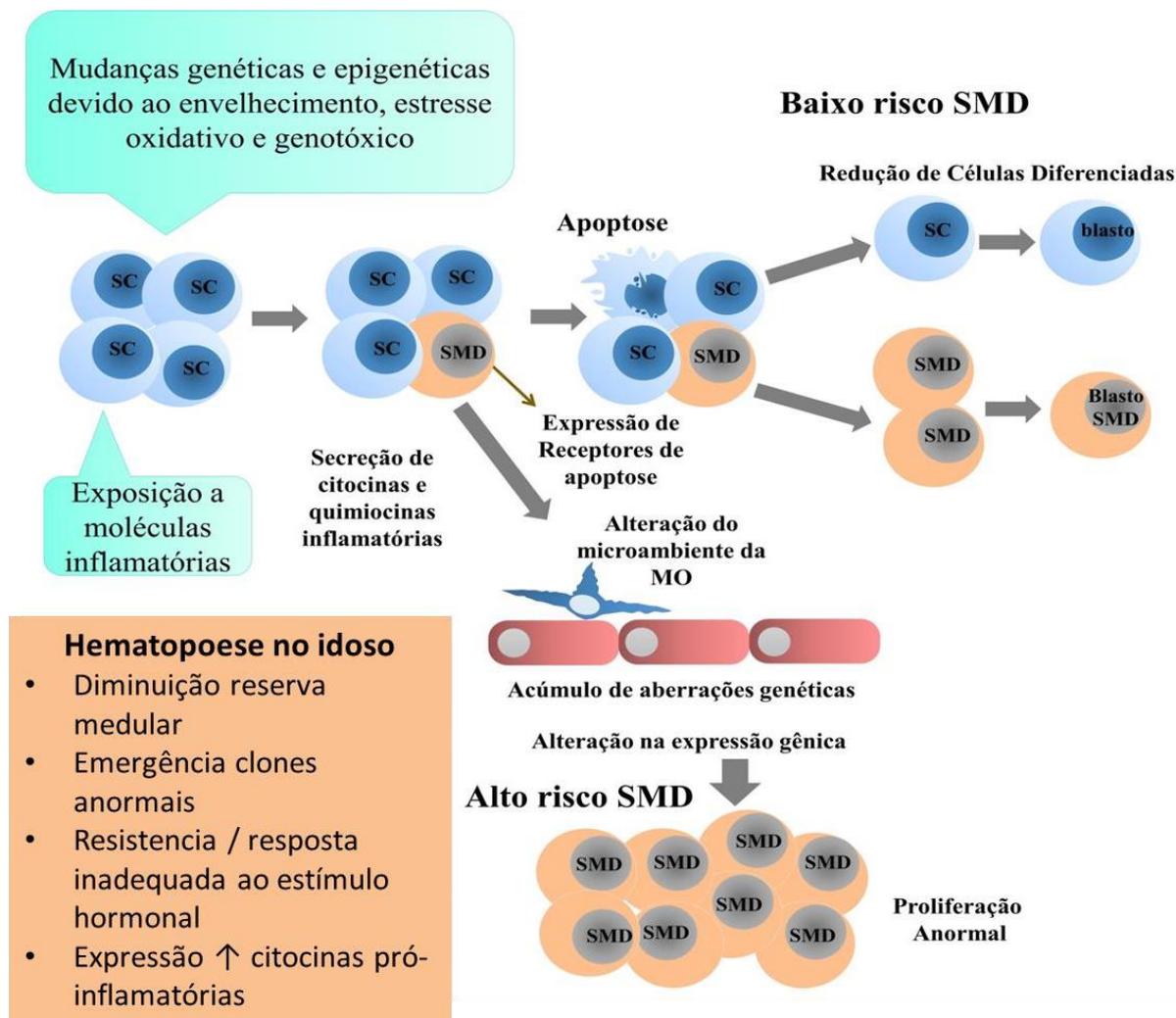
A patogênese da SMD é complexa e pode envolver mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados. Os passos iniciais da patogênese das SMD envolvem danos no DNA das células tronco hematopoéticas pluripotentes, com o desenvolvimento de um clone mielodisplásico que apresenta vantagem de proliferação e excesso de apoptose, resultando nas citopenias que caracterizam a apresentação da doença, conforme **figura 1** (STARCZYNOWSKI et al., 2010; HASSERJIAN et al, 2018; VEIGA et al., 2021).



**Figura 1:** Representação esquemática da patogênese da Síndrome Mielodisplásica. Adaptado de Hellstrom-Lindberg (2008) e Economopoulou (2008).

Nos últimos anos várias mutações recorrentes foram identificadas em mais de 50 genes em 80-90% dos casos de SMD, sendo a maioria relacionadas com genes responsáveis pela regulação epigenéticas, *splicing*, fatores de transcrição entre outros, conforme ilustrado na **figura 2** (GLENTHØJ *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2019).

O desenvolvimento da doença depende muito da interação entre as células hematopoiéticas aberrantes e o seu microambiente. Além disso, as anormalidades na função imunológica apesar de não serem completamente esclarecidas, têm sido implicadas com a apoptose e as citopenias observadas na SMD (HASSERJIAN *et al.*, 2018; SYED *et al.*, 2020).



**Figura 2:** Patogênese da SMD de alto risco x baixo risco. Adaptado de GÓMEZ et al. 2015.

Uma característica fundamental presente nos pacientes de SMD de baixo risco é o aumento da apoptose de precursores hematopoéticos (STARCZYNOWSKI, KARSAN 2010; GÓMEZ *et al.*, 2015; WOLACH *et al.*, 2016). Na SMD inicial ocorre uma excessiva apoptose intramedular devido a uma maior liberação de citocinas pró-inflamatórias através da ativação das células T citotóxicas (SHI *et al.*, 2019). À medida que a taxa de apoptose diminui ocorre progressão da doença e evolução para leucemia aguda (HE 2016; LI 2017). Pacientes com altas taxas de apoptose apresentam maior sobrevida do que pacientes com baixas taxas, em média de 66 meses x 30 meses o que está de acordo com o conceito de que a progressão da doença está relacionada diretamente com a redução da apoptose

(STARCZYNOWSKI, KARSAN 2010; SHI *et al.*, 2019). Portanto, tem-se que o aumento dos níveis de expressão de proteínas pró-apoptóticas, está relacionado diretamente com a expectativa de vida e a diminuição do risco de transformação leucêmica (LI 2017; SHI *et al.*, 2019).

A SMD caracteriza-se pela ativação de células que compõem o sistema imune tais como as células *natural killer*, células T que secretam diversas citocinas; e células supressoras derivadas mielóides (MDSC). Estudos recentes mostram que essas MDSC podem representar um marcador fundamental na inefetividade da hematopoese por produzirem intermédios inflamatórios gerando instabilidade no DNA (BACHEGOWDA *et al.*, 2013; HE Q *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2015; KIRKWOOD *et al.*, 2018).

Na SMD, níveis de algumas citocinas, tais como: IL-6, IL-8, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) estão aumentados (GÓMEZ, 2015). Essas citocinas são essenciais na regulação da inflamação e da apoptose intramedular de doenças hematológicas (BACHEGOWDA *et al.*, 2013; HAN 2020).

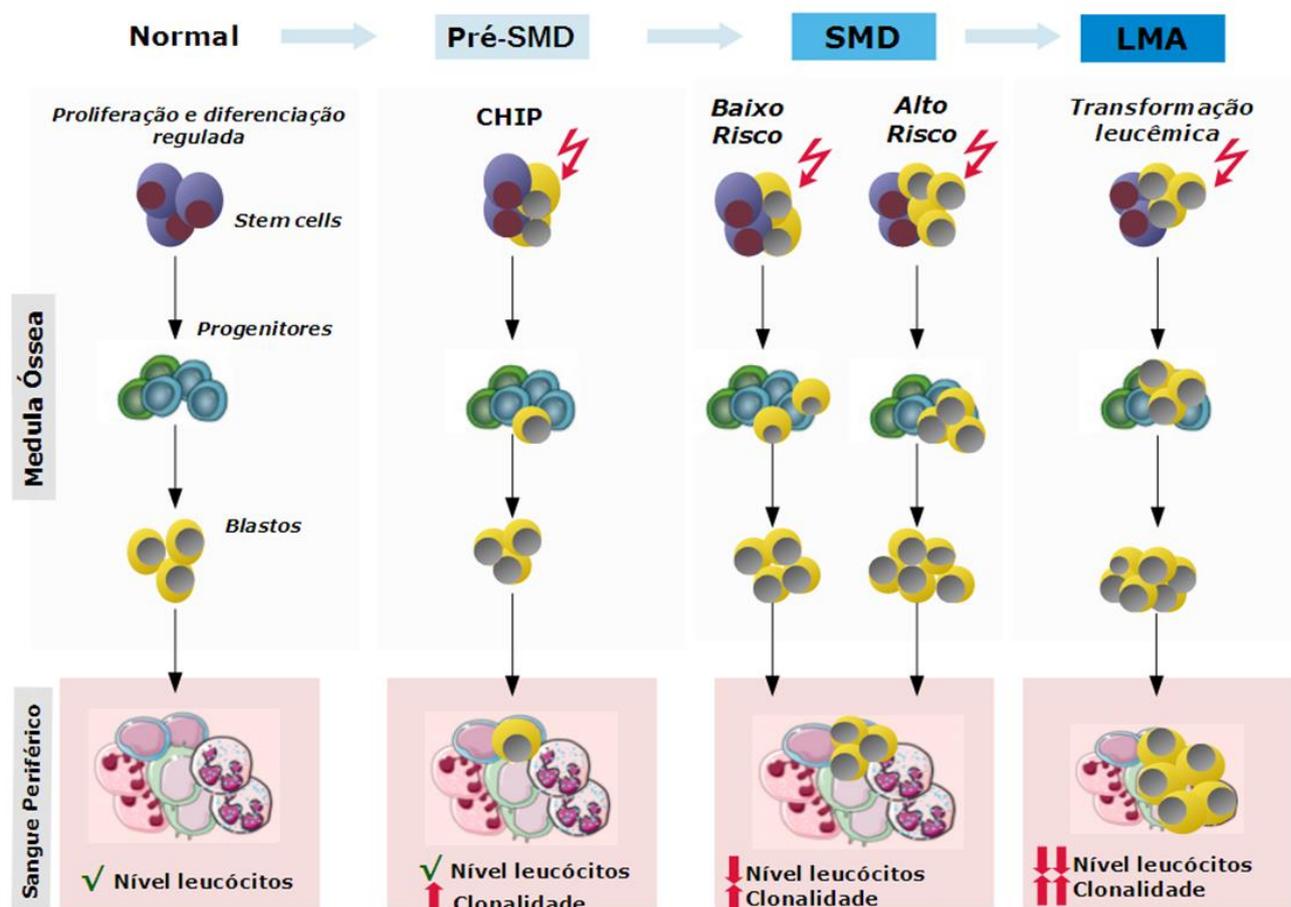
Vários mecanismos estão implicados na regulação da resposta inflamatória, na proliferação celular, na apoptose e na defesa, os quais estão parcialmente regulados pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). (STARCZYNOWSKI, KARSAN 2010). O NF-kB pode ser ativado por uma variedade de sinais como infecções, estresse oxidativo, carcinógenos, citocinas, fatores de necrose (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), irradiação ultravioleta, produtos provenientes de vírus e bactérias (lipopolissacarídeos – LPS) (STARCZYNOWSKI, KARSAN., 2010; HAN *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2019).

Embora a inflamação possa ser induzida na ausência da ativação do NF- kB, apesar de ser uma via fisiologicamente rara, há uma necessidade da ativação do NF-kB não apenas para a indução, mas para a manutenção da inflamação. Existe uma controvérsia no mecanismo de ação do NF-kB pois sabe-se também que o mesmo contribui para a redução da inflamação, preservando a função do tecido (STARCZYNOWSKI, KARSAN., 2010; BEN-NERIAH *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2016).

Uma grande quantidade de dados está agora disponível sobre várias mutações recorrentes detectadas em SMD pela técnica do sequenciamento genético (NGS). No entanto, mutações adquiridas em muitos genes associados à SMD também são encontradas em indivíduos normais em processo de senescência, chamada de “hematopoese clonal de potencial indeterminado” (CHIP) (SNETSINGER *et al.*, 2019; VEIGA *et al.*, 2021).

Uma medula óssea em atividade normal tem uma hematopoese altamente regulada, apresentando células-tronco hematopoéticas (HSCs) com poder de se auto-renovarem e se diferenciarem em células progenitoras. As células progenitoras se diferenciam em glóbulos imaturos (células blásticas) e, em seguida, em glóbulos brancos maduros (leucócitos). É considerado uma pré-SMD na presença do CHIP, ou seja, quando a HSC adquire uma mutação somática resultando em uma vantagem proliferativa; dando origem à hematopoese clonal (MATOS *et al.*, 2021; VEIGA *et al.*, 2021). Enquanto os níveis de leucócitos não mudam, há leucócitos clonais mutantes detectados no sangue, como representado na **figura 3**.

**Figura 3:** Esquema ilustrando as transformações da hematopoese normal para desenvolvimento da LMA.



**Figura 3:** Esquema ilustrando as transformações da hematopoese normal para desenvolvimento da LMA. Adaptado de VEIGA et al., 2021. Normal: a hematopoese é regulada, se diferenciando em células progenitoras. As células progenitoras se diferenciam em blastos e, em seguida, em leucócitos. Pré-SMD: hematopoese clonal de potencial indeterminado (CHIP) ocorre quando uma célula tronco adquire uma mutação somática dando origem a um clone mutante. Os níveis de leucócitos não mudam. SMD: o desenvolvimento de células blásticas, displasia na medula óssea e citopenia, geralmente estão associadas a pelo menos 1 mutação cromossômica. LMA: ocorre uma transformação leucêmica com expansão clonal excessiva de blastos na medula óssea.

### 1.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da SMD é baseado nos achados do hemograma, na identificação de alterações morfológicas em células hematopoéticas (displasias) do aspirado da medula óssea e biópsia óssea e na presença de alterações citogenéticas recorrentes. (BEJAR et al., 2014; HASSERJIAN et al, 2018). Os sintomas iniciais se relacionam à gravidade das citopenias, em especial da anemia, a citopenia mais comum. O diagnóstico pode ser dificultado em pacientes com percentagem <5% de blastos na medula óssea, com ausência de anormalidades cromossômicas recorrentes ou de excesso de blastos (MALCOVATI et al., 2013). Nesses casos, um protocolo de exclusão de causas não clonais está indicado (MAGALHÃES, 2006). São critérios de exclusão as deficiências nutricionais, como a de vitamina B12 e ácido fólico, a exposição recente a agentes tóxicos, disfunções metabólicas e hormonais, doenças infecciosas, auto-ímmunes e etilismo (MAGALHÃES 2006; STEENSMA, 2015).

O cariótipo convencional deve ser realizado em todos os casos de SMD ao diagnóstico, uma vez que as anormalidades citogenéticas são vistas em 50-60% dos pacientes e podem ajudar a estabelecer clonalidade; > 90% dos casos de SMD relacionados à terapia mostram um cariótipo anormal. De acordo com a classificação da OMS 2016, a presença de certas anormalidades citogenéticas associadas a SMD, sendo a mais comum -7, del (7q), del (5q) e i (17q), não é suficiente para confirmar um diagnóstico de SMD em um paciente citopênico. No entanto, algumas das anormalidades citogenéticas mais comuns vistas na SMD, ou seja, del (20q), +8 e -Y, são especificamente excluídos desta lista, pois podem ser vistos em indivíduos idosos normais ou em pacientes com causas de citopenia não relacionadas à SMD (HASSERJIAN *et al*, 2018; POON *et al.*, 2019 PRATS-MARTÍN *et al.*, 2020).

Nas SMD secundárias estas alterações são observadas em cerca de 80% dos casos (LEE et al., 2015). À exceção da deleção 5q-, a anormalidade cromossômica mais comumente observada, nenhuma outra alteração está especificamente associada a qualquer subtipo de SMD (KASI LOKNATH KUMAR *et al.*, 2016).

Genes comumente mutados em SMD conhecidos até o momento podem ser classificados em grupos de acordo com suas funções celulares regulatórias: fatores de transcrição (RUNX1 e TP53), metilação de DNA (TET2), modificação de histona (ASXL1), fatores de splicing (SF3B1) (VALKA *et al.*, 2019). Essas mutações contribuem para a proliferação e progressão clonal, que eventualmente levam ao desenvolvimento da SMD e / ou Leucemia Mieloide Aguda (LMA) (VEIGA *et al.*, 2021). Por essas razões, na atual classificação da OMS de 2016, a presença de mutações genéticas não pode ser usada para fazer o diagnóstico de SMD na ausência de outras características diagnósticas (HASSERJIAN 2018). Portanto, mutações recorrentes não são, atualmente, suficientes para o diagnóstico da SMD.

As deleções cromossômicas são as alterações recorrentes mais comuns na **Tabela 1: Anormalidades genéticas mais frequentes na SMD** frequentemente nos cromossomos 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p e 17p (LI *et al.*, 2017; PRATS-MARTÍN *et al.*, 2020) (**Tabela 1**). As monossomias, trissomias e translocações não equilibradas são as segundas anomalias mais frequentes, ocorrendo em 15% dos casos. As monossomias mais comuns envolvem os cromossomos 5, 7 e a nulissomia do Y.

<b>Anormalidades Genéticas da SMD</b>	
<b>Mutações somáticas</b>	<b>Genes envolvidos</b>
Reguladores epigenéticos	TET2, DNMT3A, ASXL1, EZH2
Spliceossomo do RNA	SF3B1, SRSF2, U2AF1
Transcrição do DNA	RUNX1, TP53
Vias de transdução de sinal	KRAS, NRAS, JAK2
Coesão complexa	SMC3, SMC1A, RAD21, STAG2
<b>Mutações germinativas</b>	CEBPA, DDX41, ETV6, GATA2, RUNX1
<b>Anormalidades cromossômicas</b>	del(5q), del(7q), del(20q), del(17q)

**Fonte:** Adaptado de Veiga *et al.*, 2021.

Embora as translocações equilibradas sejam alterações relativamente comuns em doenças mielóides, nomeadamente na LMA, são muito raras nas SMD (VALKA *et al.*, 2019; VEIGA *et al.*, 2021). Portanto, mutações recorrentes não são suficientes para o diagnóstico da SMD e não estão inseridas até hoje em “guideline”.

### 1.1.3 Classificação e fatores de prognóstico na SMD

A classificação atualmente usada foi proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001 e revisada em 2016 e associa a citogenética às alterações morfológicas. É considerado o número de linhagens hematopoéticas acometidas (uma ou múltiplas linhagens), reconhece-se a síndrome 5q-, reduz-se para um percentual igual ou superior a 20% a definição de leucemia aguda e excluem-se os subtipos anemia refratária com excesso de blastos em transformação e a leucemia mielomonocítica crônica (HASSERJIAN 2018; VALKA et al., 2019). O objetivo da revisão da classificação OMS foi reduzir o número de pacientes não classificados e agrupar categorias mais homogêneas. Oito subtipos foram então propostos, a saber: citopenia refratária com displasia em uma linhagem (CRDU), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos -1 (AREB-1), anemia refratária com excesso de blastos -2 (AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificável (SMD-N), SMD associada com del (5q) isolada (SMD-5q) e citopenia refratária da criança (CRC; provisório) (OMS 2008).

Mais recentemente, a classificação da OMS foi novamente atualizada em 2016 e algumas modificações propostas, conforme **tabela 2**.

Os subgrupos anemia refratária, neutropenia refratária e trombocitopenia refratária foram abolidos e uma nova nomenclatura foi proposta: SMD com displasia de única linhagem; SMD com sideroblastos em anel (com sideroblastos em anel e displasia de única linhagem e com sideroblastos em anel e displasia de múltiplas linhagens), SMD com displasia de múltiplas linhagens, SMD com excesso de blastos, SMD com del(5q) isolada, SMD não classificada, citopenia refratária da infância e neoplasia mielóide com predisposição da linhagem germinativa. Além disso, um marcador molecular foi, pela primeira vez, utilizado para o subgrupo com sideroblastos em anel, que ficou definido através da presença de  $\geq 15\%$  de sideroblastos em anel ou quando esse percentual for  $\geq 5\%$ , desde que na presença de mutação SF3B1 (ARBER, 2016).

**Tabela 2:** Classificação da SMD de acordo com a OMS 2016.

SUBTIPO	SP	MO
SMD com displasia em única linhagem (SMD-DU)	Uni ou bicitopenia; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; 5% de sideroblastos em anel**; ≤5% blastos
SMD com displasia em múltiplas linhagens (SMD-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de sideroblastos em anel**; ≤5% blastos
SMD COM SIDEROBLASTOS EM ANEL (SMD-SA)		
SMD-SA com displasia em única linhagem (SMD-SA-DU)	Uni ou bicitopenia; ≤1% de blastos;	Displasia em 1 linhagem; ≥ 15% ou ≥5% de sideroblastos em anel**; ≤5% blastos
SMD-SA com displasia em múltiplas linhagens (SMD-SA-DM)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos;	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥ 15% ou ≥5% de sideroblastos em anel**; ≤5% blastos
SMD COM EXCESSO DE BLASTOS (SMD-EB)		
SMD com excesso de blastos 1 (SMD-EB1)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0, 1,2 ou 3 linhagens; 5-9% blastos
SMD com excesso de blastos 2 (SMD-EB2)	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0, 1,2 ou 3 linhagens. 10-19% blastos
SMD INCLASSIFICÁVEL (SMD -I)		
SMD-I com 1% de blastos	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% blastos*	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% blastos
SMD-I com displasia em única linhagem e pancitopenia	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; ≤5% blastos
SMD-I baseada em alterações citogenéticas	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% blastos	Ausência de displasias; ≤15% de sideroblastos em anel; ≤5% blastos
SMD com del(5q) isolada	Uni ou Bicitopenia; ≤1% de blastos;	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)-7

\*1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas\*\* Na presença de mutação do gene SF3B1. SP: sangue periférico; MO: medula óssea. Fonte: Adaptado de Abner et al (2016).

GREENBERG et al., desenvolveram em 1997, um sistema de escore prognóstico, o *International Prognostic Score System* – IPSS. Esse sistema é baseado no número de blastos na medula óssea, o grupo de risco citogenético e a presença de citopenias. A estratificação de risco estima a sobrevida global e o risco

de evolução para leucemia aguda, orientando a escolha terapêutica (GREENBERG, 1997).

Em 2012, o índice prognóstico do IPSS foi revisado, o IPSS-R (GREENBERG et al., 2012), conforme **tabela 3**. Nesta nova revisão, o IPSS-R permaneceu possuindo como variáveis clínicas laboratoriais para auxiliar no prognóstico do paciente a citogenética, percentagem de blastos e citopenias no sangue periférico.

As mudanças na estratificação prognóstica dos pacientes com SMD foram: 5 em vez de 3 subgrupos citogenéticos de prognóstico com classificações específicas, importância da idade do paciente ao diagnóstico, nível de ferritina sérica e lactato desidrogenase como impacto para a sobrevivência, mas não para a transformação da leucemia mielóide aguda (GREENBERG et al., 2012).

**Tabela 3:** Estratificação prognóstica na SMD.

Variável	Valor dos escores						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
<b>Blastos na MO</b>	≤2%	-	>2-<5%	-	5-10%	>10%	-
<b>Cariótipo*</b>	Muito Bom	-	Bom	-	Intermediário	Ruim	Muito Ruim
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	≥10	-	8 - 10	<8	-	-	-
<b>Plaquetas (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
<b>Neutrófilos (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-
	Estratificação de risco						
	Muito baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto		
<b>Escores</b>	≤1.5	>1.5 - 3	>3 - 4.5	>4.5-6	>6		
<b>Sobrevida (anos)</b>	8.8	5.3	3.0	1.6	0.8		
<b>Média de tempo de evolução para LMA, 25%, ano</b>	-	10.8	3.2	1.4	0.73		

\* Cariótipo: Muito Bom= -Y, del(11q); Bom= Normal, del(5q), del(12q), del(20q), duplo - incluindo o del(5q); Intermediário = del(7q), +8, +19, i(17q), outras anormalidades simples ou duplas; Ruim = complexos (3 anormalidades), -7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duplos incluindo o -7/del(7q); Muito ruim= complexos (>3 anormalidades).

## 1.2 Inflamação e Câncer

A inflamação é uma reação fisiológica de defesa e reparo do organismo frente a uma agressão física, química ou biológica, podendo esse processo ser considerado como base fisiopatológica para o desenvolvimento de muitas doenças (DESAI, PRICKRIL, *et al.*, 2018). Esse restabelecimento da homeostase é desencadeado através da estimulação de mecanismos celulares e moleculares. (MANTOVANI *et al.*, 2008; MUNN, 2017; DESAI, PRICKRIL, *et al.*, 2018).

A imunidade inata, podendo ser chamada de natural ou nativa, constitui a primeira linha de defesa do organismo. Seus principais constituintes são o epitélio, células *natural killer* (NK), proteínas do sistema complemento, mediadores da inflamação e células fagocitárias (**Tabela 4**). Dentre essas células, os neutrófilos são as primeiras células a se infiltrarem sob a ação de mediadores inflamatórios para o local lesionado e, por conseguinte, enviar sinais químicos recrutando outras células fagocitárias para a área lesionada, respondendo sistematicamente da mesma maneira a sucessivas infecções. Com isto a inflamação é instaurada (GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019; THOMPSON *et al.*, 2015).

À medida que o processo de inflamação prossegue, a imunidade torna-se mais específica para distinguir diferentes moléculas e microrganismos, sendo necessário o recrutamento de células mais especializadas como linfócitos caracterizando, portanto, o outro tipo de resposta imunológica, a chamada imunidade adquirida ou adaptativa (**Figura 4**). Esta resposta é facilitada pela ação de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (RONS) liberadas com o objetivo de combater o patógeno ou agente causador do processo inflamatório. (COUSSENS; ZENA WERB, 2002; MUNN, 2017; QU *et al.*, 2018; DESAI, PRICKRIL, *et al.*, 2018).

**Tabela 4:** Principais células participantes da resposta imunológica do sistema inato e adquirido.

<b>Células Resposta Inata</b>	<b>Características</b>	<b>Função principal</b>
<b>Macrófagos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Os monócitos são precursores</li> <li>• Reconhecimento de antígenos pelos receptores <i>Toll-like</i> (TLRs)</li> <li>• Presentes no tecido conjuntivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizam fagocitose</li> <li>• Liberam mediadores da inflamação como RONS</li> </ul>
<b>Neutrófilos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células essenciais do sistema inato</li> <li>• Possuem receptores de superfície para reconhecimento do patógeno</li> <li>• Constituem 40-70% dos leucócitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Realizam fagocitose</li> <li>• Possuem grânulos antimicrobianos</li> <li>• Produzem óxido nítrico</li> <li>• Liberam mediadores da inflamação RONS</li> </ul>
<b>Células Natural Killer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação por citocinas</li> <li>• Presentes no sangue periférico, baço e raras em outros órgãos linfóides</li> <li>• Importante fonte de IFN-<math>\gamma</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem grânulos e ativam apoptose</li> <li>• Secretam citocinas inflamatórias</li> </ul>
<b>Células Dendríticas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Função de apresentadora de antígeno</li> <li>• Ligação entre resposta inata e adquirida</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captura e apresentação de antígenos aos linfócitos</li> </ul>

Células Resposta Adquirida	Características	Função principal
<b>Linfócitos B</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem receptores de antígenos</li> <li>• Maturam na medula óssea</li> <li>• Constituem 5-15% dos linfócitos</li> <li>• Constituem a imunidade humoral</li> <li>• Antes do contato com o antígeno é chamado de linfócito <i>naïve</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diferenciam-se em plasmócitos</li> <li>• Atuam na produção de anticorpos</li> <li>• Atuam como células apresentadoras de antígenos</li> <li>• Liberam citocinas</li> </ul>
<b>Linfócitos T</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem receptores de antígenos para complexo principal de histocompatibilidade – MHC</li> <li>• Expressam moléculas CD4 ou CD8</li> <li>• Maturam no timo</li> <li>• Constituem a imunidade celular</li> <li>• Antes do contato com o antígeno é chamado de linfócito <i>naïve</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• São parte da imunidade celular</li> <li>• Responsável pela memória imunológica</li> <li>• Possuem 3 subtipos: T <i>helper</i>, T citotóxico e T reguladoras</li> <li>• Linfócitos T citotóxico contêm granzimas, granulísina e perforina que atuam na apoptose.</li> </ul>

**Fonte:** Adaptado de ABBAS e LICHTMAN, 2009.

A inflamação é ainda dividida em aguda e crônica. A inflamação aguda é uma resposta protetora inicial caracterizada por um fenômeno transitório de curta duração, que tem como resultado a resolução, ou cicatrização da área, ou ainda a sua

cronicidade. Na inflamação crônica, o processo persiste por um longo período com a presença de macrófagos no tecido lesionado, ocorrendo o dano/destruição do tecido.

A restauração da homeostase após dano visa prevenir a perda da função do tecido. Macrófagos reagem às alterações do tecido para remover células mortas por apoptose e produzir moléculas quimiotáticas para o recrutamento de outros tipos de células (se necessário), regulando o sistema imunológico. As respostas inflamatórias dos tecidos podem ser iniciadas e mantidas por pelo menos três principais mecanismos interdependentes. Inicialmente, através da proliferação local de macrófagos e células dendríticas. Outro mecanismo é através do recrutamento de células imunes da medula óssea e do tecido linfóide. E posteriormente, verifica-se a proliferação e diferenciação de células do sistema imunológico (BÄCKDAHL, L.; *et al* 2009; MUNN, 2017; GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).



**Figura 4:** Células que participam da resposta imune inata e adaptativa. Macrófago, célula dendrítica, célula NK e neutrófilo são as principais células responsáveis pela resposta imune inata. Células B e T são células características da imunidade adaptativa. Adaptado de ABBAS, LICHTMAN e PILLAI (2012).

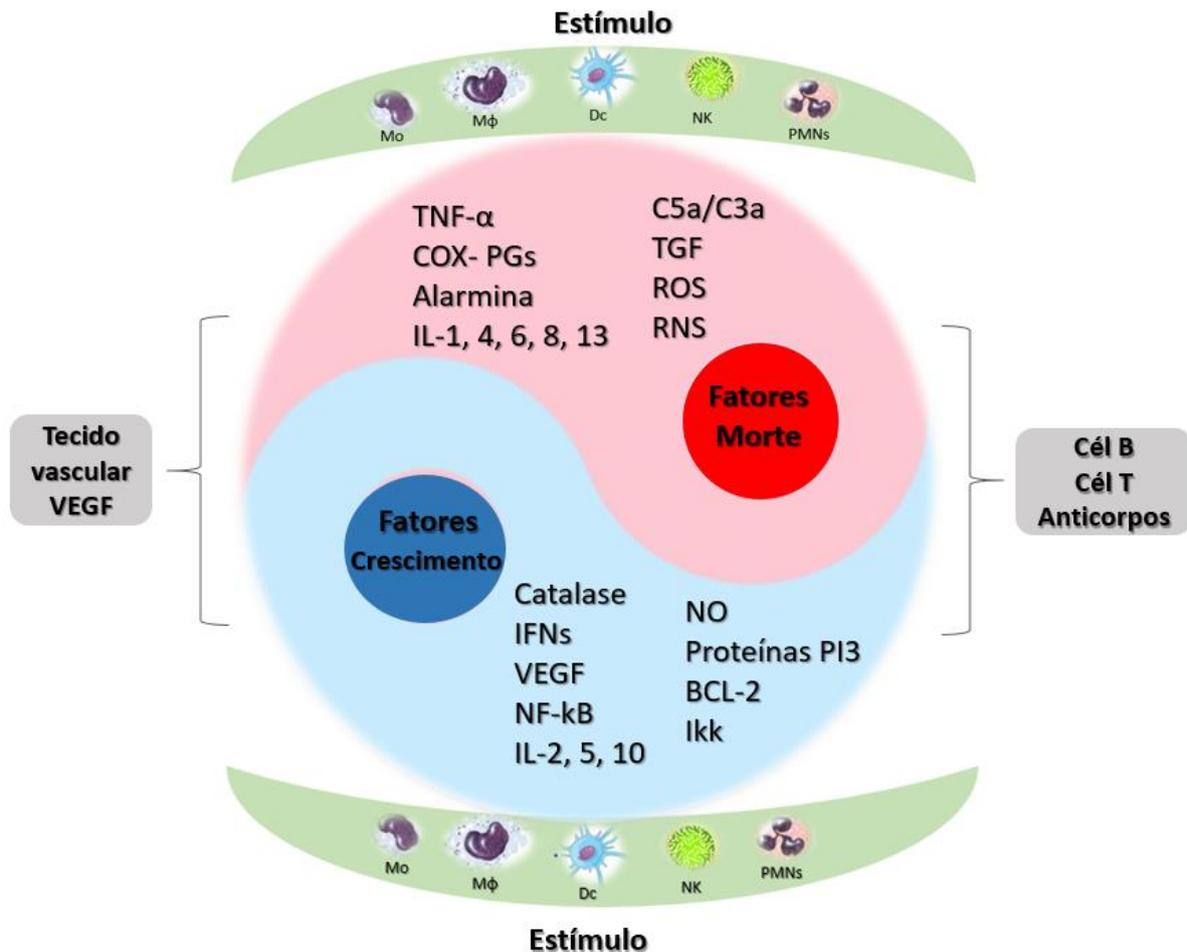
Uma inflamação crônica e persistente local ou sistêmica não controlada é uma força motriz subjacente de doenças como diabetes, depressão, obesidade, COVID-19 entre outros. (MEHTA *et al.*, 2020; FISHBEIN *et al.*, 2020).

A inflamação crônica tem sido regularmente associada ao desenvolvimento e progressão do câncer. Estudos iniciaram com Rudolf Virchow em 1863, que associou a origem do câncer em regiões teciduais inflamadas com a proliferação celular e

desde então, estabeleceu-se uma conexão entre a inflamação crônica e a tumorigênese (SINGH, 2019; FISHBEIN et al., 2020).

O patologista alemão Rudolph Virchow estudou os quatro sinais de inflamação (vermelhidão, inchaço, calor e dor) e referiu que a “inflamação crônica é uma condição promotora tumoral, através do estímulo à proliferação celular” (HEIDLAND *et al.*, 2006). Estudos experimentais realmente confirmaram que a inflamação pode estimular ou induzir o início, a progressão e a metástase do tumor. (BEN-NERIAH et al., 2011; CANDIDO J., HAGEMANN, 2013; ZINGER et al., 2017 CHEN et al, 2018).

O desenvolvimento do câncer pode representar uma falha da imunovigilância. A imunidade tumoral eficaz é estabelecida pelo equilíbrio do sistema imunológico através das propriedades de proteção proveniente da inflamação aguda ou manutenção do equilíbrio das propriedades tumoricidas (*yin*) e tumorigênicas (*yang*) de vigilância imunológica (THOMPSON *et al.*, 2015; GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019). A figura 5 retrata o equilíbrio dos dois lados controlados biologicamente por respostas inflamatórias opostas. Os estímulos induzem a ativação de células imunes inatas e / ou adaptativas pela expressão de "fatores de morte" participantes das vias *yin*, acarretando a apoptose da célula tumoral; enquanto que as vias *yang* tentam cessar a inflamação através da liberação de "fatores de crescimento". As vias *yin* e *yang* são intimamente conectadas em busca do restabelecimento da homeostase (THOMPSON *et al.*, 2015; GRETEN; GRIVENNIKOV, 2019).



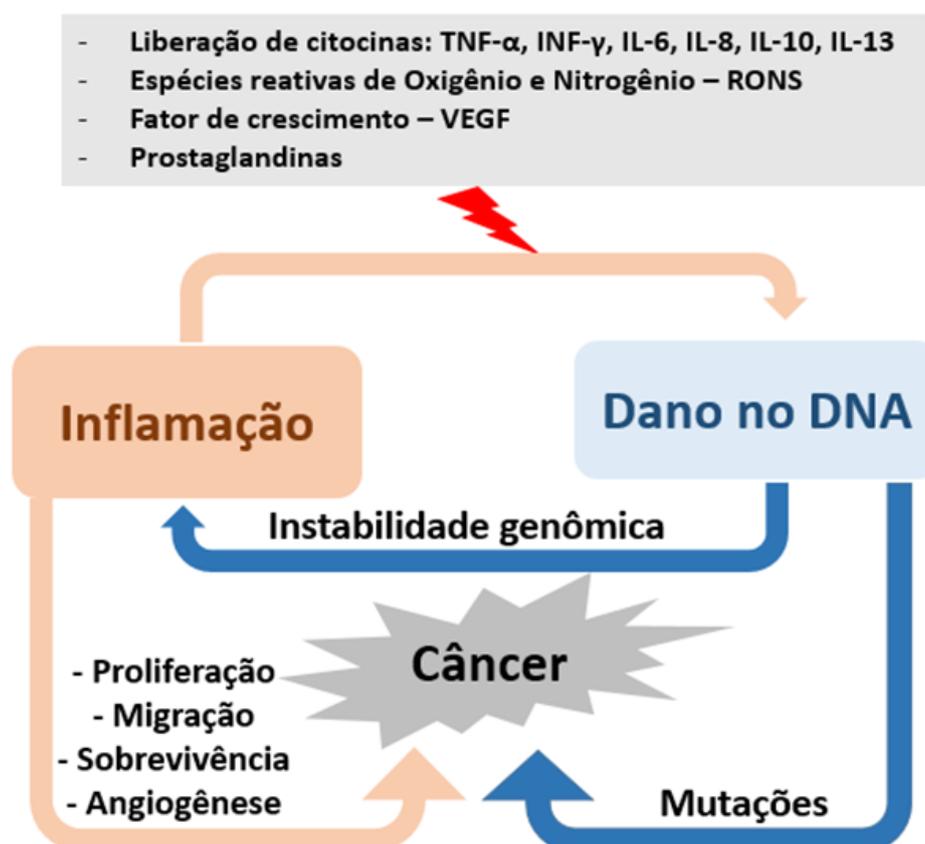
**Figura 5:** Ilustração dos lados 'yin' e 'yang' da inflamação aguda. O esquema retrata os lados opostos de respostas inflamatórias agudas controladas por células imunes inatas e / ou adaptativas. Adaptado de Thompson et al., 2015.

**Legenda:** VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; IL: Interleucinas; NO: óxido nítrico; ROS: espécie reativa de oxigênio; RNS: espécie reativa de nitrogênio; IFN: interferons; NF-kB: fator de transcrição kB; COX: ciclo-oxigenase; TGF: fator de crescimento transformador.

A ativação das células do sistema imunológico contribui para a liberação de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas inflamatórias como ciclooxigenases, favorecendo um papel relevante no fornecimento de sinais anti e protumorigênicos, que resultam em transformação celular, progressão, proliferação, sobrevivência, invasão celular, angiogênese e metástase (KIDANE 2014; HIGHTON et al., 2021). Além do mais, o início da inflamação está relacionado com danos oxidativos, mutações de DNA e outras mudanças no microambiente como a modelação da matriz extracelular e enfraquecimento das barreiras vasculares,

facilitando a migração de células imunes (THOMPSON 2015; QU 2018; CONLON et al., 2019).

Em vista disso, os danos secundários à inflamação podem resultar em apoptose, necrose e mutações, dificultando ainda mais o reestabelecimento da homeostase, tornando-o mais propício à transformação celular, agravando o processo inflamatório e desse modo, o surgimento do câncer conforme ilustrado na **figura 6** (COUSSENS, WERB 2002; DESAI 2018; KAY 2020; FISHBEIN 2021).



**Figura 6:** Associação da inflamação e o surgimento do câncer. As duas vias desencadeiam a ação de células e mediadores inflamatórios promovendo a desregulação da homeostase, instabilidade genômica e a tumorigênese. Adaptado: Del Prete, 2011; Candido, 2013; Kidane, 2014; Yang, 2017; Kay 2019.

Duas vias moleculares que ligam a inflamação e o câncer podem ser identificadas como as principais afluentes para o meio inflamatório: uma intrínseca, na qual eventos genéticos, como oncogenes e aberrações genéticas, induzem a transformação neoplásica através da liberação de inúmeras citocinas, e uma via extrínseca, quando a inflamação crônica por meio de infecções aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de diferentes tipos de câncer pela ação de mediadores inflamatórios (DEL PRETE, 2011; CONLON *et al.*, 2019).

Na via intrínseca, diferentes classes moleculares e modos de ativação de oncogenes como as tirosinas quinases ou inativação dos genes supressores de tumor desencadeiam uma cascata inflamatória. Por exemplo, o oncogene *myc*, que codifica fator de transcrição, está super expresso nos tumores. A desregulação do gene *myc* inicia e mantém características fundamentais na fenotipagem do tumor, alterando o microambiente extracelular com a indução na produção e liberação de mediadores inflamatórios, como algumas citocinas. Já na via extrínseca, os leucócitos são os principais reguladores dos mediadores inflamatórios, através da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e fatores de crescimento. Esta via resulta em danos no DNA, na ativação de oncogenes e também representa uma via sinalizadora importante que liga o processo inflamatório ao surgimento do tumor (BRENNER 2014; MUNN 2017).

As duas vias convergem, resultando na ativação de fatores de transcrição, tais como: o STAT3 que é um fator de transcrição ativado por tirosina quinase e o fator de transcrição nuclear Kappa B – NF-κB que coordenam a produção de mediadores inflamatórios e a ativação de vários leucócitos gerando um microambiente inflamatório relacionado ao câncer. NF-κB funciona em processos inflamatórios induzindo a expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, ciclooxygenases, síntese de óxido nítrico - NO e fatores angiogênicos, todos culminando numa resposta inflamatória exacerbada. Além dessas ações, o NFκB atua na sobrevivência do tumor pela indução de genes anti-apoptóticos (DEL PRETE, 2011; MATOS 2017; CHEN *et al.*, 2018).

De acordo com Kidane et al 2014 e Kay et al 2019, outro fator relevante na correlação inflamação-câncer é a ocorrência de um dano no gene de reparo e replicação de DNA, o que acarretará um fenótipo aberrante, sendo um fator significativo para o desenvolvimento do câncer. O dano no DNA está presente durante o início da inflamação e se acumula no decorrer de sua fase crônica. Durante a inflamação, a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS) é estimulada para combater patógenos e atuar no reparo e regeneração de tecidos, no entanto, essas moléculas químicas também podem danificar o DNA, que por sua vez favorecem o desenvolvimento de mutações que ocasionam o surgimento do câncer. As vias de reparo do DNA são essenciais para impedir que danos ao DNA causem mutações, mas a produção exacerbada de RONS pode ser potencialmente mutagênica, interferindo nos mecanismos de reparo, reduzindo assim sua eficácia. Em vista disso, o reparo do DNA desempenha um papel importante na neutralização desse dano, porém não é sempre bem-sucedido, sendo muitas vezes a causa do aparecimento do câncer (KIDANE 2014; THOMPSON 2015; DESAI 2018; KAY 2019).

A inflamação crônica é a capacidade de habilitação de tumor bem estabelecida, o que permite tumores se esquivarem da imunovigilância. Diferentes mediadores inflamatórios participam das várias fases da carcinogênese: a iniciação, progressão e invasão do câncer dando origem a uma via irreversível. Portanto, células participantes do processo inflamatório relacionadas ao câncer necessitam uma compreensão mais aprofundada acerca de suas funções para melhor adaptar o uso de abordagens terapêuticas anticâncer nos pacientes (COSTANTINI *et al.*, 2009; GALDIERO, *et al.*, 2018; BERRAONDO *et al.*, 2019; FISHBEIN 2021).

### **1.3 Mediadores da Inflamação**

A inflamação aguda é uma resposta protetora contra patógenos, mas também importante para o restabelecimento de tecidos danificados após lesão e infecção. As células do sistema imunológico produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para o local da infecção. A progressão para uma inflamação crônica resulta da presença contínua de um patógeno ou infecção viral, reações autoimunes ou corpos

estranhos persistentes. Uma das características da inflamação é a infiltração de células fagocitárias, incluindo neutrófilos e vários tipos de linfócitos. A presença dessas células leva à produção sustentada de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas que pertencem à família das citocinas, interferon- $\gamma$  e outros mediadores lipídicos que coordenadamente compõem um microambiente propenso ao câncer. (MUNN 2017; CONLON et al., 2019; GRETEN 2019).

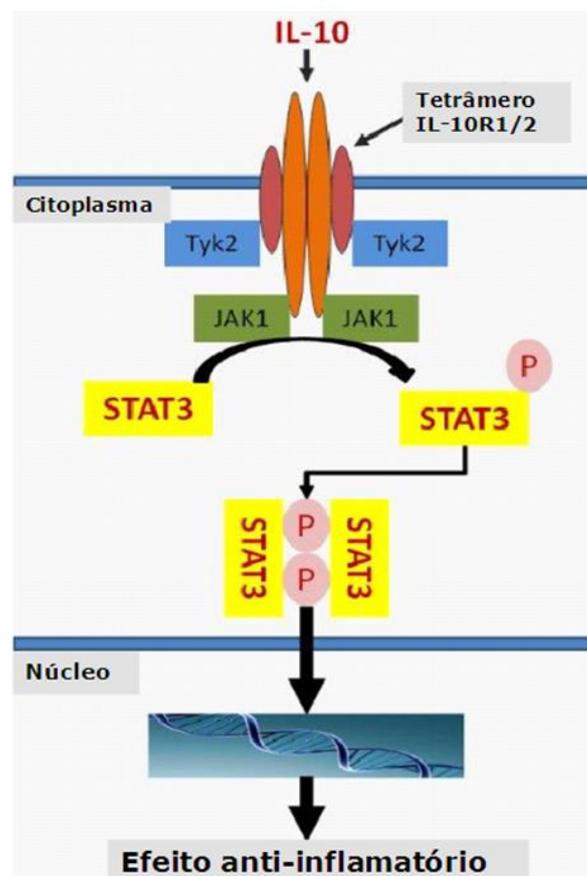
As interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimentos e fator de necrose tumoral constituem as chamadas citocinas. Esses mediadores da inflamação são proteínas constituindo diferentes famílias que afetam o comportamento de diversas células através de respostas imunes e inflamatórias. Os efeitos das citocinas na imunidade inata e adquirida estão associados a fatores como a concentração local de citocinas, o padrão de expressão de seu receptor e a interação das vias de sinalização em resposta às células imunes. Deste modo, o sistema imunológico dispõe de citocinas pró-inflamatórias que podem estimular a ação de outras citocinas e da resposta imune e de citocinas anti-inflamatórias que atuam na supressão dessa resposta. (KIDANE 2014; CHEN et al., 2018; CONLON et al., 2019).

### **1.3.1 Interleucina 10 - (IL-10)**

IL -10 é uma citocina composta por 178 aminoácidos e um peso molecular de 37kDa, possuindo receptores em duas cadeias diferentes: receptor-1 de IL-10 e receptor-2 de IL-10. Esse homodímero foi originalmente identificado por Mosmann e colaboradores em 1989 como uma citocina fundamental na ação anti-inflamatória produzida por várias células, tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, incluindo células dendríticas (DCs), macrófagos, mastócitos, células *natural killer* (NK), eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B, bem como as células supressoras derivadas mielóides - MDSCs (MOSSER 2008; SARAIVA, 2010; MANNINO, 2015; SAXENA 2015). Que célula é a maior produtora de IL-10 é assunto ainda controverso. (MOSSER 2008).

De acordo com Ouyang e cols 2011, inicialmente, IL-10 foi nomeada como um fator inibidor da síntese de citocina (CSIF) através das células Th2 que inibem a

produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  por meio dos linfócitos Th-1. O papel da IL-10 na patogênese e no desenvolvimento do tumor é ainda controverso (CHEN 2019). A função primária da IL-10 é inicialmente considerada como uma citocina anti-inflamatória eficaz, que atua suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias através da inibição de células TCD4+ e da inibição da capacidade de apresentação de antígenos pela ativação da via de sinal STAT3 conforme ilustrado na **figura 7** (FIORANELLI 2014; KWILASZ 2015; SAXENA 2015). A IL-10 é uma citocina pleiotrópica com funções antiinflamatórias e imunoestimulatórias. No câncer, a IL-10 pode exercer efeitos pró ou antitumorais no microambiente inflamatório do tumor. (RALLIS et al., 2021). De acordo com Oft M., 2014, o efeito antitumoral de IL-10 é pode ocorrer por meio de: (i) redução da inflamação promotora de tumor e (ii) estimulação de células T CD8 + no meio tumoral. O efeito pró-inflamatório ocorre por indução de IFN- $\gamma$ , contrariamente, IL-10 pode induzir a citotoxicidade de células T CD8+, induzindo efetivamente à rejeição do tumor (RALLIS et al., 2021).



**Figura 7:** Mecanismo de ativação da IL-10 através de seus receptores. Adaptado de Murray 2007; Fiorenalli 2014. **Legenda:** IL-10: interleucina 10; Tyk: tirosina quinase; JAK: Janus quinase; STAT3: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3.

Alguns estudos indicam que um alto nível de IL-10 se correlaciona com a baixa sobrevida de alguns pacientes com câncer, enquanto alguns outros estudos forneceram resultados opostos (ZAHO 2015; MANNINO 2015; VALDÉS-FERRADA 2020).

A resposta anti-inflamatória da IL-10 permanece com efeitos contraditórios, alguns estudos demonstram sua atuação de forma positiva para o crescimento e promoção do tumor e enquanto em outros estudos, têm mostrado que a IL-10 contribui para a erradicação e supressão da angiogênese e metástases necessárias à progressão do tumor pela inibição da TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, dos linfócitos T *helper* e consequentemente, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  (MOCELLIN *et al.*, 2003; FIORENALLI *et al.*, 2014; MANNINO 2015; WANG 2019; VALDÉS-FERRADA *et al.*, 2020).

Considerando a IL-10 como uma citocina anti-inflamatória, esta exerce suas funções regulando importantes vias de sinalização da imunidade inata e adquirida, incluindo as proteínas da via Janus Kinase (JAK), do transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) e do fator de transcrição nuclear kB (NFkB), alterando, por conseguinte a expressão de genes (SARAIVA, O’GARRA 2010; KWILASZ *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019). Consequentemente, a IL-10 pode inibir a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, bloquear a ação das células apresentadoras de antígeno (APCs), particularmente as células dendrítica (DCs) e macrófagos e a proliferação celular. Além de seus efeitos sobre APCs, IL-10 pode inibir diretamente a ativação e proliferação de células T por supressão da produção de IL-2 (KWILASZ *et al.*, 2015; SAXENA *et al.*, 2015).

A IL-10 executa essas funções regulatórias ligando-se a um receptor de superfície celular específico (IL-10R) que é feito de duas cadeias, IL-10R1 e IL-10R2. Ambas as cadeias são glicoproteínas transmembrana cujos domínios intracelulares diferem em comprimento e sequência de aminoácidos. O IL-10R1 está localizado no cromossomo 11 e o IL-10R2 no cromossomo 21. O IL-10R2, que é amplamente expresso, liga a IL-10 apenas após a IL-10 se ligar ao IL-10R1. Por outro lado, a expressão de IL-10R1 é restrita principalmente às células do sistema imunológico e,

principalmente, de monócitos e macrófagos. A ligação de IL-10 a IL-10R1 leva às alterações conformacionais na IL-10 que permitem sua associação com o IL-10R2 e a formação de complexos IL-10 / IL-10R. Esses complexos podem suprimir respostas imunológicas por múltiplos mecanismos, porém a inibição do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B e sua atividade de ligação ao DNA é considerada a principal via (SARAIVA, O’GARRA 2010; KWILASZ *et al.*, 2015; SAXENA *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2019).

Por serem mediadores imunológicos potentes, as citocinas têm sido alvo terapêutico para diversas patologias. Assim, a IL-10 tem sido o foco das atenções nos últimos anos por contribuir com um importante papel na imunoterapia contra o câncer.

### **1.3.2 Interleucina – 13 (IL-13)**

Descrita pela primeira vez em 1993 por Minty e cols, a IL-13, um peptídeo de 33 aminoácidos, é uma citocina pertencente à família Th2. IL-13 é secretada tanto por células da imunidade adquirida como as células T CD4+, quanto por células da imunidade inata, como eosinófilos, basófilos, mastócitos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), exercendo propriedades anti-inflamatórias (SAIGUSA *et al.*, 2014; MARONE *et al.*, 2019).

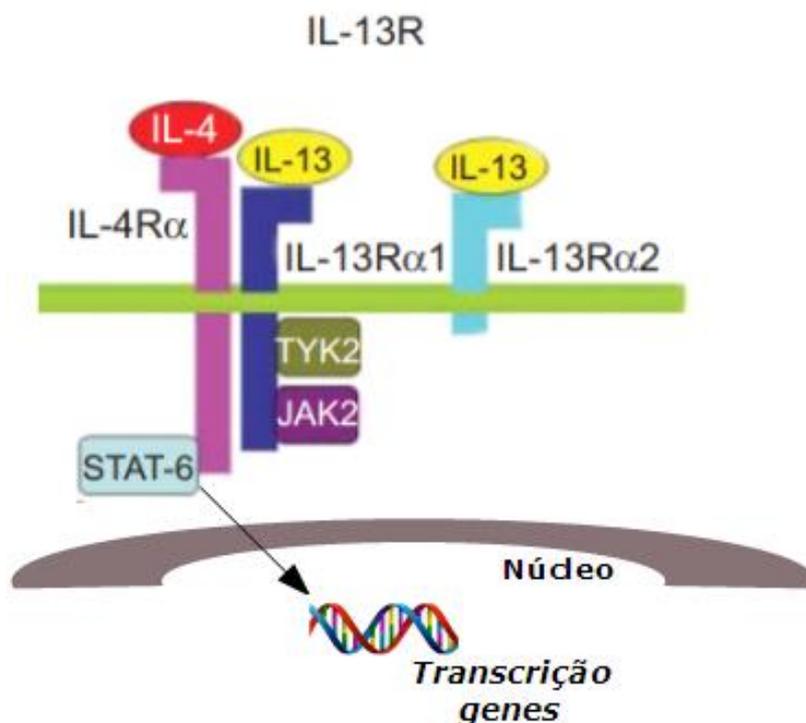
Vários autores têm relatado a associação de IL-13 com clínica de pacientes com doenças inflamatórias sistêmicas, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), alergias, sepse e no câncer (THACI *et al.*, 2014; SAIGUSA *et al.*, 2014; SEYFIZADEH *et al.*, 2015; DHABAL *et al.*, 2018; BRADDOCK *et al.*, 2018; MARONE *et al.*, 2019).

A IL-13 exerce seus efeitos predominantemente ao se ligar com baixa afinidade a um monômero IL-13R $\alpha$ 1, expresso pela maioria dos leucócitos e, em seguida, conecta-se a IL-4R $\alpha$  para formar um complexo heterodímero de alta afinidade. Este complexo ativa as tirosinas quinase JAK1, JAK3 e TYK e o sinal tradutor e ativador

da transcrição 6 (STAT6). Estas quinases fosforilam resíduos de tirosina no receptor IL-4 $\alpha$ , que por sua vez levam ao recrutamento e fosforilação do transdutor de sinal (STAT6). O STAT6 dimeriza e se transloca para o núcleo e modula a transcrição de genes principalmente de células T (**Figura 8**) (BRADDOCK 2018; MARONE *et al.*, 2019).

No câncer de col retal, a ligação da IL-13 ao seu receptor de alta afinidade se relacionou com a adesão, migração, invasão, metástase e prognóstico, revelando que níveis baixos de IL-13 foram associados a um pior prognóstico, acarretando à uma menor sobrevida global nesses pacientes. (SAIGUSA *et al.*,2014).

As evidências mostram múltiplos efeitos contraditórios da IL-13, por vezes, inibindo a proliferação de células neoplásicas (BARDERAS R 2012; SAIGUSA *et al.*,2014; THACI *et al.*,2014; MCCORMICK, HELLER 2015), outras vezes promovendo a progressão do tumor. (CAO *et al.*, 2016).



**Figura 8:** Mecanismo de ativação da IL-13 através da ligação com seus receptores. Adaptado de: OH CK, GEBA GP., *et al.*,2010; Suzuki A., Leland, *et al.*, 2015. Legenda: TYK: tirosina quinase; JAK2: janus quinase; STAT-6: Proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 6; IL-13: interleucina 13; IL-4: interleucina 4; IL-13R $\alpha$ 1/IL-13R $\alpha$ 2: receptores da IL-13.

É provável que a resposta imunológica Th1, incluindo a ativação de células T citotóxicas CD8 + (CTLs), contribua para a ação anti-tumoral, enquanto a resposta Th2 tenha uma ação pró-tumoral. Uma vez que a resposta imune em direção a Th2 suprime a ativação de Th1, acredita-se que este é um dos mecanismos que afeta negativamente as respostas imunes tumorais. IL-13 tem papel central na via imunorregulatória em que as células NK suprimem a resposta imunológica ao tumor (SUZUKI A., LELAND *et al.*, 2015; MARONE *et al.*, 2019).

O papel da IL-13 é, portanto, bastante complexo e varia conforme o tipo de malignidade. Os níveis aumentados de IL-13 podem servir como um biomarcador para prever o quão agressivo um câncer pode ser, bem como ser uma estratégia para monitorar a eficácia da terapia do câncer.

### 1.3.3 IFN- $\gamma$

A família dos interferons (IFN) compreende um grupo de citocinas com maior variedade de funções que ajudam a regular o sistema imune inato e adaptativo (MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020).

O IFN foi descoberto na década de 1950 por Isaacs & Lindenmann e Nagano & Kojima através da investigação de infecções virais e a sua capacidade de desencadear uma resposta antiviral muito potente nas células imunológicas, além de muitas outras atividades posteriormente descritas (MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020).

A identificação de novos IFNs e a disponibilidade de novos agentes eficazes na terapia antitumoral têm despertado interesse em estudos mais avançados no uso do IFN em combinação com outros agentes na imunoterapia (LASFAR *et al.*, 2016).

Em seres humanos, IFN está presente em três famílias diferenciando-se por sua capacidade de se ligar a receptores específicos: tipo I, tipo II e ultimamente IFN tipo III. IFN tipo I é a maior subfamília de citocinas, compreendendo mais de 20 membros. Os genes que codificam IFNs tipo I estão localizados no cromossomo 9. O

mecanismo de ação dos IFNs tipo I dá-se pela transdução de sinalização celular através do receptor IFN- $\alpha$  /  $\beta$ , formado por IFNAR1 e IFNAR2. Com a ligação ao receptor, as quinases JAK1 e Tyk2 são ativadas, induzindo a formação do complexo de transcrição do fator 3 do gene (ISGF3). Independentemente do receptor específico que ativam, IFN resulta em grande complexidade de seus efeitos na função celular e suas contribuições para a regulação da resposta imune. Em razão da qual, IFNs tipo I parecem possuir habilidades antitumorais intrínsecas (JORGOVANOVIC *et al.*, 2020; MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020). Uma compreensão do papel dos genes estimulados por IFN (ISGs) no controle de infecções virais e outras doenças é necessária (LIU, JIADI *et al.*, 2018; JORGOVANOVIC *et al.*, 2020; MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020).

Já IFN- $\gamma$  é o único membro da família IFN tipo II, este se diferenciando na estrutura e no receptor dos demais membros do IFN tipo I, porém apresentando mesma habilidade funcional na resposta imunológica antiviral. (CHEN *et al.*, 2015; MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020).

IFN- $\gamma$  é uma proteína codificada pelo gene IFNG, localizado no cromossomo 12, composta de duas cadeias polipeptídicas. IFN- $\gamma$  apresenta-se em três frações com massa molecular diferente. Uma fração representa a forma livre ativa de IFN- $\gamma$ , enquanto as outras duas são consideradas moléculas IFN- $\gamma$  ligadas. A proteína sintetizada é glicosilada nos terminais amino, onde o nível de glicosilação determinará o peso final das frações (CONLON *et al.*, 2019; JORGOVANOVIC *et al.*, 2020).

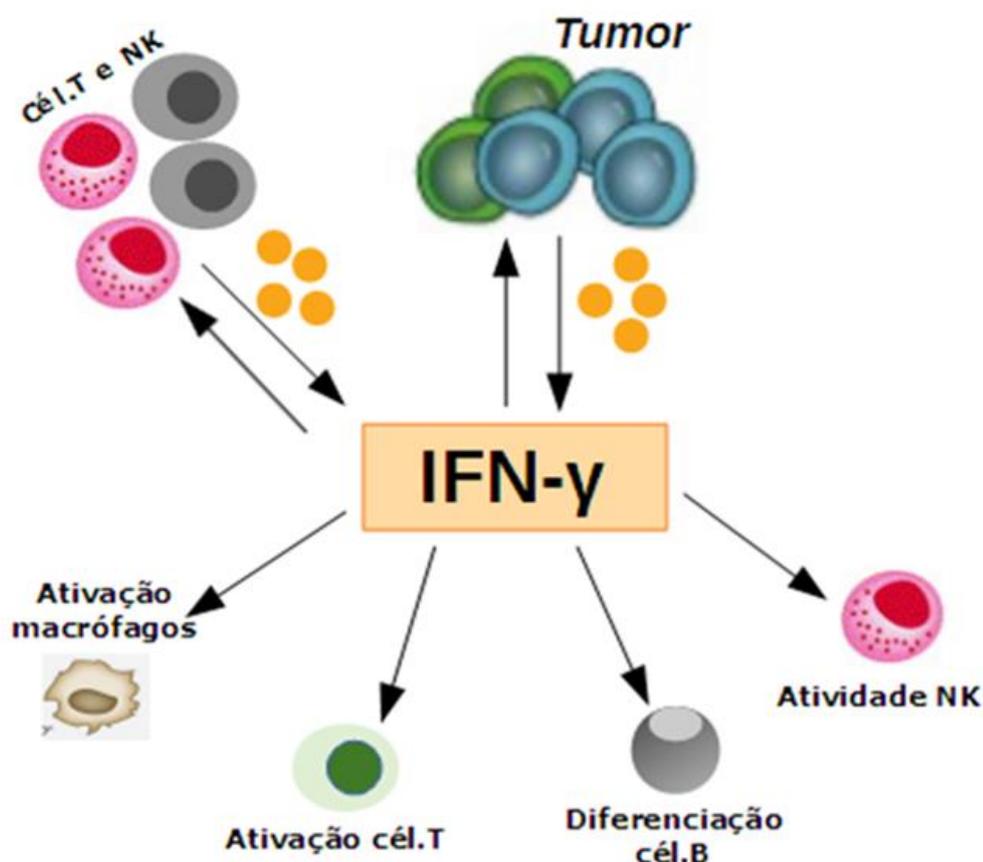
A sinalização de IFN- $\gamma$  é rigidamente controlada por meio da transcrição de genes reguladores. O mecanismo de ação de IFN- $\gamma$  dá-se pela interação com seu receptor formado por IFNGR1 e IFNGR2, levando à ativação de JAK1 e JAK2 e indução subsequente da fosforilação do ativador de transcrição STAT1. Com a ativação deste, haverá formação de homodímeros, que são conhecidos como fatores ativados por interferon gama (GAF), com objetivo de translocar para o núcleo e ativar a transcrição de um conjunto de ISGs, assim como outras vias de sinalização como o NF- $\kappa$ B. (LASFAR *et al.*, 2016; KULLING *et al.*, 2018; MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020).

O IFN tipo III foi descoberto recentemente e inclui quatro genes IFN-  $\lambda$  em humanos que estão agrupados no cromossomo 19 e codificam as proteínas IFN-  $\lambda$  1, IFN-  $\lambda$  2, IFN- $\lambda$ 3 e IFN-  $\lambda$ 4 (LASFAR *et al.*,2011). A razão que o IFN tipo III é relacionado à IL-10 é devido os IFNs do tipo III usarem a cadeia específica do receptor IFN-  $\lambda$ R1 e IL-10R2, e a cadeia de receptor compartilhada por membros da família de citocinas IL-10, IL-22 e IL-26 (LASFAR *et al.*, 2016).

IFNs são os principais reguladores da resposta imune contra tumores. IFN- $\alpha$ , - $\beta$  e - $\gamma$  são capazes de regular positivamente a expressão de antígenos de superfície associados ao tumor via aumento de moléculas do complexo de histocompatibilidade classe I e classe II (MHC de classe I e classe II), aumentando assim a imunogenicidade das células tumorais e tornando-as mais vulneráveis à identificação e posterior destruição pelo sistema imunológico (CONLON *et al.*, 2019; MARTIN-HIJANO *et al.*, 2020)

Em um microambiente tumoral, células de imunidade inata e adaptativa produzem IFN- $\gamma$ . Duas principais produtoras de IFN- $\gamma$  são células natural killer (NK), ativando receptores inibitórios, e linfócitos T CD8 + citotóxicos (CTLs) (MOJIC *et al* 2018).

Estudos sobre os efeitos do IFN- $\gamma$  em vários tipos de câncer revelam seu extenso potencial antitumoral. Entre eles, o efeito mediado por IFN- $\gamma$  mais conhecido é o aumento da função citotóxica de células NK e linfócitos T citotóxicos como efetores potentes de respostas antitumorais. Principais atividades antitumorais elucidadas são: indução de apoptose, inibição da angiogênese e proliferação, diferenciação celular e regulação imunológica (LAZEAR *et al.*, 2015; KULLING *et al.*, 2018). (**Figura 9**).



**Figura 9:** Mecanismos de ação envolvidos no mecanismo de ação do IFN-  $\gamma$ . Adaptado de: Lazear *et al.*, 2015; Mojic *et al.*, 2018.

De acordo com Mojic 2018 e Martin-Hijano 2020, o IFN- $\gamma$  pode, em paralelo, agir facilitando a iniciação do tumor e, subsequentemente, promover mudanças no fenótipo celular favorecendo o crescimento tumoral através de dano ao DNA, angiogênese e/ou proliferação celular.

Os efeitos do IFN-  $\gamma$  na hematopoese, avaliados principalmente por ensaios *in vitro*, foram relatados como estimuladores e supressivos sob várias circunstâncias. IFN-  $\gamma$  foi relatado como estímulo à mielopoese sob condições infecciosas específicas. Porém, em contraste, o papel do IFN-  $\gamma$  na doença hematopoética parece ser principalmente de aspecto negativo, como na neutropenia crônica, anemia de doenças crônicas e anemia aplástica, nas quais o IFN-  $\gamma$  suprime a diferenciação

das células tronco hematopoéticas – HSC, prejudicando assim hematopoese normal (MORALES-MANTILLA *et al.*, 2018).

#### 1.3.4 VEGF

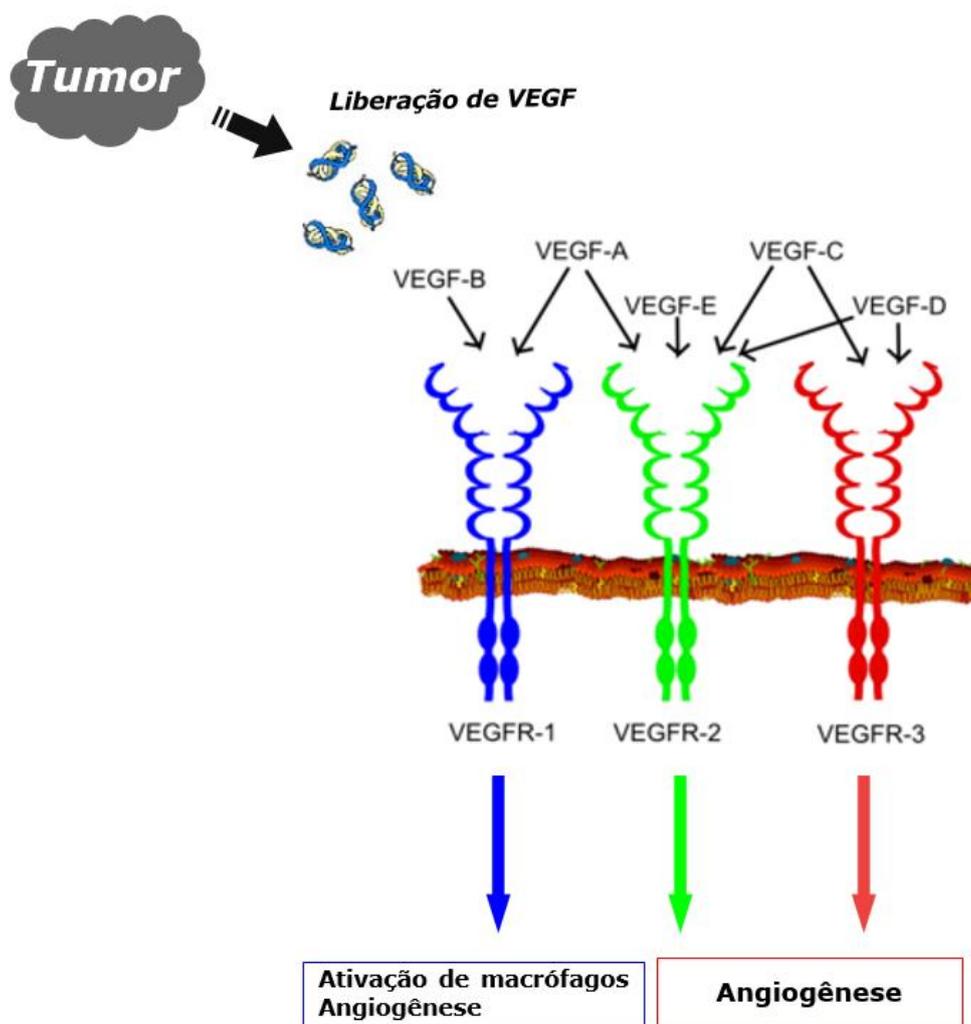
O desenvolvimento de um suprimento neovascular ou angiogênese desempenha papéis homeostáticos cruciais, uma vez que os vasos sanguíneos transportam nutrientes para tecidos e órgãos e removem produtos do catabolismo (APTE *et al.*, 2019).

Na verdade, a angiogênese é fundamental tanto para um processo fisiológico quanto para um processo patológico através do crescimento descontrolado dos vasos sanguíneos, que pode promover ou facilitar o desenvolvimento, crescimento e metástases de tumores malignos ou outras inúmeras doenças como doenças vasculares (TABERNERO *et al.*, 2007; APTE *et al.*, 2019; ALBALAWI *et al.*, 2020). A angiogênese desordenada é uma das mais estudadas alterações genéticas no desenvolvimento do câncer (ALBALAWI *et al.*, 2020).

O gene VEGF está localizado no cromossomo 6p12-p21, e consiste em oito *exons* separados por sete *introns* para formar uma família de proteínas. Recentemente, a inibição da angiogênese demonstrou resultados clinicamente significativos em uma variedade de doenças malignas, incluindo câncer de mama e melanoma (ALBALAWI *et al.*, 2020; CECI *et al.*, 2020).

Uma expressão demasiada do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o mediador chave da angiogênese, está associada a um mau prognóstico no câncer. Descoberto, isolado e identificado há mais de 30 anos, o VEGF, além de seu papel na angiogênese, está envolvido na regulação de células hematopoéticas. Sua desregulação promove a proliferação tumoral e angiogênese (APTE *et al.*, 2019; XIONG *et al.*, 2021).

A família VEGF consiste em vários fatores estruturalmente relacionados além de VEGF-A, ou seja, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e fator de crescimento da placenta, todos contribuindo para a angiogênese e / ou linfangiogênese. VEGF-A é o membro mais bem caracterizado da família e o indutor mais potente da angiogênese tumoral conforme ilustrado na **figura 10** (KANTHOU *et al.*, 2018; APTE *et al.*, 2019).



**Figura 10:** Membros da família do VEGF e o papel das células tumorais na ativação dessas proteínas. Adaptado de: Tabernero 2007; Apte *et al.*, 2019. **Legenda:** VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; VEGFR: receptores de VEGF.

Sob condições patológicas, o VEGF é secretado por células tumorais na maioria dos cânceres e age nas células endoteliais dos vasos sanguíneos existentes para promover formação de novos vasos sanguíneos. A liberação de VEGF por células tumorais inicia o processo de angiogênese pela ativação de células endoteliais

e promovendo sua migração e, assim, aumentando a permeabilidade vascular (ALBALAWI *et al.*, 2020).

O VEGF livre se liga a dois receptores tirosina quinase relacionados, o receptor 1 do VEGF (Flt-1) e receptor 2 de VEGF (Flk-1 ou KDR). Ambos os receptores, VEGF1 e 2, têm um domínio extracelular composto por sete regiões semelhantes a imunoglobulinas que se ligam a VEGF, uma única região transmembrana, o qual promove a dimerização e a fosforilação de vários resíduos de tirosina que residem no domínio intracelular do receptor, desencadeando a ativação da angiogênese e as cascatas de sinalização (TABERNERO 2007; KANTHOU *et al.*, 2018).

Os efeitos do VEGF-A não se restringem à ativação de células endoteliais, uma vez que muitas células do microambiente tumoral incluindo células imunes, miofibroblastos, macrófagos também como as próprias células tumorais expressam receptores funcionais e respondem ao VEGF-A. O VEGF-A recruta células mielóides que se diferenciam em macrófagos e células precursoras endoteliais da medula óssea que são capazes de sustentar a angiogênese e o crescimento tumoral. (APTE *et al.*, 2019; CECI *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, tornou-se mais evidente que o VEGF desempenha um importante papel imunomodulador dentro do microambiente tumoral. Ceci, 2020 relata que níveis elevados plasmáticos de VEGF-A em pacientes com câncer de mama e colo-retal se correlacionaram com uma deficiência na maturação das células dendríticas (DCs), causando danos na diferenciação de células T efetoras e células NK.

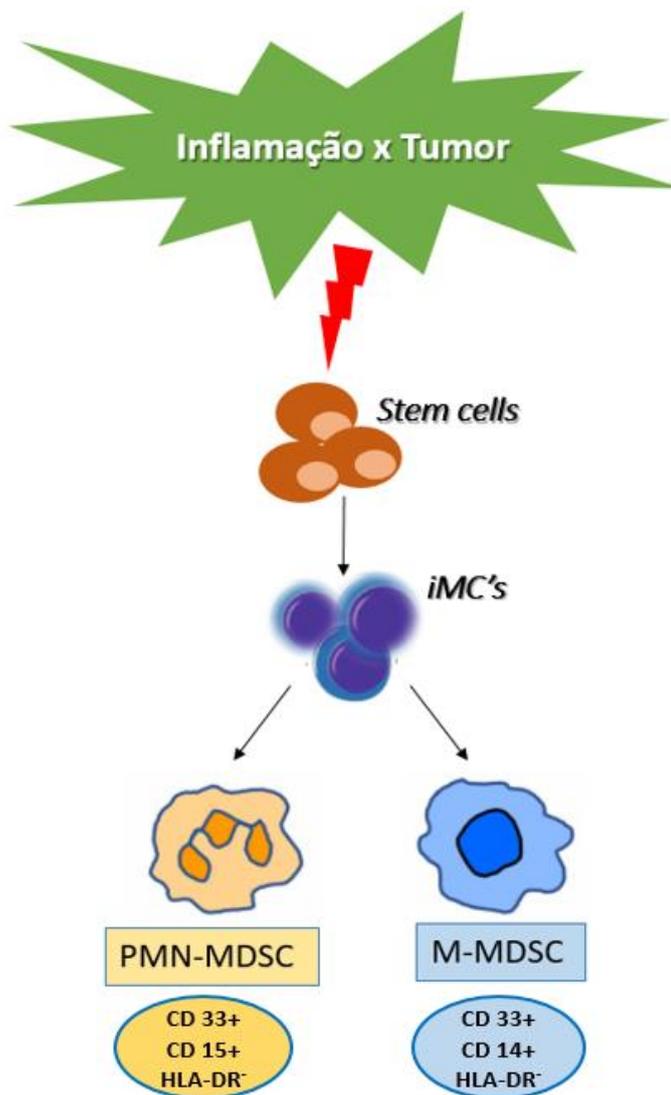
Em contrapartida, em algumas doenças como a Síndrome Mielodisplásica (SMD), o papel do VEGF na progressão ainda não foi bem esclarecido (CECI *et al.*, 2020; XIONG *et al.*, 2021).

#### 1.4 Células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC's)

O termo “células supressoras derivadas mielóides” (MDSC's) foi definido por Gabrilovich e cols 2007, ao descreverem uma população de células imunossupressoras de origem mielóide em distintos períodos de diferenciação, encontradas em pacientes com câncer. Sabe-se que essas MDSC's constituem um grupo de células mielóides progenitoras imaturas (iMC's) com características heterogêneas na atividade transcricional e diferenciação, com marcadores fenotípicos próprios, e na função celular, diferenciando-se em células imaturas mononucleares como as M-MDSC's e as polimorfonucleares como PMN-MDSC's (KUSMARTSEV et al, 2006; MARVEL, GABRILOVICH 2015). Em indivíduos saudáveis, as iMC's geradas na medula óssea são rapidamente diferenciadas nos granulócitos, macrófagos ou células dendríticas. A linhagem mielóide é expandida de acordo com as condições patológicas, favorecendo um mielopoese ineficaz. O microambiente tumoral (TME) sofre uma intensa influência de citocinas pró-inflamatórias, exercendo estas um papel crucial na diferenciação de MDSC's e prejudicando a maturação das células mielóides, conforme **figura 11**. Consequentemente, o estágio de diferenciação das MDSC's é análogo aos neutrófilos e monócitos, porém variando no tipo de marcador celular (GABRILOVICH *et al.*, 2007; GABRILOVICH, NAGARAJ 2009; UMANSKY V. *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2020).

A categorização das MDSCs em dois grupos deu-se por marcadores fenotípicos próprios, ressaltando que não há um marcador único das MSDCs (GABRILOVICH *et al.*, 2007; BRONTE *et al.*, 2015; OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU 2018). Em humanos, o fenótipo de MDSCs é mais complexo para determinar porque depende do tipo de câncer (NADAL *et al.*, 2018). MDSCs são, portanto, caracterizadas pela presença do marcador CD11b (marcador de monócito / macrófago) ou mais especificamente como células que expressam o marcador mielóide mais comum, o CD33 e pela ausência de antígeno leucocitário humano - relacionado ao antígeno D (HLA-DR) que é o MHC de classe II humana comumente expresso em células mielóides. PMN-MDSC é caracterizada pela expressão de CD15+ e M-MDSC pela expressão de CD14+. Ambos os tipos de MDSC's também expressam o marcador de mielóide geral, CD33+ e não possuem marcadores de

linhagem para linfócitos HLA-DR<sup>-</sup> (TCYGANOV et al., 2018; APODACA et al., 2019; LAW et al., 2020; WANG et al., 2020). MDSCs também foram identificados no sangue periférico humano. Em indivíduos saudáveis, células mielóides imaturas com o fenótipo descrito acima compreendem 0,5% das células mononucleares do sangue periférico (GABRILOVICH, NAGARAJ 2009). Portanto, MDSC's podem ser separadas de neutrófilos e monócitos com base em marcadores fenotípicos e densidade celular (VEGLIA et al., 2018).



**Figura 11:** Ilustração esquemática da geração das MDSC's. iMC's: células mielóides imaturas; PMN-MDSC: células supressoras derivadas mielóides polimorfonucleares; M-MDSC: células supressoras derivadas mielóides mononucleares e seus respectivos marcadores celulares. Adaptado: Bronte et al., 2015; Umansky V. et al, 2016; Tcyganov et al., 2018.

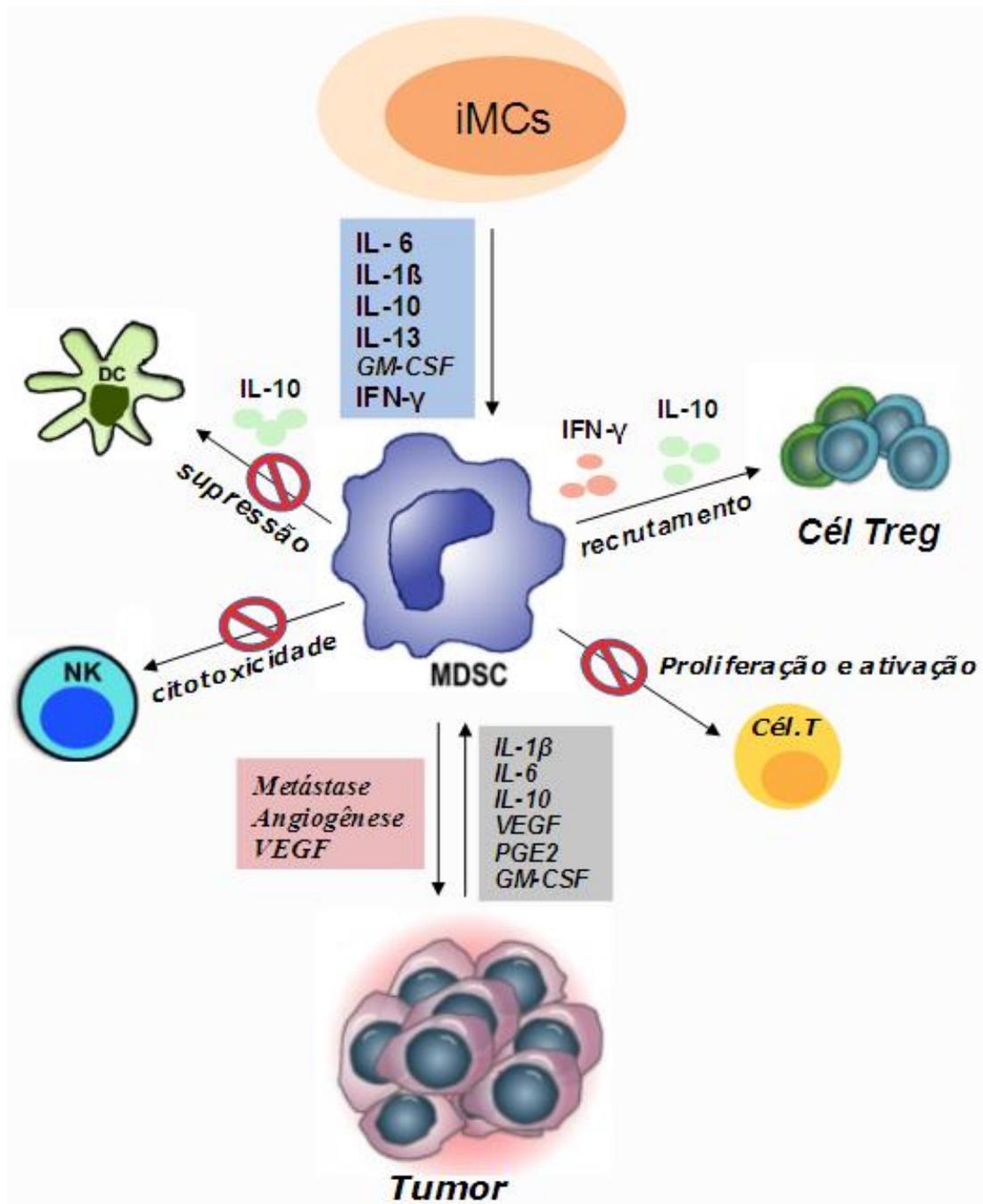
Essas células supressoras de linhagem mielóide foram amplamente ignoradas pelos imunologistas até o início de 2000, quando se tornaram evidentes seus mecanismos de supressão da imunidade antitumoral (TCYGANOV *et al.*, 2018). Em pacientes com câncer e em camundongos com tumores, as MDSCs vão se tornando cada vez mais reconhecidas como um papel crucial na resposta da imunidade antitumoral, principalmente devido ao seu acúmulo em praticamente todos os indivíduos com câncer (OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU 2018).

Sob condições fisiológicas, o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) induz a mielopoese e a diferenciação em granulócitos e macrófagos acontece pela indução do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), respectivamente. No câncer e em outras condições patológicas, há o predomínio de uma mielopoese deficiente causada pela produção demasiada desses fatores estimuladores de colônias, favorecendo a geração das MDSCs. Esses fatores de crescimento são cruciais para a sobrevivência das células mielóides (PARKER *et al.*, 2015; MILLRUD *et al.*, 2016). Desse modo, o acúmulo e a atividade das MDSCs ocorrem ao mesmo tempo das mesmas vias de diferenciação em neutrófilos e monócitos (VEGLIA *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2021; VEGLIA *et al.*, 2021). O VEGF, considerado como um fator de crescimento que atua na progressão tumoral através da neoangiogênese, é regulado pela taxa de hipóxia no microambiente tumoral. Estudos em pacientes com câncer de pulmão demonstraram que o VEGF é um quimioatraente para MDSC, e estudos em camundongos demonstraram que as MDSC produzem VEGF (OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU 2018; AGRATI *et al.*, 2019).

De acordo com Veglia *et al.*, 2021, as MDSCs atuam em duas áreas principais: no câncer, desempenhando uma função desfavorável e em doenças infecciosas, como a COVID-19, autoimunes e crônicas limitando a evolução da doença.

Um fator crucial para tornar as MDSC's funcionalmente ativas é a presença aumentada das iMC's na medula óssea (Z. SU *et al.*, 2016). São vários os mediadores que atuam dentro do microambiente tumoral (TME) com foco na proliferação e crescimento das iMC's, incluindo citocinas tais como: interleucina (IL-1, IL-6); fator de necrose tumoral alfa, (TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (como a CC-quimiocina ligante 2 (CCL2)),

prostaglandinas (prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>)) e fatores de crescimento (por exemplo, fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF)) (MILLRUD *et al.*, 2016; HAIST *et al.*, 2021). Por se tratar de um meio bastante complexo e onde há uma intensa interação entre células hospedeiras e tumorais, conforme o TME se desenvolve e evolui, células imunossupressoras, como células T regulatórias (Treg) e MDSCs são agregadas para inibir a proliferação e atividade de células NK; promovendo assim, a progressão tumoral e metástase (**Figura 12**). (OSTRAND-ROSENBERG; FENSELAU 2018; HAIST *et al.*, 2021). Sendo assim, é perceptível que as MDSC e as Treg são os principais componentes celulares do TME imunossupressor.



**Figura 12:** Representação esquemática do envolvimento dos fatores de crescimento e citocinas na produção e ativação das células MDSC's. Adaptado: Gabitass et al., 2011; Kong et al., 2013; Millrud et al., 2016; Ostrand-Rosenberg et al., 2018;; Haist et al., 2021. **Legenda:** iMCs: células mielóides imaturas; MDSC: células supressoras derivadas da linhagem mielóides; IL: Interleucinas; GM-CSF: fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos; IFN- $\gamma$ : interferon  $\gamma$ ; NK: células *natural killer*; PGE2: prostaglandina.

A principal característica funcional das MDSCs é imunossupressão, sendo uma propriedade comum em diversas patologias tais como: infecções bacterianas e parasitárias, inflamação aguda e crônica, mas particularmente têm sido encontradas em diversos tipos de tumores sólidos (GABRILOVICH et al, 2008; VEGLIA *et al.*, 2018). Portanto, a presença da mielopoese ineficaz, favorecerá o acúmulo dessas MDSC's resultando em uma atividade imunossupressora. Devido à produção de citocinas imunossupressoras, bloqueiam metabolicamente as respostas de linfócitos T citotóxicos pelo sequestro de aminoácidos como arginina, triptofano e cisteína. Esse último é essencial na ativação e proliferação de células T (LAW et al., 2020). A presença de MDSCs dentro de tumores mostrou ser dependente de IFN- $\gamma$  para suprimir as respostas das células T efetoras antitumorais (MOJIC 2018).

Assim, as células imunossupressoras dentro do TME tornaram-se um importante alvo para melhorar a eficácia da imunoterapia, e várias estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas nos últimos anos (LAW 2020).

### 1.4.1 SMD e as células MDSC's

Um equilíbrio entre as citocinas no microambiente medular é necessário para a regulação da hematopoese. Na SMD uma diferença no perfil inflamatório entre pacientes com SMD de baixo e alto risco é descrita (MATOS et al., 2016; BARREYRO et al., 2018; LV *et al.*, 2019). Na SMD, a patogênese e a progressão da doença são influenciadas pelas alterações relacionadas à idade, pelo microambiente medular e seu meio inflamatório (BANERJEE et al., 2019; MATOS et al., 2021).

É limitado o estudo sobre MDSCs em doenças hematológicas como, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) e em SMD. (PALUMBO *et al.*, 2020). Porém, apesar de poucos estudos na SMD em particular, sabe-se que as MDSCs são agentes efectoras de citopenias, particularmente no grupo de pacientes de baixo risco. (LV *et al.*, 2019; SALLMAN, LIST 2019).

Segundo Sallman em 2019 e Syed et al., em 2020, as MDSCs secretam citocinas anti-inflamatórias para reduzir a proliferação de células T efectoras e contribuir significativamente para a desregulação do sistema imunológico em pacientes com SMD. Além disso, essas células interagem com outras linhagens de células imunes, incluindo células T, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer*.

Os mecanismos necessários à geração de MDSCs permanecem ainda desconhecidos. É provável que as MDSCs surjam em condições inflamatórias quando há um aumento da demanda por células mielóides através da mielopoese ineficaz; por conseguinte há uma expansão das células imaturas na medula óssea de onde migram para o sangue periférico, sendo bloqueada sua diferenciação e finalmente, transformando-se em MDSCs funcionalmente ativas (BIZYMI et al., 2019).

A detecção de citocinas relacionadas com as MDSC's pode ajudar a avaliar os mecanismos de ativação, proliferação, inibição de MDSC's e assim, correlacionar com a progressão da SMD.

Porém, devido à imensa complexidade existente entre o sistema imunológico, o microambiente medular e a grande heterogeneidade da doença, ainda existem muitas perguntas sem resposta sobre os principais mediadores inflamatórios envolvidos e as células MDSC's para uma melhor compreensão sobre a patogênese e identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

## 2. JUSTIFICATIVA

As síndromes mielodisplásicas são um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por uma displasia medular, uma hematopoese ineficaz e uma propensão para o desenvolvimento de uma leucemia. A patogênese desta doença depende da interação entre células hematopoéticas e seu microambiente medular. Células inflamatórias e seus mediadores são constituintes do microambiente tumoral e estão implicadas na patogênese e progressão da doença.

O papel das MDSC's na supressão do sistema imunológico foi demonstrado em muitos tumores sólidos e em algumas doenças hematológicas malignas. O acúmulo dessas células regula negativamente a vigilância imunológica e a imunidade anti-tumoral.

A caracterização das MDSC e o estudo de sua relação com alguns mediadores inflamatórios em pacientes portadores de síndromes mielodisplásicas se propõe a esclarecer seu papel na patogênese da doença e abrir perspectivas para o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar a expressão das células supressoras derivadas da linhagem mielóide (MDSC's) e correlacioná-las com os níveis séricos de IL-10, IL-13, VEGF, IFN- $\gamma$  em pacientes adultos portadores de SMD acompanhados no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC).

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Quantificar os níveis séricos de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF nos pacientes portadores de SMD;
- Avaliar a expressão das células MDSC's em sangue periférico;
- Quantificar a população de células PMN-MDSC's e M-MDSC's;
- Investigar a associação entre as interleucinas dosadas e a expressão das MDSC's;
- Investigar a associação entre o VEGF e a expressão das MDSC's;
- Avaliar a associação da expressão destas células com os grupos de estratificação de risco da SMD e as variáveis clínicas.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Casuística**

Trata-se de um estudo observacional transversal realizado no período de 2017 a 2021 que incluiu pacientes adultos com diagnóstico confirmado de SMD acompanhados no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e indivíduos voluntários sadios como grupo controle.

### **4.2 Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil (Número do processo: 2.812.259). (ANEXO A). Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

### **4.3. Critérios de inclusão**

#### **Pacientes com SMD**

Foram incluídos pacientes adultos com diagnóstico confirmado de SMD, acompanhados em ambulatório especializado de SMD no HUWC que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentado no APÊNDICE A.

#### **Grupo controle**

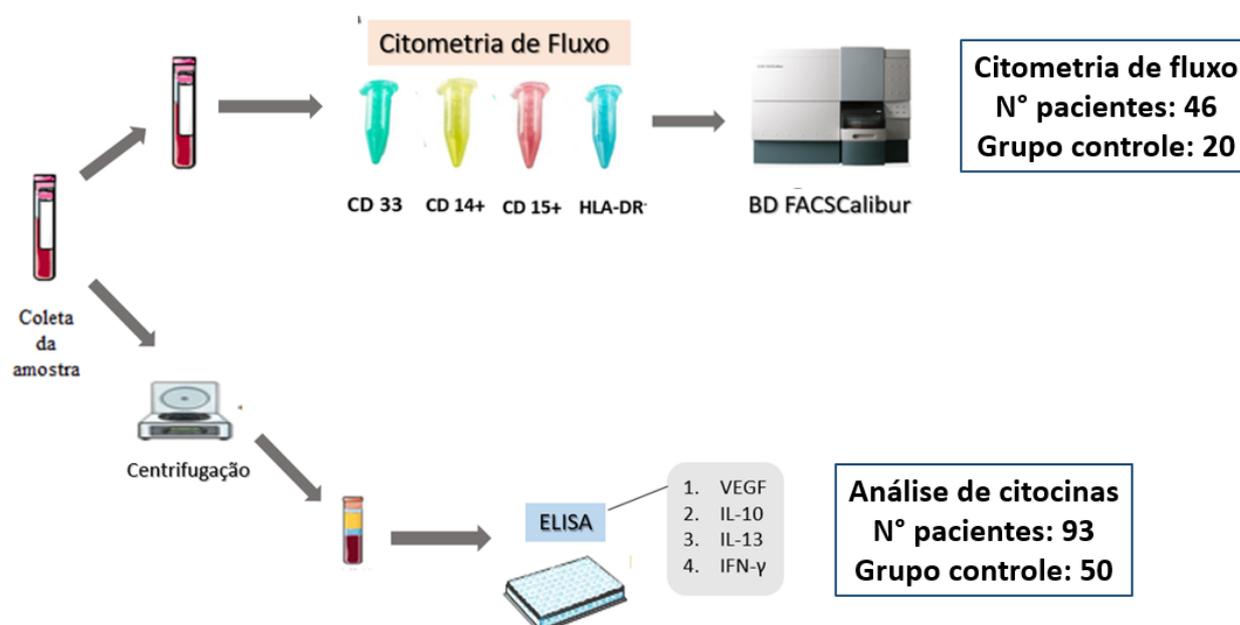
Foram incluídos indivíduos saudáveis na faixa etária acima de 45 anos, que aceitaram participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o TCLE.

#### 4.4. Coleta e processamento de amostras

Os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes com SMD foram coletados a partir dos prontuários médicos e utilizou-se como ferramenta um formulário próprio (APÊNDICE).

Para as análises de citocinas foram coletados 8 mL de sangue periférico de cada indivíduo, em dois tubos Vacutainer® contendo EDTA. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas, sob refrigeração, ao Laboratório de Citogenômica do Câncer, da Universidade Federal do Ceará, onde foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos, realizada a alíquota do plasma e, posteriormente, este foi armazenado em freezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até a realização do ensaio imunoenzimático ELISA e o resultado foi expresso em pg/mL.

Para a expressão das células MDSC's, as amostras foram, inicialmente, processadas pelo Cell-Dyn Ruby para quantificar número total de leucócitos e em seguida, as amostras eram encaminhadas imediatamente ao Laboratório de Citogenômica do Câncer para processamento das amostras no Citômetro de fluxo conforme ilustrado na **figura 13**.



**Figura 13:** Ilustração esquemática do processamento de amostras.

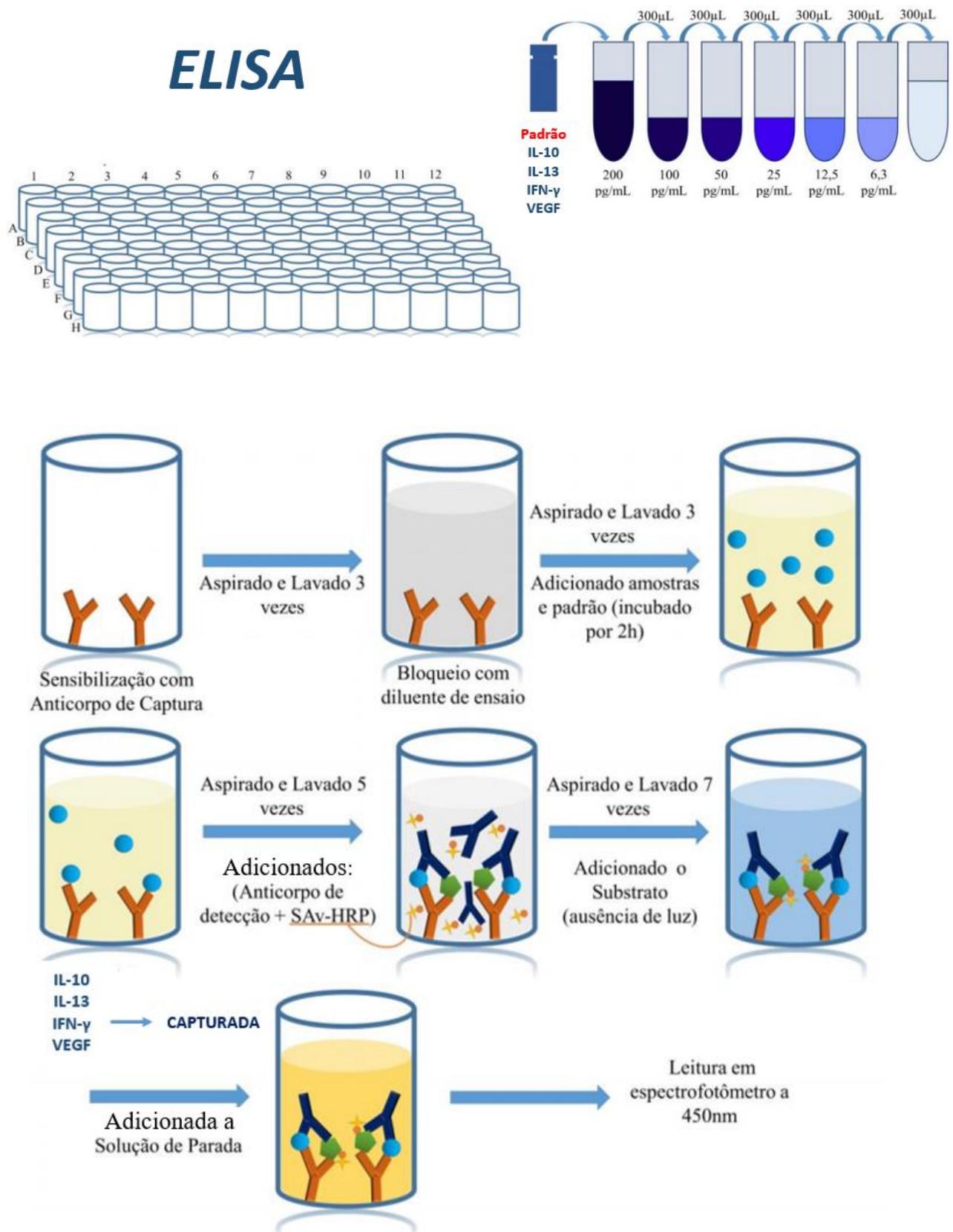
**Fonte:** próprio autor.

#### 4.4.1 Determinação de interleucinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

As citocinas (IL-10, IL-13, VEGF e IFN- $\gamma$ ) foram dosadas no plasma dos indivíduos através do método de ELISA sanduíche, utilizando-se kits *Invitrogen* ELISA (ThermoFisher) e seguindo as orientações do fabricante (**Figura 14**). Estas dosagens foram realizadas no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA), da Universidade Federal do Ceará.

Foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços, já sensibilizadas previamente com anticorpo de captura monoclonal anti-IL-10, anti-IL-13, anti-VEGF e anti-IFN- $\gamma$  diluído em PBS (*Phosphate – Buffered saline*). Após esse período os poços foram lavados 3 vezes com 400 $\mu$ L do tampão de lavagem e secos vertendo em papel absorvente. Posteriormente, foi realizado o bloqueio da placa através da adição de 300  $\mu$ L, em cada poço, de diluente de ensaio, seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, a placa foi lavada conforme descrito anteriormente. Foram adicionados aos diferentes poços da placa 100  $\mu$ L de cada concentração do padrão, do plasma dos pacientes e grupo controle, cobertos por fita adesiva e incubados por 2h à temperatura ambiente. Após este período, foram realizadas 3 lavagens e em seguida adicionados 100 $\mu$ L da diluição de trabalho da Streptavidin-HRP. A placa foi selada e incubada por 20 min em uma sala escura e à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente aspirada e lavada por 3 vezes. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L do substrato enzimático, constituído por soluções estabilizadoras de peróxido de hidrogênio e de tetrametilbenzidina (TMB). A placa foi incubada no escuro à temperatura ambiente por 20 min e então adicionaram-se 50  $\mu$ L de solução de parada a cada poço. A leitura da placa foi realizada em leitor de ELISA utilizando filtro de comprimento de onda de 450 nm.

**Figura 14:** Ilustração esquemática da técnica de ELISA.



#### 4.4.2 Imunofenotipagem – Análise das MDSC's

A imunofenotipagem por citometria de fluxo teve por objetivo identificar a presença das células MDSC's em SP. Foi utilizado um painel com anticorpos monoclonais (AcMo) pré-definido, montado de maneira a se ter 1 AcMo por tubo, conjugado em cada fluorocromo específico. O painel escolhido marca antígenos de membrana e utilizado da marca Becton-Dickinson®. Os AcMos utilizados, bem como seus respectivos fluorocromos conjugados encontram-se detalhados na **tabela 5**.

**Tabela 5** - Painel de anticorpos monoclonais para MDSC's.

Painel de anticorpo monoclonal para MDSC's	
Tubo 1	Gamma
Tubo 2	CD 14+ PE
Tubo 3	CD 15+ FITC
Tubo 4	CD 33+ APC
Tubo 5	HLA – DR <sup>-low</sup> PerCP
Tubo 6	CD 14+ / CD 15- / HLA-DR <sup>-low</sup> / CD 33+
Tubo 7	CD 14- / CD 15+ / HLA-DR <sup>-low</sup> / CD 33+

**Legenda:** Gamma: Controle negativo sem AcMos; PE: FITC: (isotiocianato de fluoresceína); **Fonte:** elaborado pelo autor.

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 e SP coletada em tubos com EDTA; adicionados a cada tubo 5µL dos respectivos AcMos, com concentrações previamente ajustadas, em temperatura ambiente e foi incubada por 15 minutos em câmara escura; após esse prazo, adicionaram-se em cada tubo 2mL de solução de lise e incubado novamente por 10 minutos; após termino de incubação, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 1.500 rpm; logo após remover o sobrenadante e foram adicionados a cada tubo

2mL de solução PBS a 1X e homogeneizado; esta etapa foi repetida por mais duas vezes; o pellet foi ressuspensionado com 300µL de solução de PBS mais soro fisiológico. Todas as aquisições foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur™ e as análises realizadas utilizando o software Cell-Quest (Becton-Dickinson®). Para todos os tubos um total de 50.000 eventos foram adquiridos e considerou-se um cut-off de 20% para determinação de positividade para todos os AcMos que compunham o painel.

#### 4.5 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Idade (categorizada de acordo como IPSS-R): <75 anos e ≥75 anos;
- Quanto à classificação da OMS (2016): SMD com displasia em única linhagem (SMD-DU), SMD com displasia em múltiplas linhagens (SMD-DM), SMD com sideroblastos em anel com displasia em única linhagem (SMD-SA-DU) SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens (SMD-SA-DM), SMD com excesso de blastos 1 (SMD-EB-1), SMD com excesso de blastos 2 (SMD-EB-2), SMD com del 5q isolada, SMD não classificável (SMD-U)
- Celularidade da medula óssea: hipocelular, normocelular ou hipercelular;
- Níveis séricos de ferritina: <500ng/mL e ≥500ng/mL
- Percentual de blastos: <5% (normal) e ≥5% (excesso de blastos).
- Cariótipo: normal ou alterado;
- Concentração de hemoglobina (Hb) categorizada: <8g/dL e ≥8g/dL;
- Contagem de neutrófilos de acordo com o IPSS-R: ≥800/mm<sup>3</sup> e <800/mm<sup>3</sup>
- Contagem de plaquetas de acordo com o IPSS-R: ≥100.000/ mm<sup>3</sup> e <100.000/ mm<sup>3</sup>;
- Número de citopenias no sangue periférico de acordo com o IPSS-R: 1 citopenia, 2 citopenias e 3 citopenias;
- Grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005).

#### 4.6 Análise estatística

Os níveis de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF e a expressão das células MDSC's foram expressos como mediana e variação (mínimo e máximo). O teste Many-Whitney foi utilizado para analisar a influência das Interleucinas e a expressão das células MDSC's nas variáveis clínico-patológicas avaliadas. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para obtenção dos valores de r-quadrado ( $r^2$ ). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 6 (software GraphPad Prism, La Jolla, CA, EUA) e SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). O nível de probabilidade (valor-p)  $<0,05$  foi adotado como critério de significância.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização dos pacientes

Ao fim do prazo estimado para coleta de amostras, foram pré-selecionados nesse estudo 93 pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio e 50 voluntários sadios para o grupo controle.

Dentre os pacientes, observou-se que 44,1% eram do sexo masculino e 55,9% do sexo feminino (**Tabela 6**). A média de idade nesse grupo foi de 72,4 anos (mediana: 74 anos / mínimo: 44 anos e máximo: 98 anos) com predomínio de pacientes com idade  $\geq 60$  anos em 80,6% (75) dos casos avaliados. Enquanto que no grupo controle foi observada uma média de idade de 61,4 anos (mediana: 55 anos / mínimo: 45 anos e máximo: 71 anos) e uma predominância de 64% do sexo masculino.

**Tabela 6:** Caracterização descritiva dos pacientes com SMD

Variáveis	N	%
<b>Grupos</b>		
Controle	50	35,0
SMD	93	65,0
<b>Sexo</b>		
Masculino	41	44,1
Feminino	52	55,9
<b>Idade</b>		
<60 anos	18	19,4
$\geq 60$ anos	75	80,6

Quanto aos achados no sangue periférico dos pacientes com SMD, foi observado que 25,8% dos pacientes apresentaram Hb  $< 8$ g/dL, e 74,2% dos pacientes apresentaram valores de Hb  $\geq 8$ g/dL. Com relação à contagem de neutrófilos, 76 pacientes (81,7%) tiveram contagem  $\geq 800/\text{mm}^3$ , e 17 pacientes (18,3%) tiveram  $< 800/\text{mm}^3$ . (**Tabela 7**)

A contagem de plaquetas foi igual ou superior a  $100.000/\text{mm}^3$  em 51 pacientes (54,8%) e inferior a  $100.000/\text{mm}^3$  em 42 pacientes (45,2%).

Em relação à presença de citopenias ao hemograma: 35,5% dos pacientes apresentaram duas citopenias, 34,4% apenas uma citopenia e 30,1% apresentaram três citopenias.

**Tabela 7:** Caracterização das variáveis laboratoriais em pacientes com SMD.

Variáveis	N	%
<b>Hemoglobina</b>		
<8g/dL	24	25,8
≥8g/dL	69	74,2
<b>Neutrófilos</b>		
<800/ $\text{mm}^3$	17	18,3
≥800/ $\text{mm}^3$	76	81,7
<b>Plaquetas</b>		
<100.000/ $\text{mm}^3$	42	45,2
≥100.000/ $\text{mm}^3$	51	54,8
<b>Citopenias</b>		
1	32	34,4
2	33	35,5
3	28	30,1

Avaliando a presença de displasias no mielograma: 45,2% dos casos avaliados apresentaram duas displasias, seguido de 27 casos (29%) com as três displasias. Dentre as displasias apresentadas, observou-se predominância de diseritropoese e dismegapoese representando quase 80 % dos casos analisados.

Ao mielograma, identificou-se que 22 pacientes (23,7%) apresentaram percentagem maior ou igual a 5% de blastos na medula óssea ao diagnóstico, enquanto 71 (76,3%) pacientes apresentaram percentagem menor que 5%.

À biópsia da medula óssea foi observado que 59,1% dos pacientes apresentaram medula óssea hiper celular, 32,3% medula óssea normocelular e 8,6% medula hipocelular. (**Tabela 8**).

**Tabela 8:** Caracterização descritiva das variáveis clínicas relacionadas aos achados da medula óssea em pacientes com SMD.

<b>Celularidade da Medula Óssea</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Hipocelular	8	8,6
Hipercelular	55	59,1
Normocelular	30	32,3
<b>Cariótipo</b>		
Normal	39	56,5
Alterado	30	43,5
* Não Disponível	24	
<b>Percentagens de blastos</b>		
≥5%	22	23,7
<5%	71	76,3

De acordo com a classificação OMS (2016) foram incluídos 37 pacientes (39,8%) com SMD com displasia em multilinhagem, 23 pacientes (24,7%) com SMD com excesso de blastos, 15 pacientes (16,1%) com SMD com sideroblastos em anel em múltipla linhagem, 3 pacientes (3,2%) com SMD com sideroblastos em anel em única linhagem, 11 pacientes (11,8%) classificados como SMD com displasia em única linhagem, 2 pacientes (2,2%) com SMD com deleção 5q isolada e em seguida, 2 pacientes (2,2%) estratificados como SMD inclassificável com 1% de blastos. Dentro da categorização da OMS, foi observado uma predominância das formas iniciais da SMD com 70 casos (75,3%), seguido das formas avançadas com 23 casos (24,7%) conforme da **tabela 9**.

**Tabela 9:** Estratificação dos pacientes com SMD quanto à classificação OMS.

<b>Classificação OMS (2016)</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
SMD com displasia única linhagem	11	11,8
SMD com sideroblastos em anel em única linhagem	3	3,2
SMD com sideroblastos em anel em múltipla linhagem	15	16,1
SMD com displasia multilinhagem	37	39,8
SMD com excesso de blastos	23	24,7
SMD com del (5q) isolada	2	2,2
SMD inclassificável com 1% blastos	2	2,2
<b>Classificação OMS(2016), categorizada</b>		
Formais iniciais	70	75,3
Formas avançadas	23	24,7

Dentre os 69 pacientes com resultado citogenético disponível, identificou-se que 39 pacientes (56,5%) apresentaram cariótipo normal e 30 (43,5%) apresentaram cariótipo alterado.

Quanto à estratificação de risco de acordo com o IPSS-R, verificou-se que 10 pacientes (14,9%) foram classificados como de muito bom prognóstico; 27 (40,3%) como bom prognóstico; 3 pacientes (4,5%) como prognóstico intermediário, 23 (34,3%) como alto risco e 4 pacientes (6%) com muito alto risco. (**Tabela 10**).

**Tabela 10:** Estratificação dos pacientes com SMD quanto ao grupo de risco pelo IPSS-R.

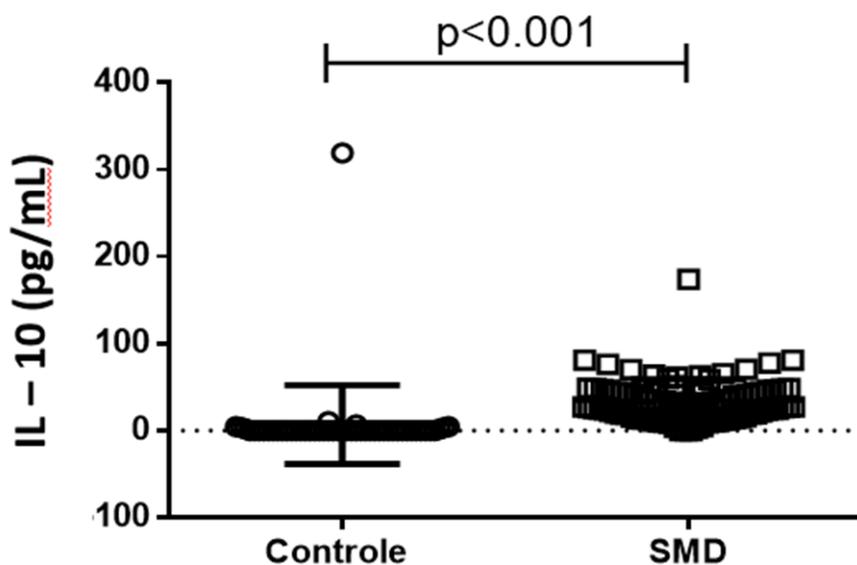
<b>Classificação</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>IPSS-R</b>		
Muito Baixo	10	14,9
Baixo	27	40,3
Intermediário	3	4,5
Alto	23	34,3
Muito Alto	4	6,0
* Não disponível	33	
<b>IPSS-R (Categorizado)</b>		
Muito Baixo + Baixo + Intermediário	42	62,7
Alto + Muito Alto	25	37,3
<b>Ferritina</b>		
≥500ng/mL	26	55,3
<500ng/mL	21	44,7
* Não disponível	46	
<b>Dependência Transfusional</b>		
Sim	28	34,6
Não	53	65,4
* Não disponível	12	

Analisando os pacientes com dependência transfusional, verificou-se que apenas 34,6% dos pacientes eram dependentes de transfusão sanguínea dos quais 55,3% apresentavam sobrecarga de ferro com ferritina acima de 500ng/mL.

## 5.2 Análise da IL-10

Em nosso estudo, os pacientes com SMD mostraram níveis séricos de IL-10 significativamente mais elevados com a média de  $34,1811 \pm 24,5911$  ng/mL do que o grupo controle com média de  $7,1905 \pm 45,1169$  ng/mL. ( $p < 0,001$ ). (**Gráfico 1**).

**Gráfico 1:** Análise de IL-10 em pacientes com SMD versus grupo controle



Associação entre níveis de IL-10 em pacientes com SMD x grupo controle ( $34,18 \pm 24,59$  versus  $0 \pm 319,5$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p < 0.001$ .

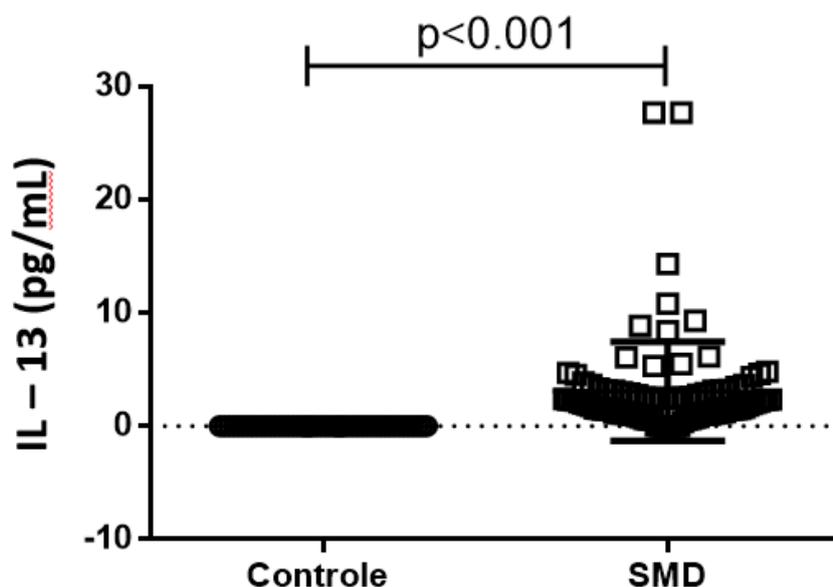
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foi encontrada associação significativa entre os níveis de IL-10 e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $p=0.149$ ); hemoglobina ( $p=0.595$ ); número de neutrófilos ( $p=0.911$ ); número de plaquetas ( $p=0.729$ ); celularidade da medula óssea ( $p=0.075$ ); número de displasias ( $p=0.693$ ); quanto ao cariótipo ( $p=0.061$ ); quanto à classificação da OMS ( $0.668$ ) e quanto ao IPSS-R ( $p=0.711$ ) (**TABELA 11**).

### 5.3 Análise da IL-13

Em nosso estudo os pacientes com SMD mostraram níveis séricos de IL-13 significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). (Gráfico 2)

**Gráfico 2:** Análise de IL-13 em pacientes com SMD versus grupo controle



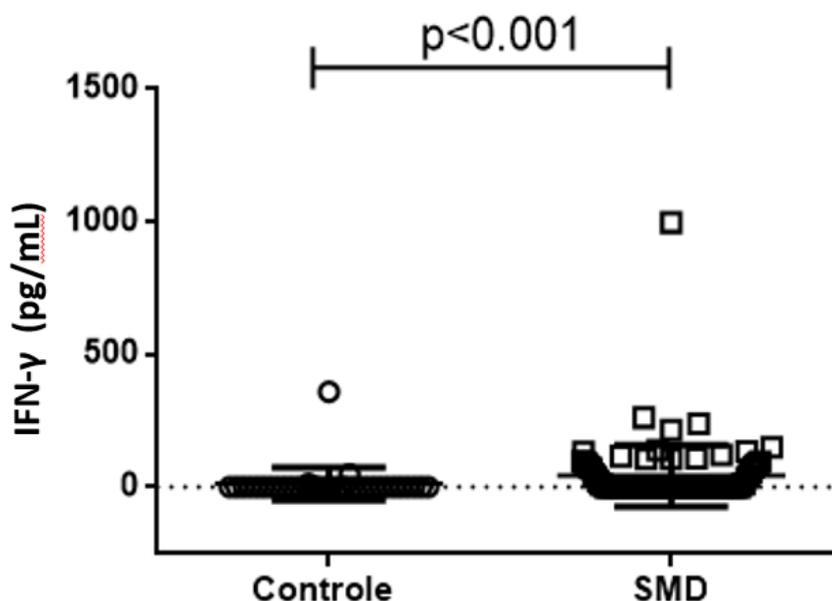
Associação entre níveis de IL-13 em pacientes com SMD x grupo controle ( $3,09 \pm 4,37$  versus  $0,0 \pm 0,0$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p < 0,001$ . Fonte: elaborado pelo autor.

Não foi encontrada associação significativa entre os níveis de IL-13 e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $p=0,175$ ); hemoglobina ( $p=0,084$ ); número de neutrófilos ( $p=0,371$ ); número de plaquetas ( $p=0,126$ ); celularidade da medula óssea ( $p=0,739$ ); número de displasias ( $p=0,584$ ); quanto ao cariótipo ( $p=0,654$ ); quanto à classificação da OMS ( $p=0,171$ ) e quanto ao IPSS-R ( $p=0,384$ ). (TABELA 11).

## 5.4 Análise do IFN- $\gamma$

Em nosso estudo os pacientes com SMD mostraram níveis séricos de IFN- $\gamma$  significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) conforme ilustrado no **gráfico 3**.

**Gráfico 3:** Análise de IFN- $\gamma$  em pacientes com SMD versus grupo controle



Associação entre níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes com SMD x grupo controle ( $41,95 \pm 115,55$  versus  $11,65 \pm 60,18$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p < 0.001$ .

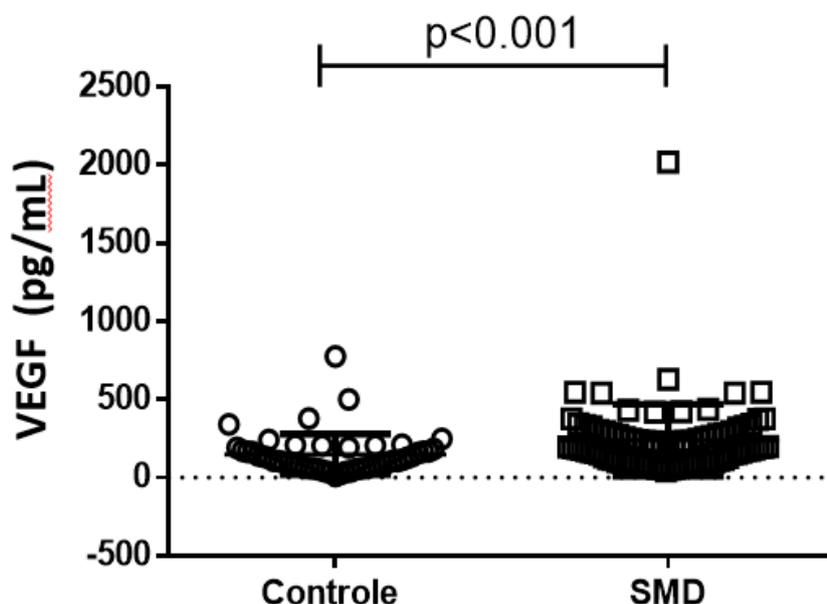
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foi encontrada associação significativa entre os níveis de INF- $\gamma$  e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $p=0.647$ ); hemoglobina ( $p=0.958$ ); número de neutrófilos ( $p=0.943$ ); número de plaquetas ( $p=0.495$ ); celularidade da medula óssea ( $p=0.678$ ); número de displasias ( $p=0.659$ ); quanto ao cariótipo ( $p= 0.932$ ); quanto à classificação da OMS ( $p=0.324$ ) e quanto ao IPSS-R ( $p= 0.398$ ). (**TABELA 11**).

### 5.5 Análise do VEGF

Em nosso estudo os pacientes com SMD mostraram níveis séricos de VEGF significativamente mais elevados quando comparados ao grupo controle ( $p < 0,001$ ) conforme ilustrado no **gráfico 4**.

**Gráfico 4:** Análise de VEGF em pacientes com SMD versus grupo controle



Associação entre níveis de VEGF em pacientes com SMD x grupo controle ( $238,44 \pm 230,87$  versus  $148,66 \pm 129,79$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p < 0,001$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foi encontrada associação significativa entre os níveis de VEGF e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $p = 0,266$ ); hemoglobina ( $p = 0,806$ ); número de plaquetas ( $p = 0,672$ ). (**TABELA 11**).

**Tabela 11:** Caracterização das variáveis clínicas com as interleucinas IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF em pacientes com SMD e grupo controle.

Variáveis	IL10			IL13			IFNy			VEGF		
	Média	Mínimo-Máximo	p	Média	Mínimo-Máximo	p	Média	Mínimo - Máximo	p	Média	Mínimo - Máximo	p
<b>Grupos</b>												
Controle	7,1905±45,1169	0,0000-319,5054	<b>&lt;0.001</b>	0,00±0,00	0,00-0,00	<b>&lt;0.001</b>	11,65±60,18	0,00-359,46	<b>0.003</b>	148,66±129,79	12,36-775,95	<b>&lt;0.001</b>
SMD	34,1811±24,591 1	0,0000-174,1420		3,09±4,37	0,00-27,69		41,95±115,55	0,00-995,88		238,44±230,87	42,75-2018,54	
<b>Sexo</b>												
Masculino	34,0117±19,767 5	0,0000-77,8150	0.564	3,81±5,81	0,00-27,69	0.199	26,45±52,25	0,00-238,04	0.352	216,70±141,22	58,26-629,80	0.514
Feminino	34,3082±27,856 3	0,0000-174,1420		2,52±2,68	0,00-14,31		53,87±146,30	0,00-995,88		255,40±282,12	42,75-2018,54	
<b>Idade</b>												
<60 anos	44,1499±37,655 3	0,0000-174,1420	0.149	3,49±2,87	0,75-10,82	0.175	20,67±38,93	0,00-107,96	0.647	339,22±442,40	42,75-2018,54	0.266
≥60 anos	31,7231±19,752 2	0,0000-81,2120		2,99±±4,6 7	0,00-27,69		47,12±127,09	0,00-995,88		212,89±127,29	54,83-629,80	
<b>Hemoglobina</b>												
<8g/dL	32,5273±21,053 9	0,0000-81,2120	0.595	5,20±7,56	0,00-27,69	0.084	34,22±61,85	0,00-238,04	0.958	213,88±132,89	42,75-629,80	0.806
≥8g/dL	34,7736±25,861 2	0,0000-174,1420		2,35±2,09	0,00-10,82		44,68±129,59	0,00-995,88		247,51±258,14	54,83-2018,54	
<b>Neutrófilos</b>												
<800/mm <sup>3</sup>	31,7378±18,206 7	0,0000-81,2120	0.911	3,06±2,47	0,00-8,85	0.371	30,70±46,77	0,00-115,03	0.943	192,31±153,70	42,75-629,80	0.115
≥800/mm <sup>3</sup>	34,7425±25,907 3	0,0000-174,1420		3,09±4,70	0,00-27,69		44,50±126,14	0,00-995,88		249,33±245,18	54,83-2018,54	
<b>Plaquetas</b>												
<100.000/mm <sup>3</sup>	31,4583±18,025 8	4,0270-81,2120	0.729	2,63±4,27	0,00-27,69	0.126	29,01±50,83	0,00-214,00	0.495	214,73±129,73	42,75-629,80	0.672
≥100.000/mm <sup>3</sup>	36,4139±28,882 2	0,0000-174,1420		3,46±4,46	0,00-27,69		52,82±149,57	0,00-995,88		258,69±290,81	59,56-2018,54	

Continua

**Tabela 11:** Caracterização das variáveis clínicas com as interleucinas IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF em pacientes com SMD e grupo controle.

<b>Celularidade da Medula Óssea</b>												
Hiper celular	37,2766±19,618 1	4,0270- 81,2120		2,19±1,59	0,00-6,14		56,68±199,41	0,00- 995,88		206,29±115,85	42,75- 541,86	
Hipocelular	54,0428±53,004 1	3,1010- 174,1420	0.075	5,68±9,25	0,58-27,69	0.739	52,50±90,94	0,00- 238,04	0.678	297,11±203,03	84,12- 629,80	0.585
Normocelular	27,6733±18,208 3	0,0000- 77,8150		3,21±4,46	0,00-27,69		34,20±62,75	0,00- 260,66		213,13±130,72	59,56- 547,04	
<b>Diseritropoese</b>												
Sim	33,1716±25,601 4	0,0000- 174,1420		3,28±4,69	0,00-27,69		33,52±61,15	0,00- 260,66		237,66±251,46	42,75- 2018,54	
Não	38,2752±20,084 9	9,5840- 80,9030	0.258	2,35±2,76	0,00-10,82	0.198	74,33±226,16	0,00- 995,88	0.650	241,52±124,62	72,50- 541,87	0.305
<b>Disgranulopose</b>												
Sim	32,9056±19,425 4	0,0000- 81,2120		2,90±4,40	0,00-27,69		33,81±52,97	0,00- 214,00		232,92±149,63	42,75- 629,80	
Não	34,9565±28,515 6	0,0000- 174,1420	0.075	3,24±4,43	0,00-27,69	0.569	47,73±149,59	0,00- 995,88	0.650	244,61±282,44	59,56- 2018,54	0.762
<b>Dismegacariopose</b>												
Sim	34,3223±25,883 7	0,0000- 174,1420		2,99±4,62	0,00-27,69		44,45±127,13	0,00- 995,88		240,43±251,81	42,75- 2018,54	
Não	33,6462±19,509 0	0,0000- 70,4060	0.671	3,47±3,29	0,81-14,31	0.103	32,33±52,27	0,00- 148,97	0.825	231,11±132,13	59,56- 431,96	0.610
<b>Nº de Displasias</b>												
1	35,2210±19,917 4	0,0000- 80,9030		3,06±3,46	0,00-14,31		67,72±202,76	0,00- 995,88		241,92±137,60	59,56- 541,87	
2	35,8395±29,859 3	0,0000- 174,1420	0.693	3,14±4,35	0,00-27,69	0.584	30,46±63,87	0,00- 260,66	0.659	237,74±299,35	59,56- 2018,54	0.621
3	30,7771±19,199 5	0,0000- 81,2120		3,02±5,21	0,00-27,69		36,48±56,88	0,00- 214,00		236,39±169,47	42,75- 629,80	
<b>Cariótipo</b>												
Normal	28,8108±18,349 4	0,0000- 70,7140		2,97±4,35	0,00-27,69		65,51±169,15	0,00- 995,88		215,11±116,43	54,83- 547,04	
Alterado	41,1208±30,869 3	10,8190- 174,1420	0.061	3,75±5,39	0,00-27,69	0.654	30,32±55,41	0,00- 238,04	0.932	206,40±122,38	42,75- 541,86	0.522
<b>Classificação OMS (2016)</b>												

Continua

**Tabela 11:** Caracterização das variáveis clínicas com as interleucinas IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF em pacientes com SMD e grupo controle. 77

SMD com displasia unilinhagem	29,9644±23,069 5	0,0000-70,4060		2,50±2,26	0,00-8,37		132,92±291,57	0,00-995,88		264,11±160,74	91,80-541,87	
SMD com sideroblastos em anel	27,2720±18,605 6	0,0000-65,7750		3,65±3,35	0,81-14,31		19,57±34,68	0,00-106,55		324,88±459,00	54,83-2018,54	
SMD com displasia multilinhagem	37,4671±29,959 8	4,0270-174,1420	0.668	2,34±1,92	0,00-9,31	0.171	26,48±57,43	0,00-260,66	0.324	205,07±107,89	58,26-547,04	0.854
SMD com excesso de blastos	35,4243±19,791 7	9,5840-81,2120		4,54±7,83	0,00-27,69		39,88±63,11	0,00-238,04		201,82±120,89	42,75-541,86	
SMD com del (5q) isolada	27,6970±12,234 3	16,0680-40,4580		0,71±0,78	0,00-1,55		71,33±123,56	0,00-214,00		176,36±88,95	103,52-275,50	
<b>Classificação OMS (2016), categorizada</b>												
Formas Iniciais	33,1709±25,782 7	0,0000-174,1420		2,64±2,45	0,00-14,31		43,85±129,73	0,00-995,88		244,16±256,09	54,83-2018,54	
Formas Avançadas	35,4243±19,791 7	9,5840-81,2120	0.484	4,54±7,83	0,00-27,69	0.919	39,88±63,11	0,00-238,04	0.348	201,82±120,89	42,75-541,86	0.491
<b>IPSS-R</b>												
Muito Baixo	26,5611±22,613 4	0,0000-70,7140		2,51±1,58	0,97-5,49		17,92±43,38	0,00-134,83		195,44±147,48	91,80-547,04	
Baixo	31,2737±17,148 3	3,1010-63,3050		2,10±1,60	0,00-6,14		73,44±201,88	0,00-995,88		204,89±115,55	54,83-541,87	
Intermediário	88,9423±73,816 2	44,2000-174,1420	0.190	2,19±1,23	0,78-3,01	0.384	32,86±47,05	0,00-86,76	0.398	176,36±106,95	84,12-293,60	0.792
Alto	34,9105±20,087 0	9,5840-81,2120		4,37±6,02	0,00-27,69		42,91±63,21	0,00-238,04		205,75±93,90	72,50-431,96	
Muito Alto	26,4673±11,278 7	13,2890-40,7670		8,47±12,81	1,78-27,69		56,23±53,39	0,00-107,96		286,80±210,19	42,75-541,86	
<b>IPSS-R (Categorizado)</b>												
Muito Baixo + Baixo + Intermediário	35,1024±28,730 2	0,0000-174,1420	0.711	2,22±1,51	0,00-6,14		55,89±163,40	0,00-995,88		211,08±128,60	54,83-547,04	
Alto + Muito Alto	32,9483±19,710 5	9,5840-81,2120		5,18±7,46	0,00-27,69		44,30±62,33	0,00-238,04		202,69±99,04	42,75-431,96	

Continua

**Tabela 11:** Caracterização das variáveis clínicas com as interleucinas IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF em pacientes com SMD e grupo controle. 78

Dependência Transfusional												
Sim	32,4712 $\pm$ 18,604 4	4,6450- 81,2120	0.616	3,05 $\pm$ 5,01	0,00-27,69	0.858	43,90 $\pm$ 72,54	0,00- 260,66	0.273	195,02 $\pm$ 93,54	42,75- 376,36	0.903
Não	35,8909 $\pm$ 28,098 5	0,0000- 174,1420		3,34 $\pm$ 4,47	0,00-27,69		27,37 $\pm$ 50,36	0,00- 214,00		244,38 $\pm$ 290,14	54,83- 2018,54	

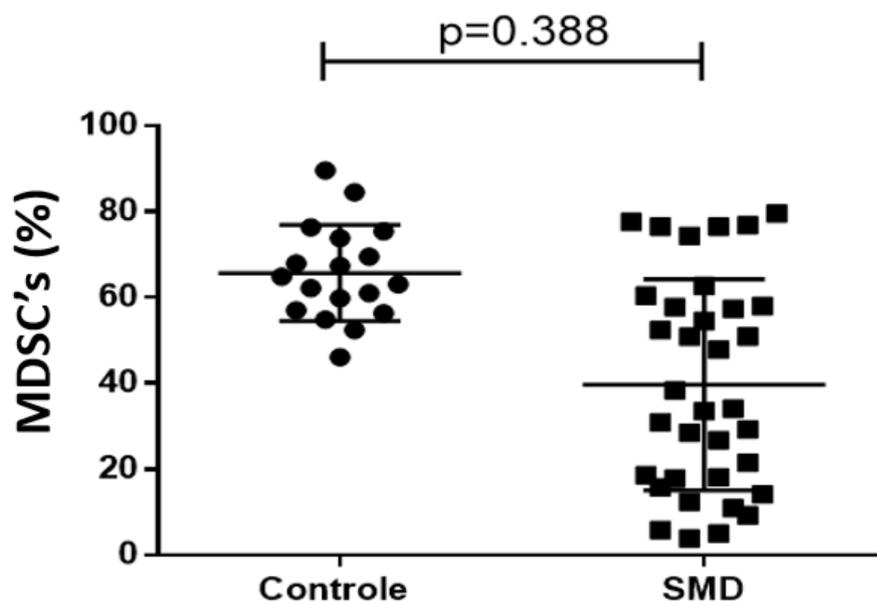
**Legenda:** Classificação OMS (2016), categorizada – Formas Iniciais (SMD com displasia unilinhagem + SMD com sideroblastos em anel + SMD com displasia multilinhagem + SMD com del (5q) isolada), Formas Avançadas (SMD com excesso de blastos).

## 5.6 Análise de Citometria de Fluxo

### 5.6.1 Expressão de MDSC's

Não foi observada uma expressão significativa das células MDSC's, pela marcação CD33+HLA-DR<sup>low</sup>, quando comparados os pacientes com SMD versus controles. ( $p=0.388$ ) (**Gráfico 5**).

**Gráfico 5:** Expressão das MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle.



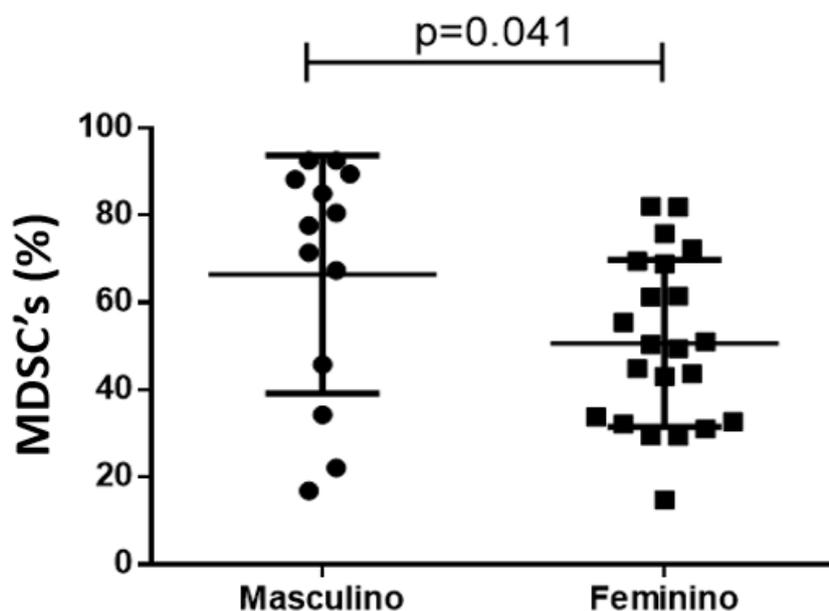
Associação entre expressão de MDSC's em pacientes com SMD x grupo controle ( $56,51 \pm 23,41$  versus  $47,08 \pm 35,12$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney.  $p=0.388$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Porém, observou-se que a expressão das células MDSC's, pela marcação CD33+HLA-DR<sup>low</sup>, foi significativamente maior nos pacientes com SMD do sexo masculino do que nos pacientes do sexo feminino conforme **gráfico 6**. ( $p=0,041$ ).

Quanto à estratificação do risco, foi significativamente maior a expressão das MDSC's entre pacientes categorizados como muito baixo, baixo e risco intermediário do que em pacientes de alto e muito alto risco conforme IPSS-R. (**Gráfico 7**).

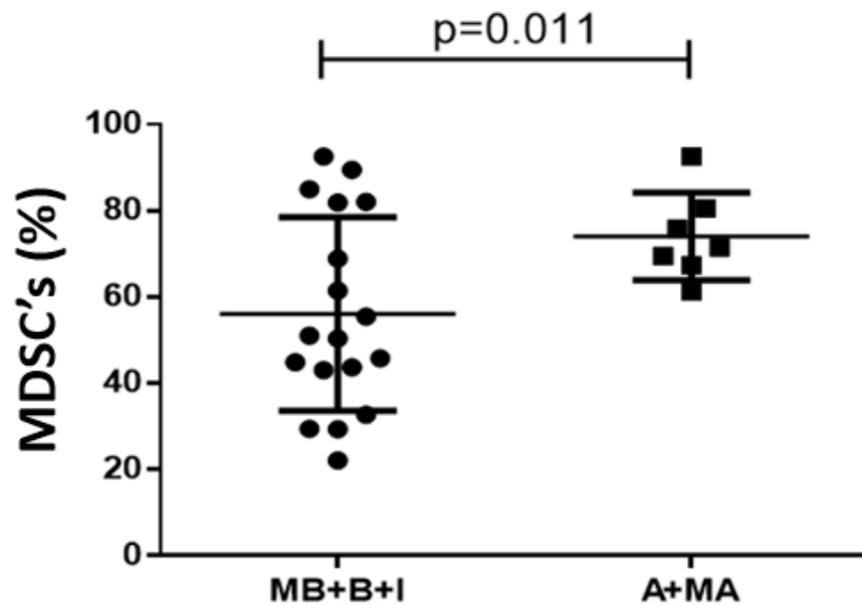
**Gráfico 6:** Expressão das MDSC's em pacientes com SMD do sexo masculino versus pacientes do sexo feminino



Associação entre expressão de MDSC's em pacientes com SMD quanto ao gênero masculino x feminino ( $66,44 \pm 27,29$  versus  $50,65 \pm 19,10$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p=0.041$ .

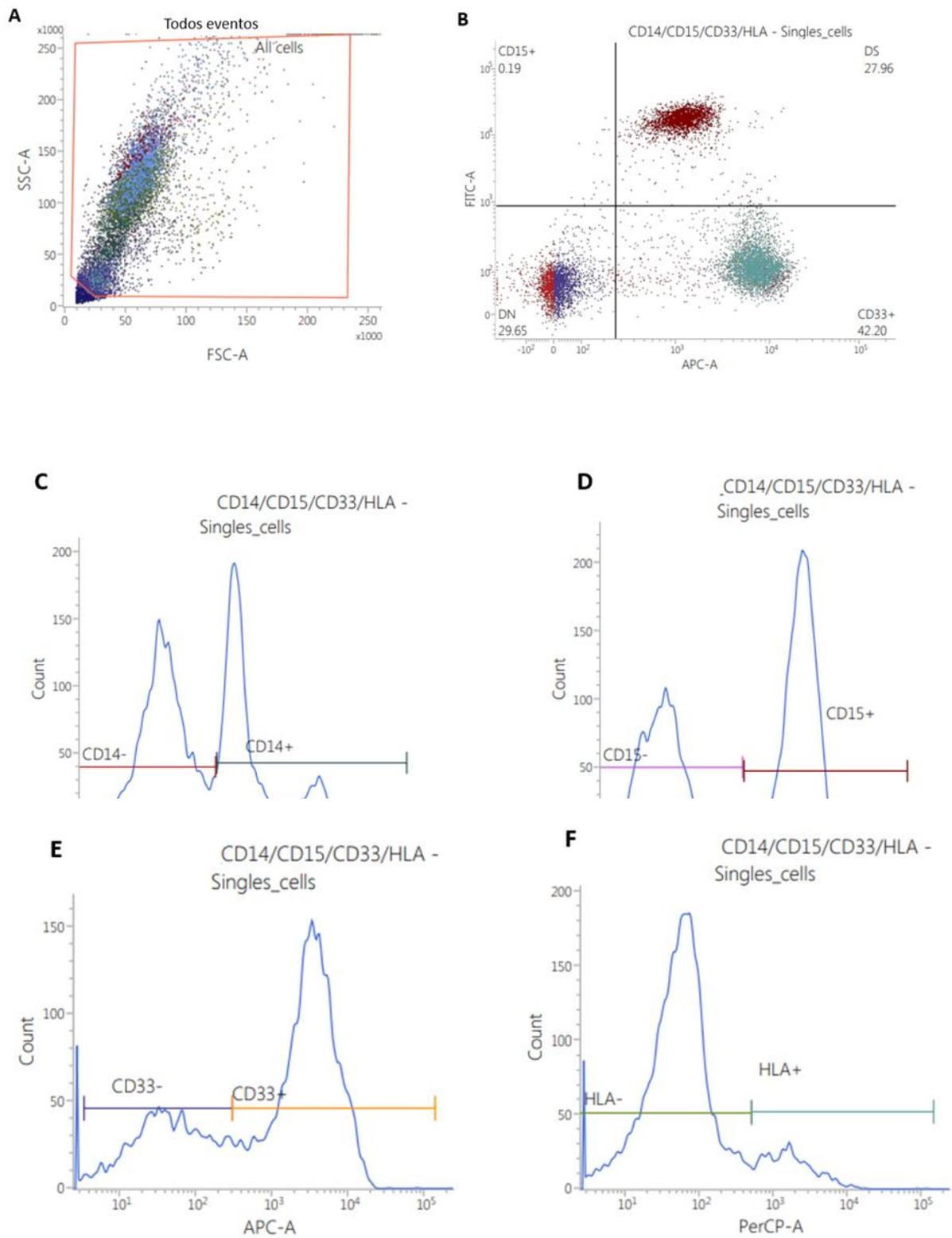
**Fonte:** elaborado pelo autor.

**Gráfico 7:** Expressão das MDSC's em pacientes com SMD estratificados pelo grupo de risco conforme o IPSS-R.



Associação entre expressão de MDSC's em pacientes com SMD estratificados conforme IPSS-R: muito baixo, baixo e intermediário risco versus alto e muito alto risco ( $56,06 \pm 22,42$  versus  $74,07 \pm 10,17$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney.  $p=0.011$ . **Fonte:** elaborado pelo autor.

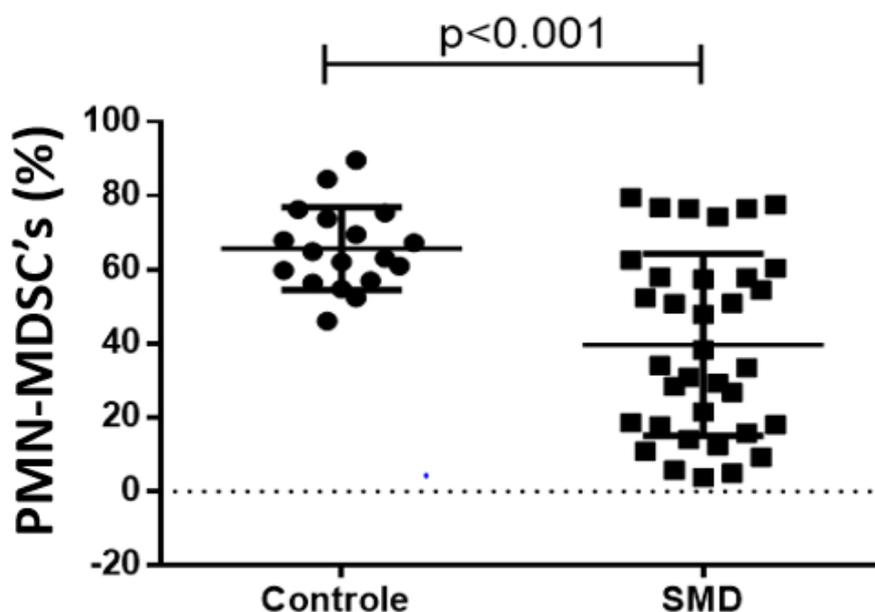
A **figura 15** apresenta os dot-plots de análise individual de um paciente.



### 5.6.2 Expressão de PMN-MDSC's

Observou-se que a expressão das células PMN-MDSC's, através do marcador CD33+ CD15+HLA-DR<sup>low</sup>, estava significativamente diminuída nos pacientes com SMD do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ), conforme **gráfico 8**.

**Gráfico 8:** Expressão das PMN-MDSC's em pacientes com SMD versus controle.

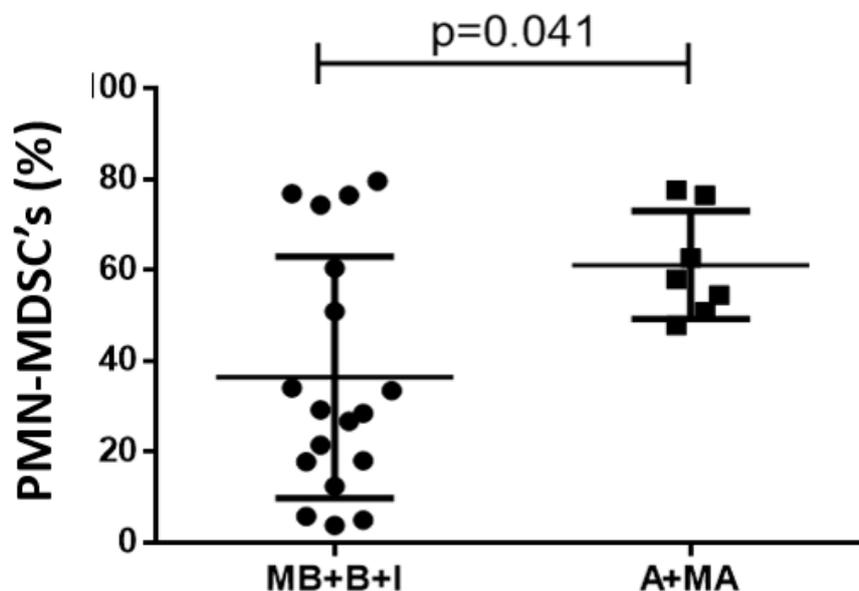


Associação entre expressão de PMN-MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle ( $39,71 \pm 24,6$  versus  $65,71 \pm 11,21$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney.  $p < 0,001$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Quanto à estratificação do risco, houve uma associação estatisticamente significativa maior da expressão das PMN-MDSC's entre pacientes de alto e muito alto risco do que em pacientes categorizados como muito baixo, baixo e risco intermediário, conforme IPSS-r. ( $p = 0,041$ ). (**Gráfico 9**)

**Gráfico 9:** Expressão das PMN-MDSC's em pacientes com SMD estratificados pelo grupo de risco conforme o IPSS-R.



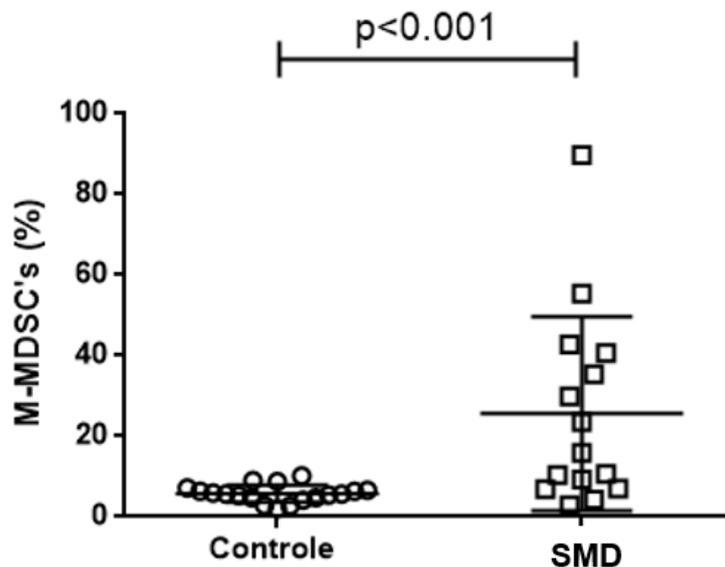
Associação entre expressão de PMN-MDSC's em pacientes com SMD estratificados conforme IPSS-R: alto e muito alto risco versus muito baixo, baixo e intermediário risco ( $61,19 \pm 11,87$  versus  $36,44 \pm 26,58$ ). Valor de p obtido através do teste de Man-Whitney. \* $p=0.041$ .

Fonte: elaborado pelo autor.

### 5.6.3 Expressão de M-MDSC's

Observou-se que a expressão das células M-MDSC's, através do marcador CD33+CD14+HLA-DR<sup>low</sup>, predominou significativamente nos pacientes com SMD do que no grupo controle ( $p < 0,001$ ), conforme **gráfico 10**.

**Gráfico 10:** Expressão das M-MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle.



Associação entre expressão de M-MDSC's em pacientes com SMD versus grupo controle ( $25,65 \pm 24,09$  versus  $5,79 \pm 2,16$ ). Valor de p obtido através do teste de Man Whitney. \* $p < 0.001$ . **Fonte:** elaborado pelo autor.

Não houve expressão significativa das células MDSC's e a idade ( $p=0.131$ ); a hemoglobina ( $p=0.463$ ); números de neutrófilos ( $p=0.463$ ); número de plaquetas ( $p=0.129$ ); celularidade da medula óssea ( $p=0.200$ ); número de displasias ( $p=0.543$ ); cariótipo ( $p=0.829$ ); classificação da SMD quanto a OMS ( $p=0.829$ ) e também quanto à dependência transfusional ( $p=0.465$ ). (**Tabela 12**)

**Tabela 12:** Caracterização das variáveis clínicas com os marcadores das células MDSC's em pacientes com SMD e grupo controle.

Variáveis	CD14 M-MDSC			CD15 PNM-MDSC			CD33 MDSC		
	Média	Mínimo - Máximo	p	Média	Mínimo - Máximo	p	Média	Mínimo - Máximo	p
<b>Grupos</b>									
Controle	5,79±2,16	2,01-10,23	<b>&lt;0.001</b>	65,71±11,21	46,15-89,64	<b>&lt;0.001</b>	47,08±35,12	1,35-89,81	0.388
SMD	22,57±25,60	1,78-99,36		39,71±24,6	3,90-79,6		56,51±23,41	14,79-92,50	
<b>Sexo</b>									
Masculino	32,22±35,72	1,78-99,36	0.203	44,85±27,69	5,85-77,63	0.349	66,44±27,29	16,91-92,50	<b>0.041</b>
Feminino	16,87±15,51	2,62-55,46		36,67±22,70	3,90-79,6		50,65±19,10	14,79-82,00	
<b>Idade</b>									
<60 anos	15,70±17,88	1,78-55,46	0.210	33±26,71	5,85-77,63	0.350	46,30±21,93	16,91-71,48	0.131
≥60 anos	24,95±27,68	2,62-99,36		42,03±23,93	3,90-79,60		60,05±23,26	14,79-92,50	
<b>Hemoglobina</b>									
<8g/dL	16,19±8,30	6,01-35,34	0.469	42,4±23,29	5,85-76,86	0.670	61,54±22,22	22,14-89,47	0.463
≥8g/dL	24,78±29,15	1,78-99,36		38,78±25,41	3,90-79,60		54,77±23,99	14,79-92,50	
<b>Neutrófilos</b>									
<800/mm <sup>3</sup>	29,60±40,35	1,78-99,36	0.743	44,53±30,35	5,85-6267,00	0.536	57,31±29,86	16,91-92,50	0.914
≥800/mm <sup>3</sup>	20,49±19,98	2,62-89,75		38,28±23,11	3,90-79,60		56,28±21,83	14,79-92,50	
<b>Plaquetas</b>									
<100.000/mm <sup>3</sup>	24,56±29,36	1,78-99,36	0.757	45,02±26,08	9,32-79,6	0.173	62,38±21,94	16,91-92,50	0.129
≥100.000/mm <sup>3</sup>	20,46±21,63	2,62-89,75		34,09±22,31	3,90-76,52		50,30±23,95	14,79-92,50	
<b>Celularidade da medula óssea</b>									
Hiper celular	1,78±.	1,78-1,78	0.103	39,39±24,35	10,94-77,63	0.160	16,91±.	16,91-16,91	0.200
Hipo celular	30,85±33,41	3,85-99,36		9,32±	9,32-9,32		65,03±22,62	22,14-92,50	
Normo celular	16,95±21,62	2,62-89,75		48,84±24,03	5,85-79,6		56,42±24,93	14,79-92,50	
<b>Diseritropoese</b>									
Sim	24,76±26,98	1,78-99,36	0.219	38,55±24,57	3,90-77,63	0.506	55,88±22,80	16,91-92,50	0.699
Não	9,44±6,41	2,62-17,20		46,69±26,38	10,94-79,60		60,35±29,51	14,79-88,20	
<b>Disgranulopoese</b>									
Sim	21,10±22,71	2,62-89,75	0.758	36,53±24,94	3,90-77,63	0.577	59,94±22,22	14,79-92,50	0.235
Não	19,32±22,21	1,78-89,75		41,27±23,55	9,32-79,60		50,29±24,12	16,91-92,50	
<b>Dismegacariopoese</b>									
Sim	24,23±27,79	2,62-99,36	0.856	42,95±25,07	3,90-79,6	0.095	57,74±23,97	14,79-92,50	0.543
Não	15,91±13,23	1,78-42,75		26,73±18,82	5,03-50,84		51,61±22,03	16,91-80,57	
<b>Nº de displasias</b>									

Continua

**Tabela 12:** Caracterização das variáveis clínicas com os marcadores das células MDSC's em pacientes com SMD e grupo controle. 87

1	11,29±7,99	1,78-21,91		43,73±25,99	9,32-79,60		58,03±26,71	16,91-81,90	
2	24,15±28,20	2,62-99,36	0.659	37,73±24,10	5,03-76,86	0.875	51,22±24,18	14,79-92,50	0.358
3	24,89±26,56	2,93-89,75		41,0±26,67	3,90-77,63		63,83±20,65	22,14-92,50	
<b>Cariótipo</b>									
Normal	28,29±27,85	3,85-89,75	0.668	40,67±28,13	3,90-79,60	0.900	59,16±23,01	22,14-92,50	0.829
Alterado	21,20±29,82	1,78-99,36		41,71±23,28	9,32-76,52		57,10±23,08	16,91-84,96	
<b>Classificação OMS (2016)</b>									
SMD com displasia unilinhagem	10,18±8,22	1,78-21,91		39,52±26,83	9,32-79,60		51,65±29,40	16,91-81,90	
SMD com sideroblastos em anel	24,62±29,03	3,85-89,75	0.499	32,69±26,77	3,90-76,52	0.635	50,92±22,82	22,14-92,50	0.737
SMD com displasia multilinhagem	25,65±24,09	2,93-89,75		39,48±24,21	5,03-77,63		57,88±21,98	29,37-92,50	
SMD com excesso de blastos	22,47±34,27	2,62-99,36		48,37±24,30	10,94-76,86		63,47±25,94	14,79-88,20	
<b>Classificação OMS (2016), categorizada</b>									
Formas iniciais	22,60±23,76	1,78-89,75	0.643	37,54±24,62	3,90-79,60	0.281	54,78±22,92	16,91-92,50	0.388
Formas avançadas	22,47±34,27	2,62-99,36		48,37±24,30	10,94-76,86		63,47±25,94	14,79-88,20	
<b>IPSS-R</b>									
Muito baixo	26,21±31,16	3,85-89,75		41,25±30,19	3,90-76,52		64,45±26,07	22,14-92,50	
Baixo	21,71±18,75	5,32-55,46		29,02±21,59	5,03-79,60		47,30±16,22	29,37-81,90	
Intermediário	99,36±.	99,36-99,36	0.318	76,86±.	76,86-76,86	0.103	84,96±.	84,96-84,96	0.062
Alto	29,93±30,95	6,81-89,75		60,91±12,98	47,90-77,63		74,84±10,92	61,30-92,50	
Muito alto	6,01±.	6,01-6,01		62,67±.	62,67-62,67		69,47±.	69,47-69,47	
<b>IPSS-R (categorizado)</b>									
Muito baixa +Baixa + Intermediário	27,77±29,21	3,85-99,36	0.929	36,44±26,58	3,90-79,60	<b>0.041</b>	56,06±22,42	22,14-92,50	<b>0.011</b>
Alto + Muito alto	26,51±29,66	6,01-89,75		61,16±11,87	47,90-77,63		74,07±10,17	61,30-92,50	
<b>Dependência transfusional</b>									
Sim	24,06±25,61	2,62-89,75	0.689	36,38±25,18	5,85-76,52	0.567	53,47±27,45	14,79-92,50	0.465
Não	22,70±22,91	2,93-89,75		42,13±25,12	3,90-79,60		60,39±21,44	29,37-92,50	

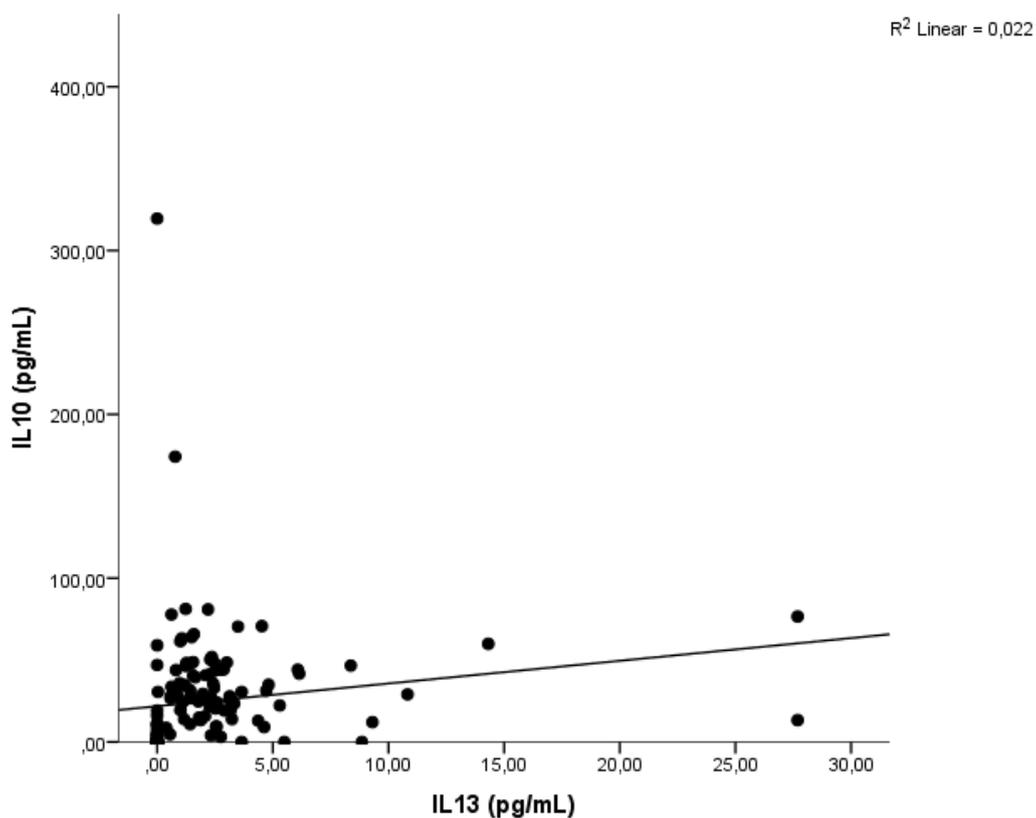
**Legenda:** Classificação OMS (2016), categorizada – Formas Iniciais (SMD com displasia unilinhagem + SMD com sideroblastos em anel + SMD com displasia multilinhagem + SMD com del (5q) isolada), Formas Avançadas (SMD com excesso de blastos).

## 5.7 Correlação entre Interleucinas

### 5.7.1 Análise da correlação entre IL-10 e IL-13

Utilizando a correlação de Spearman, observou-se que há uma correlação moderada, positiva e significativa entre a IL-10 e a produção de IL-13 ( $r=0,564$ ;  $p<0,001$ ). A IL-10 é responsável por 2,2% ( $R^2 = 0,022$ ) da produção de IL-13 no grupo analisado (**gráfico 11**).

**Gráfico 11:** Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e IL-13.



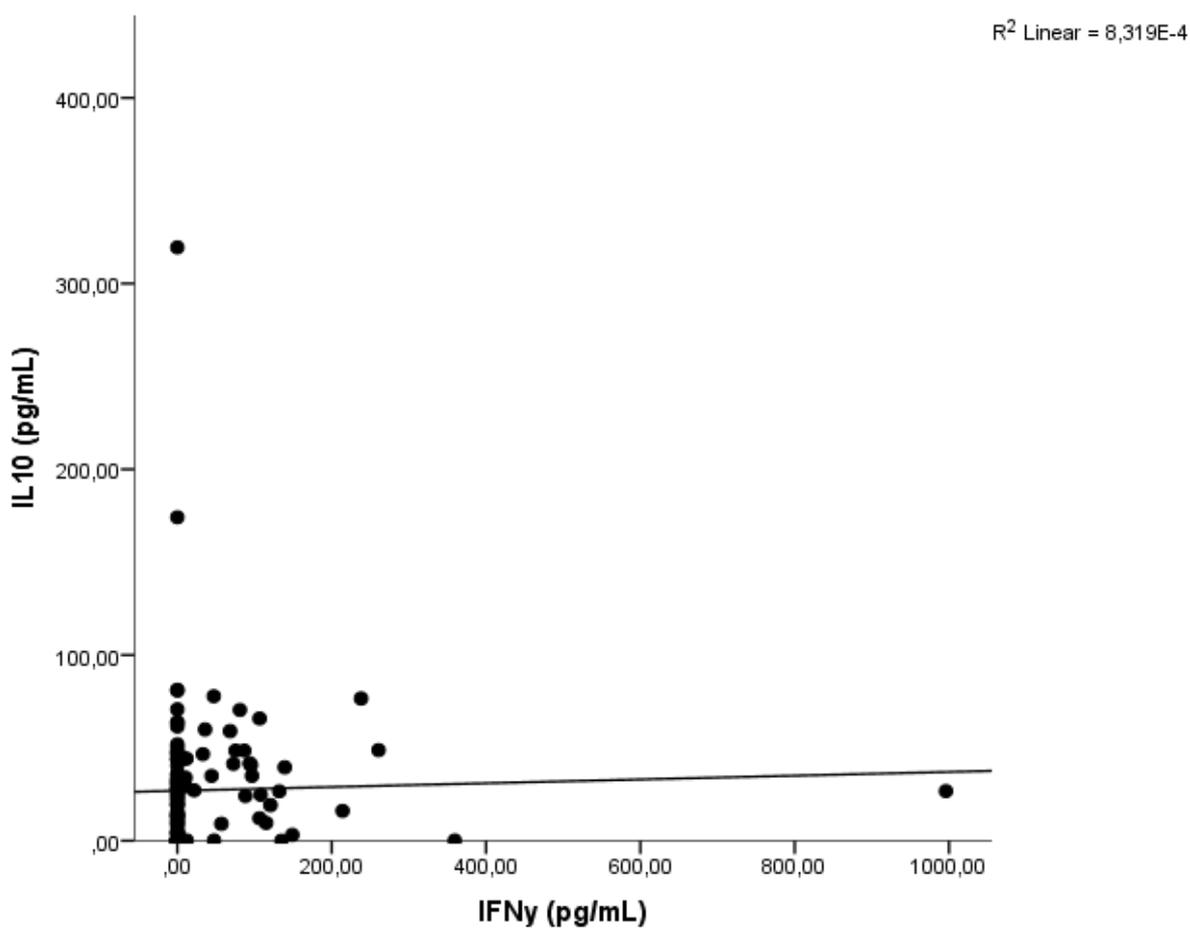
Correlação entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de IL-13 em pacientes com SMD. ( $r = 0,564$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p<0,001$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

### 5.7.2 Análise da correlação entre IL-10 e IFN- $\gamma$

Analisando a IL-10 e o IFN- $\gamma$  pela correlação de Spearman, observou-se que há uma correlação fraca, positiva e significativa entre a IL-10 e a produção de IFN-  $\gamma$  ( $r=0,252$ ;  $p=0,004$ ). A IL-10 é responsável por 83,1% ( $R^2 = 8,319E-4$ ) da produção de IFN-  $\gamma$  no grupo analisado (**gráfico 12**).

**Gráfico 12:** Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$ .

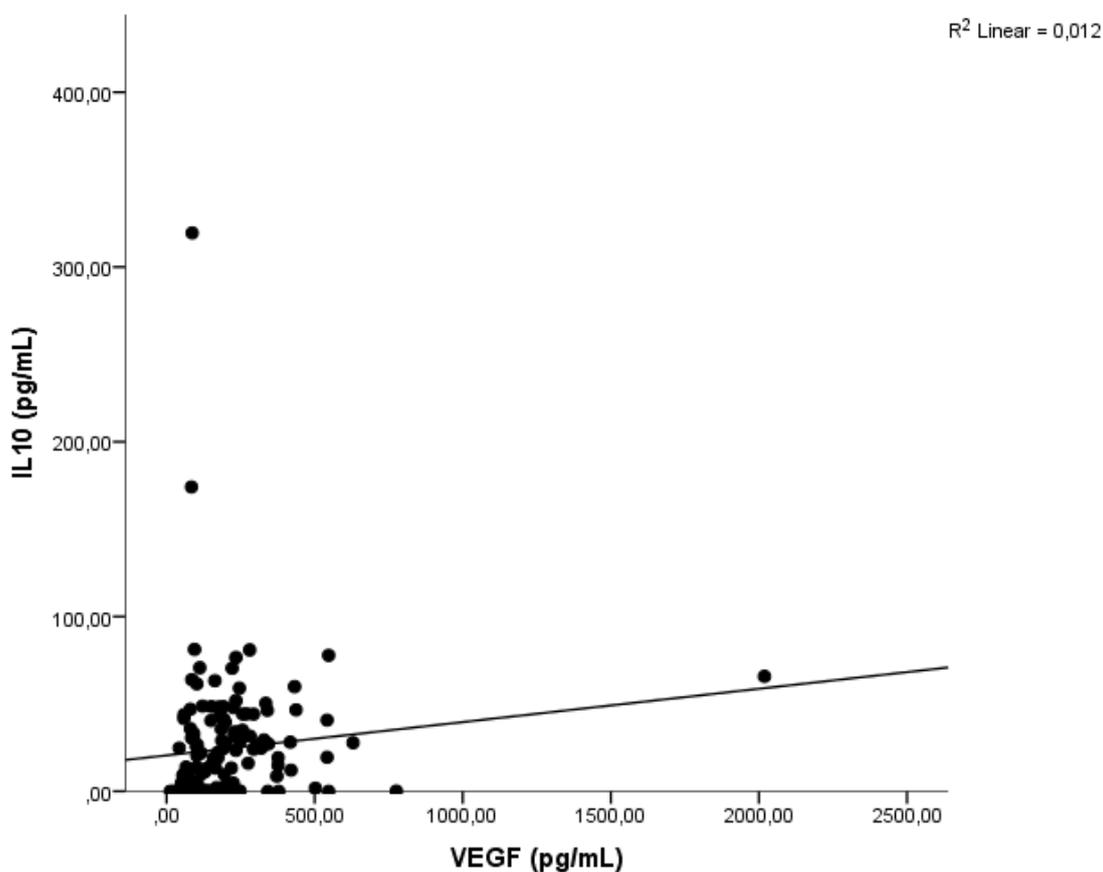


Correlação entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes com SMD. ( $r = 0,252$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p=0.004$ .  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

### 5.7.3 Análise da correlação entre IL-10 e VEGF

Aplicou-se o coeficiente de Spearman para correlacionar a produção de IL-10 e o fator de crescimento VEGF. Foi constatada uma correlação fraca, porém positiva e significativa entre IL-10 e VEGF ( $r=0,275$ ;  $p<0,001$ ). A IL-10 é responsável por 1,2% da ativação de VEGF conforme o **gráfico 13**.

**Gráfico 13:** Correlação de Spearman entre os níveis de IL-10 e VEGF.



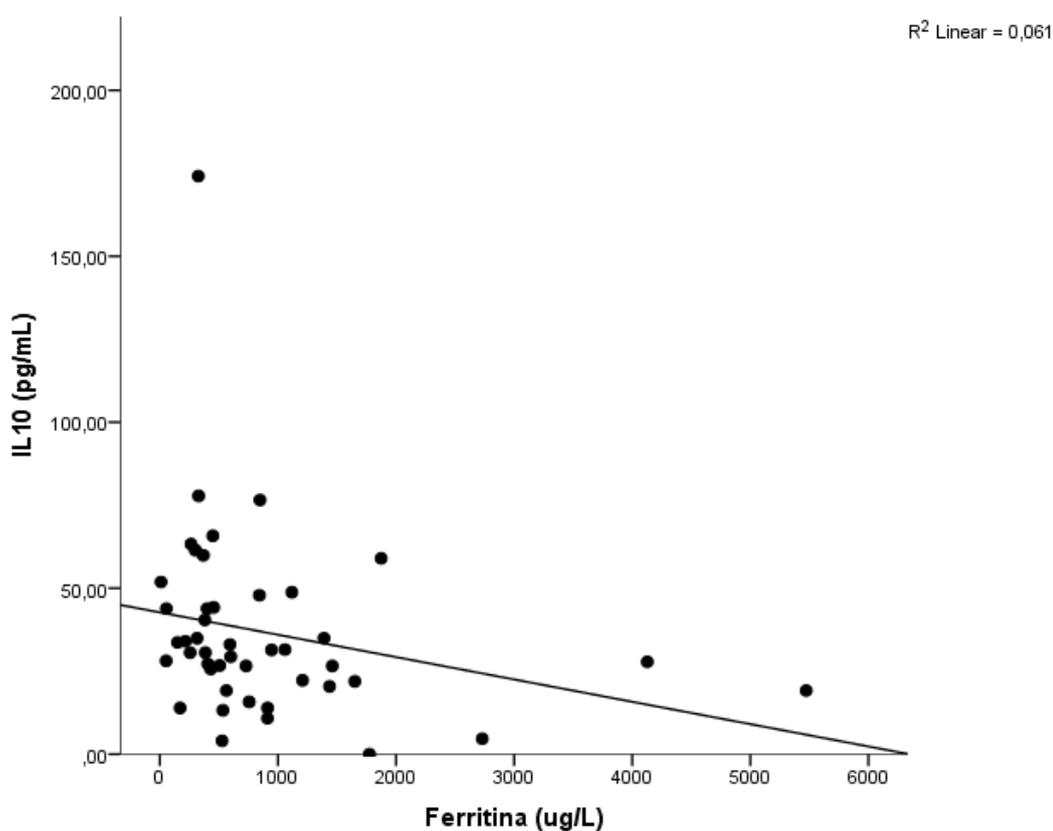
Correlação entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de VEGF em pacientes com SMD. ( $r = 0,275$ ). Valor de p obtido através da correlação de Spearman.  $p<0,001$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

### 5.7.4 Análise da correlação entre IL-10 e Ferritina

Adicionalmente, foi observada uma correlação negativa significativa entre a dosagem de IL-10 e a concentração de ferritina ( $r = -0,410$ ;  $p < 0,001$ ), conforme o **gráfico 14**.

**Gráfico 14:** Correlação entre IL-10 e ferritina em pacientes com SMD.



Correlação entre os níveis séricos de IL-10 e a dosagem de ferritina em pacientes com SMD. ( $r = -0,410$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p < 0,001$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

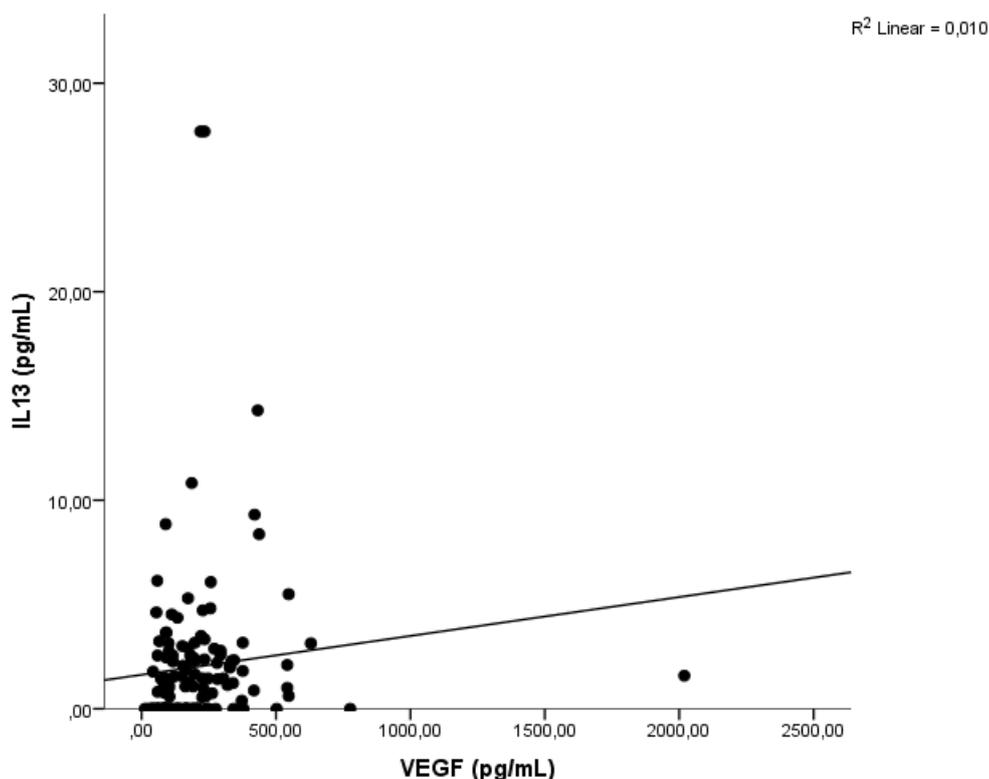
Não foram encontradas correlações significativas entre a dosagem de IL-10 e as seguintes variáveis clínicas: idade; dosagem hemoglobina; contagem de neutrófilos; número de plaquetas e número de blastos, conforme descrito na **tabela 13**.



### 5.7.6 Análise da correlação entre IL-13 e VEGF

Aplicou-se o coeficiente de *Spearman* para correlacionar a produção de IL-13 e o fator de crescimento VEGF. Foi constatada uma correlação fraca, porém positiva e significativa entre IL-13 e VEGF ( $r=0,012$ ;  $p<0,001$ ). A IL-13 é responsável por 1% da ativação de VEGF conforme o **gráfico 16**.

**Gráfico 16:** Correlação entre IL-13 e a produção de VEGF em pacientes com SMD.



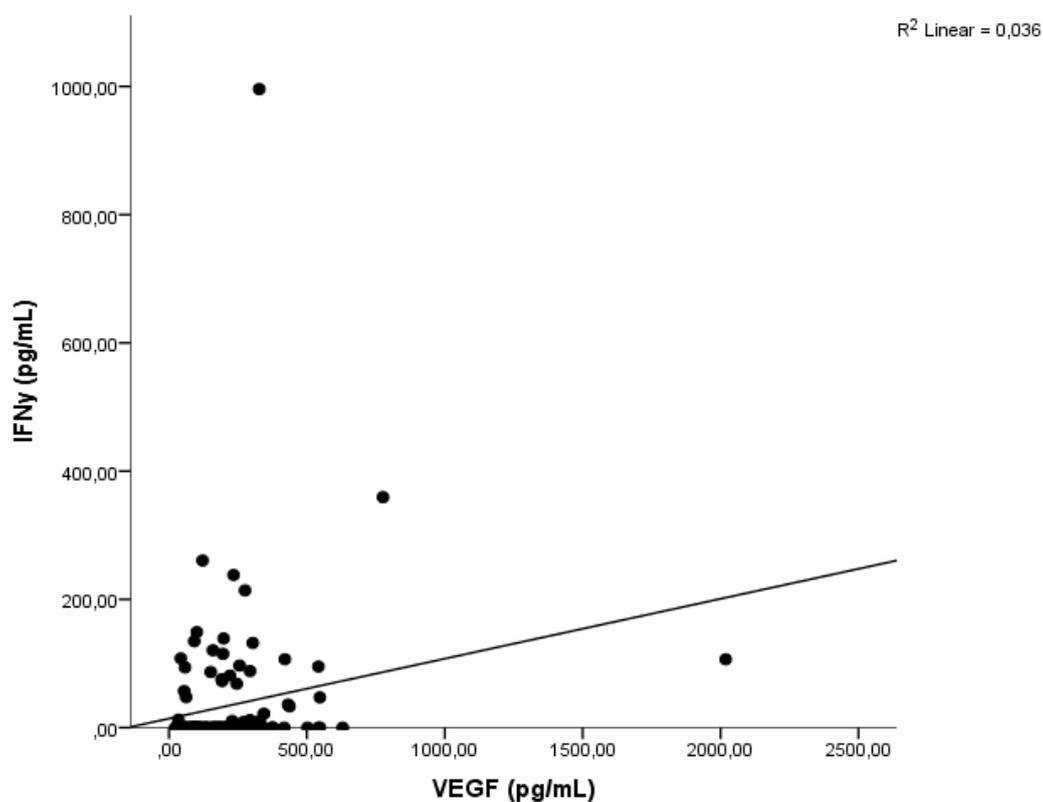
Correlação entre os níveis séricos de IL-13 e o VEGF em pacientes com SMD. ( $r = 0,012$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p<0,001$ .  
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foram encontradas correlações significativas entre a dosagem de IL-13 e as seguintes variáveis clínicas: idade; dosagem hemoglobina; contagem de neutrófilos; número de plaquetas, dosagem de ferritina e número de blastos, conforme descrito na **tabela 13**.

### 5.7.7 Análise da correlação entre IFN- $\gamma$ e VEGF

Foi observada, através do coeficiente de *Spearman*, uma correlação positiva entre a produção de IFN-  $\gamma$  e o fator de crescimento VEGF com  $r = 0,253$  e  $p = 0,004$ , conforme ilustrado no **gráfico 17**.

**Gráfico 17:** Correlação entre IFN-  $\gamma$  e a produção de VEGF em pacientes com SMD.



Correlação entre os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e o VEGF em pacientes com SMD. ( $r = 0,253$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p = 0,004$ .

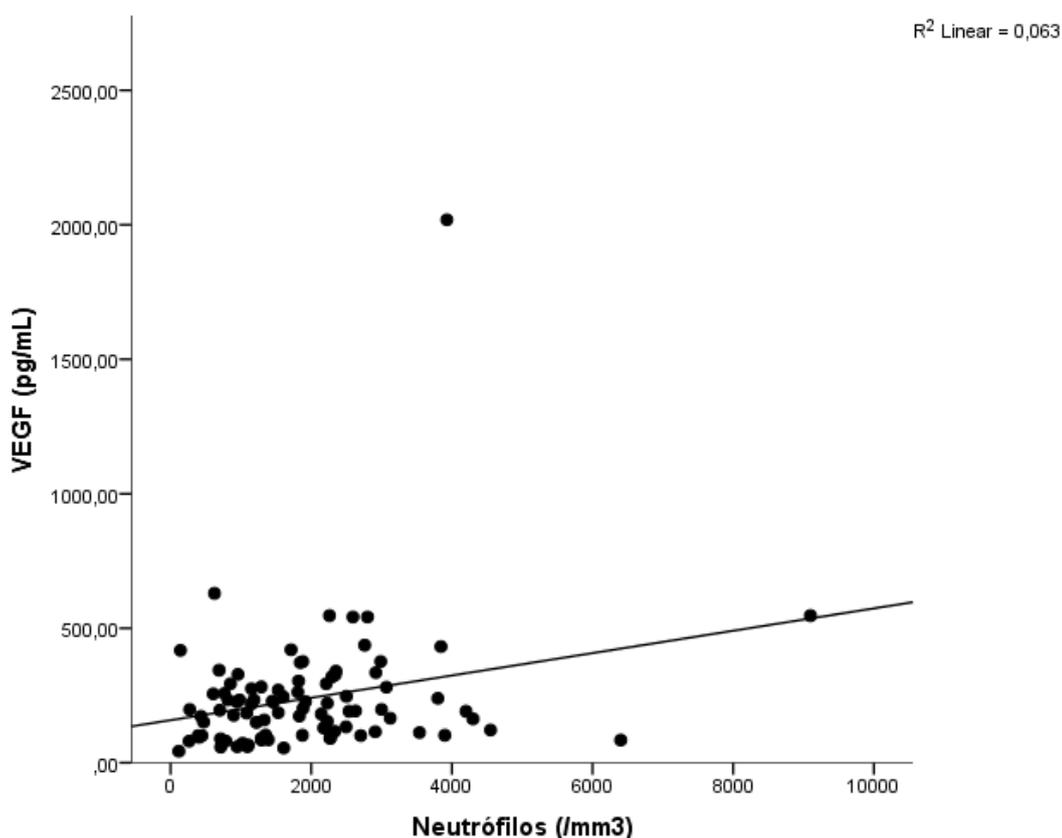
**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foram encontradas correlações significativas entre a dosagem de IFN- $\gamma$  e as seguintes variáveis clínicas: idade; dosagem hemoglobina; contagem de neutrófilos; número de plaquetas, dosagem de ferritina e o número de blastos, conforme descrito na **tabela 13**.

### 5.7.8 Análise da correlação entre VEGF e a contagem de neutrófilos

Através do coeficiente de *Spearman*, foi verificada uma correlação positiva entre o fator de crescimento VEGF e a contagem de neutrófilos com  $r=0,233$  e  $p=0.028$ , conforme demonstrado no **gráfico 18**.

**Gráfico 18:** Correlação entre ativação de VEGF e a contagem de neutrófilos em pacientes com SMD.



Correlação entre os níveis séricos de VEGF e a contagem de neutrófilos em pacientes com SMD. ( $r = 0,233$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p=0.028$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foram encontradas correlações significativas entre a dosagem de VEGF e as seguintes variáveis clínicas: idade; dosagem hemoglobina; número de plaquetas, dosagem de ferritina e o número de blastos, conforme descrito na **tabela 13**.

**Tabela 13:** Correlações entre dosagens de interleucinas versus variáveis clínicas.

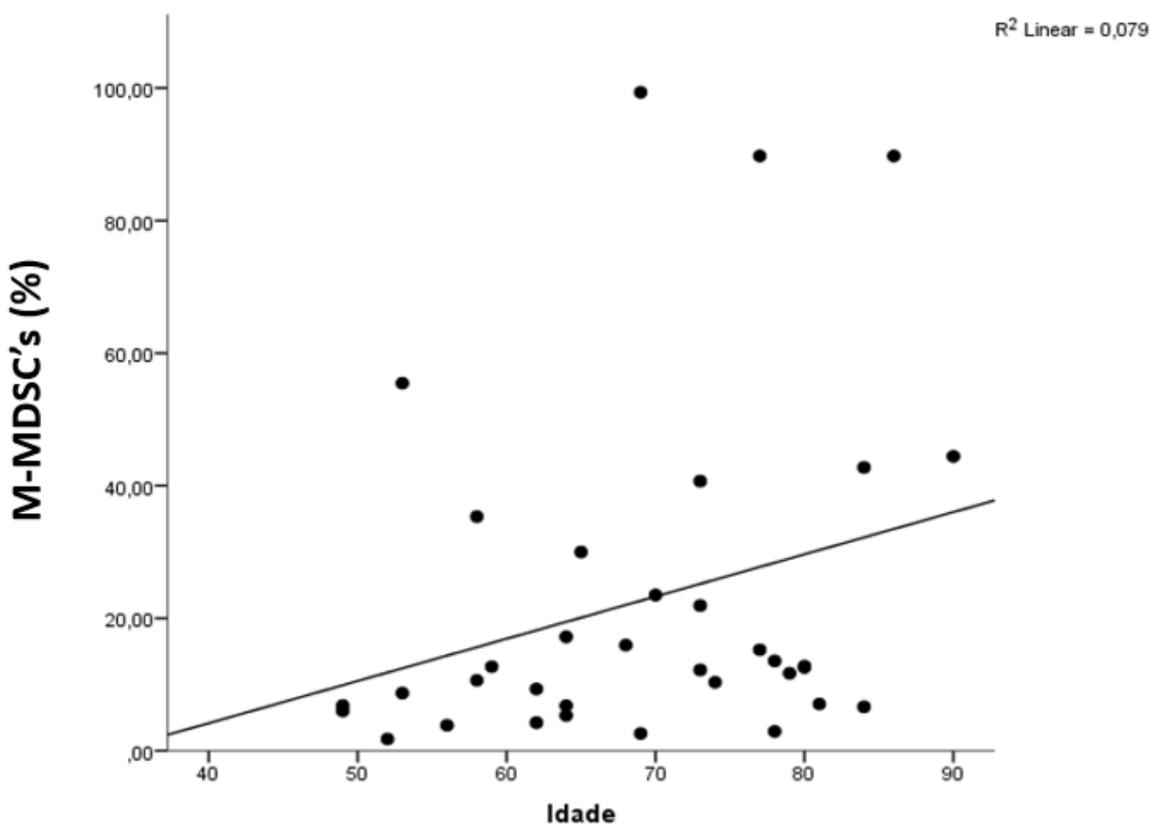
	IL10	IL13	IFNy	VEGF	Idade	Hemoglobina	Neutrófilos	Plaquetas	Ferritina	Blastos
<b>IL10</b> r de Spearman	-	0,564**	0,252**	0,275**	-0,182	0,055	0,126	0,062	-0,410**	0,166
<b>IL10</b> p-value	-	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,001</b>	0,084	0,602	0,233	0,561	<b>0,005</b>	0,118
<b>IL10</b> N	-	141	127	139	91	91	91	91	45	90
<b>IL13</b> r de Spearman	0,564**	-	0,239**	0,279**	-0,030	-0,077	-0,097	0,122	0,248	0,016
<b>IL13</b> p-value	<b>0,000</b>	-	<b>0,007</b>	<b>0,001</b>	0,775	0,466	0,355	0,244	0,092	0,876
<b>IL13</b> N	141	-	128	139	93	93	93	93	47	92
<b>IFNy</b> r de Spearman	0,252**	0,239**	-	0,253**	0,099	-0,098	0,069	0,112	0,058	0,137
<b>IFNy</b> p-value	<b>0,004</b>	<b>0,007</b>	-	<b>0,004</b>	0,350	0,353	0,516	0,289	0,700	0,196
<b>IFNy</b> N	127	128	-	125	92	92	92	92	46	91
<b>VEGF</b> r de Spearman	0,275**	0,279**	0,253**	-	-0,199	0,047	0,233*	0,119	0,071	-0,046
<b>VEGF</b> p-value	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,004</b>	-	0,062	0,663	<b>0,028</b>	0,267	0,646	0,669
<b>VEGF</b> N	139	139	125	-	89	89	89	89	44	88

## 5.8 Correlação entre as células MDSC's e variáveis clínicas

### 5.8.1 M-MDSC's e idade

Foi observada uma correlação positiva significativa entre a expressão de M-MDSC's e o avanço da idade em pacientes com SMD. ( $r = 0,334$ ;  $p = 0,050$ ), conforme gráfico 19.

**Gráfico 19:** Correlação entre a expressão de M-MDSC's e a idade em pacientes com SMD.



Correlação entre a expressão de M-MDSC's e a idade dos pacientes com SMD. ( $r = 0,334$ ). Valor de  $p$  obtido através da correlação de Spearman.  $p = 0,050$ .

**Fonte:** elaborado pelo autor.

Não foi encontrada correlação significativa entre a expressão de M-MDSC's e as seguintes variáveis clínicas: hemoglobina ( $r = -0,216$ ;  $p = 0,213$ ); número de neutrófilos ( $r = -0,134$ ;  $p = 0,442$ ); número de plaquetas ( $r = -0,049$ ;  $p = 0,781$ ); dosagem de ferritina ( $r = -0,009$ ;  $p = 0,972$ ); número de blastos ( $r = -0,133$ ;  $p = 0,452$ ). (**Tabela 14**)

Não foi encontrada correlação significativa entre a expressão de PMM-MDSCs e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $r = -0,139$ ;  $p = 0,426$ ); hemoglobina ( $r = -0,230$ ;  $p = 0,184$ ); número de neutrófilos ( $r = -0,195$ ;  $p = 0,261$ ); número de plaquetas ( $r = -0,171$ ;  $p = 0,326$ ); dosagem de ferritina ( $r = 0,011$ ;  $p = 0,966$ ); número de blastos ( $r = -0,080$ ;  $p = 0,652$ ). (**Tabela 14**)

Não foi encontrada correlação significativa entre a expressão de MDSCs e as seguintes variáveis clínicas: idade ( $r = 0,067$ ;  $p = 0,701$ ); hemoglobina ( $r = -0,150$ ;  $p = 0,391$ ); número de neutrófilos ( $r = -0,042$ ;  $p = 0,810$ ); número de plaquetas ( $r = -0,128$ ;  $p = 0,465$ ); dosagem de ferritina ( $r = 0,021$ ;  $p = 0,932$ ); número de blastos ( $r = -0,031$ ;  $p = 0,862$ ). (**Tabela 14**)

Para a avaliação da correlação entre a expressão das MDSC's versus dosagem de interleucinas em pacientes com SMD, além da análise de todos os pacientes, o grupo dos pacientes foi dividido conforme a classificação estabelecida pela OMS (2016). Diante disso, não foi encontrada correlação significativa entre a expressão das células MDSC's versus interleucinas no grupo de pacientes SMD com sideroblastos em anel (**tabela 15**); assim também como não houve correlação significativa nos grupos SMD com displasia em uma única linhagem (**tabela 16**); com excesso de blastos (**tabela 17**) e displasia em múltiplas linhagens (**tabela 18**).

**Tabela 14:** Correlações entre a expressão das células MDSC's versus variáveis clínicas.

		<b>Idade</b>	<b>Hemoglobina</b>	<b>Neutrófilos</b>	<b>Plaquetas</b>	<b>Ferritina</b>	<b>Blastos</b>
<b>CD14+ M MDS</b>	r de Spearman	0,334*	-0,216	-0,134	-0,049	-0,009	-0,133
	p-value	<b>0,050</b>	0,213	0,442	0,781	0,972	0,452
	N	35	35	35	35	19	34
<b>CD15+ PNM MDS</b>	r de Spearman	-0,139	-0,230	-0,195	-0,171	0,011	-0,080
	p-value	0,426	0,184	0,261	0,326	0,966	0,652
	N	35	35	35	35	19	34
<b>CD33+ MDS</b>	r de Spearman	0,067	-0,150	-0,042	-0,128	0,021	-0,031
	p-value	0,701	0,391	0,810	0,465	0,932	0,862
	N	35	35	35	35	19	34

**Tabela 15:** Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD - SA.

		CD14+CD33+ HLA-DR - M-MDSC	CD15+CD33+ HLA-DR - PNM-MDSC	CD33+CD15+CD14+HLA-DR - MDSC
<b>IL-10</b>	r de Spearman	0,119	0,071	0,048
	p-value	0,779	0,867	0,911
	N	8	8	8
<b>IL-13</b>	r de Spearman	-0,333	0,690	0,619
	p-value	0,420	0,058	0,102
	N	8	8	8
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	r de Spearman	-0,191	-0,327	-0,164
	p-value	0,651	0,429	0,699
	N	8	8	8
<b>VEGF</b>	r de Spearman	0,679	0,286	0,179
	p-value	0,094	0,535	0,702
	N	7	7	7

**Tabela 16:** Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD - DU.

		CD14+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup> M-MDSC	CD15+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup> PNM-MDSC	CD33+CD15+CD14+HLA-DR <sup>-</sup> MDSC
<b>IL-10</b>	r de Spearman	0,500	0,100	0,100
	p-value	0,391	0,873	0,873
	N	5	5	5
<b>IL-13</b>	r de Spearman	0,400	0,300	0,300
	p-value	0,505	0,624	0,624
	N	5	5	5
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	r de Spearman	0,354	0,000	0,000
	p-value	0,559	1,000	1,000
	N	5	5	5
<b>VEGF</b>	r de Spearman	-0,800	0,100	0,100
	p-value	0,104	0,873	0,873
	N	5	5	5

**Tabela 17:** Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD – EB.

		CD14+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup>	CD15+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup>	CD33+CD15+CD14+HLA-DR <sup>-</sup>
		M-MDSC	PNM-MDSC	MDSC
<b>IL-10</b>	r de Spearman	0,036	0,036	0,143
	p-value	0,939	0,939	0,760
	N	7	7	7
<b>IL-13</b>	r de Spearman	0,393	0,393	0,179
	p-value	0,383	0,383	0,702
	N	7	7	7
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	r de Spearman	-0,158	0,433	0,020
	p-value	0,736	0,331	0,967
	N	7	7	7
<b>VEGF</b>	r de Spearman	0,429	-0,429	0,107
	p-value	0,337	0,337	0,819
	N	7	7	7

**Tabela 18:** Correlações entre a expressão das células MDSC's versus Interleucinas em pacientes SMD – DM.

		CD14+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup> M-MDSC	CD15+CD33+ HLA-DR <sup>-</sup> PNM-MDSC	CD33+CD15+CD14+HLA-DR <sup>-</sup> MDSC
<b>IL-10</b>	r de Spearman	0,171	-0,264	-0,100
	p-value	0,541	0,341	0,723
	N	15	15	15
<b>IL-13</b>	r de Spearman	-0,041	-0,250	0,148
	p-value	0,884	0,368	0,598
	N	15	15	15
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	r de Spearman	-0,124	0,186	-0,371
	p-value	0,660	0,508	0,173
	N	15	15	15
<b>VEGF</b>	r de Spearman	-0,139	0,170	-0,479
	p-value	0,620	0,545	0,071
	N	15	15	15

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão das células supressoras derivadas da linhagem mielóide e sua relação com os níveis de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF em pacientes adultos portadores de Síndromes Mielodisplásicas. Os critérios mínimos para diagnóstico de SMD envolvem a presença de citopenias periféricas, displasia na medula óssea e alterações cromossômicas. Esses fatores associados com o avançar da idade aumentam o risco para o desenvolvimento de uma leucemia mielóide aguda.

Em relação ao gênero, observou-se um predomínio de pacientes do sexo feminino correspondendo a 55,9% dos casos, o que corrobora os resultados de outros estudos brasileiros, provavelmente devido à crescente exposição de mulheres a agentes ambientais e ocupacionais como os pesticidas agrícolas, após sua inserção na agricultura de subsistência. (MAGALHÃES et al., 2013). Porém, os resultados aqui observados diferem da maioria dos estudos com SMD, os quais encontraram maior prevalência da doença entre os homens, o que pode estar associado à menor busca por um acompanhamento médico. (GREENBERG et al., 2012; BELLI et al., 2015; AL-KALI et al., 2019).

Estudo realizado por Zini (2017) mostrou a incidência de 5 novos casos por cada 100.000 pessoas/ano, apresentando maior prevalência em paciente do sexo masculino na população mundial. Vale ressaltar que há uma diferença na idade média dependendo do continente avaliado. Pacientes asiáticos apresentam uma faixa etária entre 40 e 50 anos ao diagnóstico, enquanto nos países do ocidente predomina uma faixa etária acima de 70 anos. (Shi *et al.*, 2019).

Em 2012, um levantamento epidemiológico com a participação de 7012 pacientes com SMD realizado por Greenberg et al., mostrou uma média de idade de 71 anos. BELLI et al. (2015), em pesquisa realizada em países da América Latina com a inclusão de 345 brasileiros, relataram uma média de idade de 65 anos. O estudo brasileiro com dados epidemiológicos mais recente publicado por Mendonça et al., 2019, revelou uma média de idade de  $69,3 \pm 15,6$  anos em pacientes com SMD no estado do Ceará. Em contraste com outros estudos de centros brasileiros, no presente estudo, foi encontrada uma média de idade de 72,4 anos. Nossos dados são semelhantes aos obtidos no estudo realizado por Al-Kali et al. (2019) com 54.953

pacientes americanos portadores de SMD, onde se observou uma média de idade de 76 anos.

A presença de uma ou mais citopenias é uma condição “*sine qua non*” para o diagnóstico de SMD. Na SMD, 70% a 90% dos pacientes desenvolvem anemia em alguma fase da evolução da doença, sendo esta, a citopenia mais comum, associada ou não à neutropenia e/ou plaquetopenia (TSANG, LEITCH 2016). Em um estudo publicado por Bastida e cols, 2019, 139 pacientes com anemia foram avaliados. Destes, 14 eram SMD, apresentando a anemia como a citopenia presente em 85,7% dos pacientes estudados. No presente estudo, 35,5% dos pacientes avaliados apresentaram 2 citopenias ao diagnóstico, sendo a anemia a citopenia mais prevalente o que corrobora os achados na literatura. Portanto, a presença de citopenias permite-nos obter um diagnóstico precoce da SMD.

Dentre os pacientes com estudo citogenético disponível, 43,5% apresentaram cariótipo alterado, corroborando os dados na literatura que relatam uma alteração cromossômica em torno de 40 a 60% dos pacientes com SMD primária e podendo chegar a 80% na SMD secundária. As alterações mais prevalentes são a deleção (5q), monossomia 7 ou deleção (7q), trissomia 8, e del (20q) (MALCOVATI et al. 2013; SHAHRABI et al, 2016). Vale destacar que a maioria dessas alterações tem influência negativa na sobrevivência e podem participar ativamente como gatilhos da progressão da doença para LMA.

Quanto à classificação, observou-se predomínio das formas iniciais da SMD com 75,3% dos casos, sendo a forma de maior prevalência a SMD-DM correspondendo a 39,8% dos casos. Nosso estudo corrobora os dados de Strupp, 2017, o qual encontrou 27,7% dos pacientes como SMD-DM num levantamento composto por 3528 pacientes alemães. Entretanto, nossos dados contrariam o estudo realizado por Al-Kali et al (2019) com 54.953 pacientes, o qual identificou uma prevalência da SMD inclassificável com 55.6% dos casos (30.530), seguido de SMD – EB com 15.6% (8573), anemia refratária com 9.0% (4921) dos pacientes, SMD- AS com 7.6% (4155), SMD-DM com 6.1% (3373) dos casos e SMD del 5q correspondendo a 3.7% (2008) dos casos. Um dos maiores desafios para o diagnóstico da SMD é a disponibilidade de recursos para estudos citogenéticos e moleculares, principalmente em países em desenvolvimento, onde a morfologia ainda é o critério preponderante para o diagnóstico. As atualizações da OMS vêm cada vez

mais refinando variáveis e incorporando o papel das mutações tanto no diagnóstico como na classificação.

De acordo com a estratificação de risco pelo IPSS-R, 62,7% dos pacientes foram estratificados como muito baixo, baixo ou risco intermediário, mesmo apresentando alguns pacientes sem dados completos para estratificação quanto ao IPSS-R, o presente estudo mostrou um percentual aproximado àquele relatado por Greenberg et al (2012) em estudo multicêntrico de 7012 pacientes.

A dosagem de ferritina sérica é usada para definir a sobrecarga de ferro nos pacientes dependentes de transfusão. Níveis de ferritina superiores a 1.000 ng/mL estão associados à toxicidade hepática, renal e cardíaca, aumento do estresse oxidativo e são considerados fatores que impactam negativamente a sobrevida global desses pacientes (GATTERMANN et al., 2018; SHAMMO; KOMROKJI, 2018). Recentemente tem sido demonstrado que mesmo uma ferritina sérica inferior a 1.000 ng/dL tem impacto negativo significativo (CUI et al, 2015). Na série aqui estudada observou-se que 55,3% dos pacientes apresentaram ferritina  $\geq 500$  ng/mL em alguma fase da evolução da doença.

Nos últimos anos, estudos têm destacado a importância no vínculo entre inflamação e câncer. A inflamação está envolvida no desenvolvimento e supressão do tumor, estimulando ou inibindo a resposta imune. Segundo Fishbein, 2021 a inflamação crônica e infecção contribuem com cerca de 25% de todos cânceres humanos incluindo hepatocelular, câncer de bexiga, mama e próstata. Uma maior infiltração de células imunes inatas no ambiente tumoral está associada com aumento da angiogênese e mau prognóstico. Em contraste, infiltrados inflamatórios linfocíticos podem estar associados à inibição do tumor e a um prognóstico melhor. A principal característica de um desequilíbrio no sistema imune é a produção exacerbada de citocinas e mediadores da inflamação (DESAI, 2019; GRETEN, 2019; FISHBEIN, 2021). No entanto, esse desequilíbrio também está presente na SMD, com a participação tanto da resposta imune inata quanto da adquirida, culminando na liberação de mediadores inflamatórios, no aumento da permeabilidade vascular e angiogênese (WANG et al., 2018; SHI, 2019; HAN, 2020).

Sabe-se que a hematopoese ineficaz na SMD é caracterizada por diferentes taxas de apoptose, sendo observado um aumento de apoptose promovido pelo predomínio do estado pró-inflamatório nos pacientes categorizados como baixo risco, enquanto nos pacientes de alto risco observam-se baixas taxas de apoptose,

predominando um estado anti-inflamatório (GÓMEZ *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2019). Esse processo apoptótico nos precursores hematopoéticos diminui com a progressão da doença, permitindo assim a expansão do clone anômalo.

Dentre as células imunossupressoras que atuam no microambiente tumoral, têm-se as células MDSC's. Uma parte importante da patogênese da SMD é seu microambiente incluindo as MDSC's. Vale ressaltar que até o momento não existe relato na literatura referente à expressão das células MDSC's em pacientes com SMD conjuntamente aos níveis séricos de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e VEGF.

Os principais mecanismos envolvidos na supressão mediada pelas MDSC's incluem a depleção de nutrientes essenciais, como a arginase, para funcionalidade das células T, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, atuação nos processos de migração e ativação de células T, expansão de linfócitos Treg e reprogramação dos macrófagos M1/M2. (NADAL 2018; OSTRAND-ROSENBERG 2018). Em adição, as células MDSCs promovem a angiogênese tumoral, a invasão de células neoplásicas e conseqüentemente, a metástase (NADAL *et al.*, 2018).

Nesse estudo não foi identificada diferença significativa entre a expressão das células MDSC's em pacientes com SMD quando comparados ao grupo controle. Apesar de a maioria dos estudos relatarem a predominância dessas células MDSC's na medula óssea, o presente estudo mostrou que essas células migram para sangue periférico, sendo possível quantificá-las. Vale a pena ressaltar que devido à natureza heterogênea das MDSCs em seus vários estágios de diferenciação, torna-se difícil sua exata identificação.

Safarzadeh, 2018, avaliou a associação da idade versus expressão das células MDSC's em pacientes com câncer de mama e foi demonstrado haver uma expressão aumentada dessas células em pacientes acima de 45 anos. Nosso estudo se assemelha aos dados de Safarzadeh, visto que tivemos uma correlação positiva e significativa entre a expressão das células MDSC's *versus* idade. Outro dado curioso observado foi em relação ao gênero, havendo uma diferença significativa entre a expressão das MDSC's entre pacientes do sexo masculino e sexo feminino. No entanto, podemos especular que pacientes do sexo masculino possuem maior estado inflamatório, devido ao estilo de vida e a uma maior exposição a fatores ambientais e ocupacionais e adicionalmente, pode-se relacionar com a idade, visto que com o avançar da idade, o paciente torna-se mais inflamado devido à presença de comorbidades. (BELLI *et al.*, 2015; AL-KALI *et al.*, 2019).

A prevalência de MDSCs com atividades imunossupressoras demonstrou ser o principal mecanismo de escape do tumor do sistema imunológico. Xing, 2017 e Safarzadeh, 2018 mostraram expressões aumentadas das PMN-MDSC's e M-MDSCs no sangue periférico de pacientes com doenças renais crônicas e câncer de mama, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. No presente estudo também encontramos uma maior expressão das subpopulações, PMN-MDSC's e M-MDSC's, no grupo de pacientes com SMD quando comparado ao grupo controle. Porém, no estudo realizado por Qui, 2021, foram evidenciados resultados divergentes, ou seja, não houve diferença nos subtipos das MDSCs pela avaliação de 34 pacientes com SMD. Curiosamente, Safarzadeh, 2018, encontrou uma maior proporção da fração M-MDSC do que PMN-MDSC em pacientes com câncer de mama e Hyun, 2020 também encontrou essa mesma proporção avaliando 58 pacientes com LMA, ambos corroborando nossos resultados. De acordo com Zarobkiewicz, 2020, as M-MDSC's são provavelmente recrutadas da medula óssea e, em seguida, liberadas na circulação, onde podem se misturar com células malignas circulantes de origem hematopoiética, justificando essa diferença na proporção entre as duas subpopulações.

Apesar do mecanismo de expansão de M-MDSC em humanos não estar totalmente claro, ao analisar nossos resultados, pode-se observar uma maior expressão de M-MDSC em pacientes com SMD quando comparado ao grupo controle. Dado este que corrobora os achados de Zarobkiewicz, 2020 que analisou 110 pacientes com LLC encontrando expressão aumentada de M-MDSC nos pacientes quando comparado ao grupo controle. Apesar da literatura relatar a presença dos dois subtipos no sangue periférico, sabe-se que o subtipo M-MDSC é o mais prevalente no microambiente tumoral e complementarmente, é o que demonstra atividade imunossupressora mais atuante, quando comparada às PMN-MDSCs. Além disso, há uma notável mistura morfológica dessas células que compartilham múltiplas características fenotípicas e funcionais com outras populações de células de origem mielóides, representando uma dificuldade em sua identificação. (GABRILOVICH, 2015; QU; WANG; LIN, 2016; SAFARZADEH, 2018).

Ao categorizarmos nossos pacientes de acordo com IPSS-R, não foi observado uma diferença significativa nas expressões das M-MDSC's, porém foi observado um aumento significativo nas expressões de células MDSC's, bem como as PMN-MDSC's, em pacientes com alto e muito alto risco quando comparados ao grupo de

pacientes com muito baixo, baixo e intermediário risco. Corroborando os estudos realizados por Kittang, 2015 e Qui, 2020, os quais demonstraram um aumento da expressão das MDSC's em pacientes categorizados como intermediário, alto e muito alto risco, de acordo com o IPSS-R. Nossos resultados, portanto, podem sugerir a importância dessas células na vigilância imunológica, na supressão e facilitação da progressão da doença. No entanto, essa correlação precisa ser confirmada em uma coorte maior de pacientes.

A influência de citocinas pró- e anti-inflamatórias na patogênese da SMD está bem demonstrada (IVY, FERREL 2018; HAN 2020). A inflamação crônica, associada à ativação e expansão das células MDSC's, na medula óssea dos pacientes pode induzir a uma instabilidade do DNA e promover o surgimento e expansão do clone maligno. (ATRETKHANY, 2016; UMANSKY, 2016; LOPES-BUJANDA, 2017; IVY, FERREL 2018; PALUMBO, 2019)

IL-10 é uma citocina com papel paradoxo, agindo como anti-inflamatória ou pró-inflamatória, dependendo do estímulo recebido. De acordo com levantamento realizado por Yaseen 2020, a IL-10 pode mediar e regular as respostas imunológicas em níveis celular e molecular. Os papéis da IL-10 na carcinogênese têm sido discutidos em várias doenças como o câncer gástrico (CHEN, 2019); câncer de próstata (GARRIDO, 2021); doenças autoimunes (SAXENA, 2015); câncer de pulmão (ACUNER-OZBABACAN, 2014). Fisher e cols., 2021 demonstraram que em doenças mieloproliferativas, houve um aumento nos níveis de IL-10 em pacientes em estágio crônico, quando comparados ao grupo controle. Kasamatsu, em 2016, estudou polimorfismos do gene da IL-10, concluindo que estes polimorfismos podem não contribuir para a suscetibilidade à SMD, mas podem estar associados à gravidade e ao prognóstico da SMD.

D'Silva e cols, 2019 relataram que o aumento da IL-10 em pacientes com SMD está associado a uma ação anti-inflamatória, atuando negativamente no estado imune. No presente estudo, os níveis de IL-10 em nossos pacientes mostraram-se aumentados quando comparados ao grupo controle, levando à hipótese que níveis elevados de IL-10 podem estar associados à um pior prognóstico da doença, corroborando, portanto, com os estudos realizados por Han, 2020, o qual encontrou níveis mais elevados de IL-10 em pacientes com SMD de alto risco comparado aos pacientes de baixo risco, associando assim, a IL-10 com a progressão da SMD.

Vários estudos têm mostrado uma correlação diretamente proporcional entre a produção de IL-10 e a expansão de MDSCs no câncer, tais como: tumores de próstata, pulmão e estômago (HUTCHISON, 2019; HAN, 2020; YASEEN, 2020). Em outras palavras, as MDSC's estão entre os principais produtores de IL-10 que, por sua vez, medeia positivamente a expansão e recrutamento dessas células para o processo inflamatório local. Han e cols., 2020 estudaram a correlação entre a produção de IL-10 e as células MDSC's na SMD, porém os autores não encontraram correlação entre os níveis de IL-10 e a expansão das MDSC's, corroborando os nossos achados. Porém, é necessário expandir o número de amostras para melhorar essa associação.

Um dado interessante foi a correlação entre produção de IL-10 e os níveis de ferritina, revelando-se uma correlação negativa significativa, ou seja, o aumento da produção de IL-10 acontece de forma inversamente proporcional aos níveis de ferritina. Uma maior investigação é necessária num maior número de pacientes para confirmar e esclarecer essa associação.

A IL-13 atua principalmente como uma molécula anti-inflamatória que ativa monócitos / macrófagos levando a uma regulação positiva de vários genes envolvidos na resolução de inflamação. Saigusa, 2014 associou baixos níveis de IL-13 com um pior prognóstico no câncer de colórectal. Já Garrido e cols., 2021 não encontraram associação significativa entre a produção de IL-13 e pacientes avaliados com câncer de próstata. Na LMA, Kornblau e cols., 2010 encontrou um aumento significativo da IL-13 entre os 176 pacientes com LMA e caso controle, porém não obteve um resultado satisfatório ao avaliar 114 pacientes com SMD. Adicionalmente, no estudo de Nakayama e cols., 2017, com 9 amostras de medula óssea de pacientes com SMD não houve associação significativa entre IL-13 e a SMD. Contrariando os demais estudos, na presente análise observou-se uma associação significativa entre a produção de IL-13 em pacientes com SMD quando comparada ao grupo controle. Porém, a relação entre a patogênese da SMD e IL-13 ainda não está totalmente elucidada.

A IL-13 também parece ser fundamental para a funcionalidade das MDSCs no sistema imunossupressor. (GABITASS, 2011). Em relação à correlação entre a produção de IL-13 e a expressão das células MDSC's, Haist e cols., 2021 relataram uma correlação positiva e significativa entre os níveis de IL-13 e a proliferação do subtipo PMN-MDSC's em alguns tumores sólidos, como adenocarcinoma de ovário.

Leukes et al., 2021 mostrou pela primeira vez que os MDSCs suprimem a ativação de células T associada à produção de IL-13 em pacientes com tuberculose. Em nosso estudo, não houve correlação significativa entre a expressão das células MDSC's e os níveis de IL-13. Sabendo que nas formas iniciais da SMD há um predomínio do estado pró-inflamatório e que a IL-13 constitui uma interleucina anti-inflamatória, nossos dados se alicerçam na justificativa de que os pacientes incluídos nesse estudo são 75% pertencentes às formas iniciais da SMD, predominando assim, um estado pró-inflamatório da doença.

O IFN- $\gamma$  é produzido por linfócitos CD4+ e por células NK desempenhando um papel fundamental na ativação da imunidade celular como a apoptose, proliferação celular e recrutamento de leucócitos e, subsequentemente, na estimulação de resposta imune antitumoral. (JORGOVANOVIC, 2020). Morales-Mantilla, 2018, relatou que o aumento de IFN- $\gamma$  em pacientes com anemia aplástica afetou negativamente a hematopoese acarretando num desarranjo no processo de diferenciação celular.

Nos pacientes aqui avaliados, o nível sérico de IFN- $\gamma$  mostrou um aumento significativo nos pacientes com SMD comparado ao grupo controle, corroborando ~~em~~ o estudo realizado por D'Silva e colaboradores, 2019. Já na meta-análise realizada por Shi e cols., 2019, composta de 697 pacientes de 11 diferentes estudos, foi demonstrado haver uma diminuição significativa dos níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes com SMD do Ocidente quando comparados ao grupo controle. Um outro achado nessa meta-análise foi o aumento significativo de IFN- $\gamma$  em pacientes de baixo risco quando comparado aos pacientes de alto risco, segundo o IPSS-R. Sabe-se que a secreção de citocinas pró-apoptóticas, como IFN- $\gamma$ , encontra-se aumentada em alguns subtipos de SMD de baixo risco, enquanto que em pacientes de alto risco essa citocina está mais propensa a estar *downregulated* (SHI *et al.*, 2019). Contudo, nossos dados encontrados são justificados por serem constituídos por mais de 60% de pacientes categorizados como grupos de muito baixo, baixo e intermediário risco, gerando um resultado esperado com níveis de IFN- $\gamma$  aumentados em nosso grupo de pacientes avaliado.

As MDSC's são capazes de inibir a proliferação de células T CD8+, por mecanismo independente de MHC de classe I, mas dependente de IFN $\gamma$ . (MILLRUD, 2016; OSTRAND-ROSENBERG, 2018). Estudos realizados com camundongos, Zhu

e cols., 2021, encontraram uma correlação positiva significativa entre a produção de IFN- $\gamma$  e a expansão das células MDSC's. No estudo proposto por Haist, 2021 foi demonstrada uma correlação significativa entre a liberação do IFN- $\gamma$  e a diferenciação das células MDSC's em sua subpopulação PMN-MDSC's. Contrariamente não se observou uma correlação significativa entre os níveis de IFN- $\gamma$  e a expressão das células MDSC's, bem como de seus subtipos, M-MDSC's e PMN-MDSC's. Para elucidar esses questionamentos, são requeridos mais estudos que contemplem um número maior de pacientes.

A evolução de vários tipos de câncer está associada à angiogênese e metástase. Um mediador chave da angiogênese, o VEGF, está associado com mau prognóstico no câncer. (APTE, 2019; CECI 2020). Diante disso, é possível encontrar níveis aumentados de VEGF em fases mais avançadas da doença. Um estudo realizado com pacientes com LMA, Kornblau e cols., 2010 encontrou uma correlação positiva e significativa entre o aumento dos níveis de VEGF com sobrevida reduzida desses pacientes, porém não obteve um resultado satisfatório em pacientes com SMD. Nos resultados de Del Rey, 2013 e Santos e cols, 2019 não foram observadas diferenças entre os grupos. No presente estudo, foram encontrados níveis significativamente aumentados de VEGF em pacientes com SMD quando comparados ao grupo controle, corroborando os dados demonstrados por Albalawi e cols, 2020 em que níveis de VEGF foram maiores em mulheres com câncer de mama do que caso controle, favorecendo um papel fundamental na angiogênese do câncer de mama.

SMD é caracterizada pela hematopoese ineficaz e citopenias. Nesse estudo, foi observada uma correlação positiva e significativa entre a contagem de neutrófilos e o fator de crescimento endotelial vascular em pacientes com SMD. Tal observação nos faz achar que há uma maior produção de VEGF quando há maior estímulo da hematopoese, com o aumento no número de neutrófilos, promovendo assim, uma maior resposta imune inata. No entanto, faz-se necessário mais estudos para esclarecer o impacto desse achado na patogênese da SMD.

O VEGF, circulante no microambiente tumoral, atua como um quimio atrai para as MDSCs. Especificamente, o VEGF atrai os MDSCs para migrar da medula óssea para a periferia, aumentando assim sua presença na circulação sanguínea. A ligação do VEGF ao seu receptor está associada com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por meio da ativação da via JAK2 / STAT3.

Assim, as próprias MDSCs podem produzir VEGF, criando um ciclo de feedback positivo. (KANTHOU 2018; VETSIKA et al., 2019). Um estudo realizado por Horikawa e cols, 2020 revelou uma associação entre a expressão do gene que regula o VEGF no câncer de ovário e a indução das MDSCs, promovendo a progressão do tumor por meio da imunossupressão. No entanto, não há, na literatura, estudo que avalie os níveis séricos de VEGF e sua relação com a expressão de MDSC's. Nessa análise, não foi observada uma correlação significativa entre a expressão das MDSC's e os níveis séricos de VEGF, sugerindo que uma provável mudança na metodologia de detecção possamos obter resultados dentro do esperado.

Interações entre o microambiente medular através dos mediadores inflamatórios e a hematopoese ineficaz parecem ser determinantes na evolução da SMD. Complementarmente, nosso estudo revelou algumas associações significativas entre os níveis de interleucinas. Em nosso estudo, houve uma correlação positiva significativa entre os níveis de IL-10 e IFN- $\gamma$  ( $p < 0,001$ ); IL-10 e IL-13 ( $p < 0,001$ ); IL-10 e VEGF ( $p = 0,001$ ); IL-13 e IFN- $\gamma$  ( $p = 0,007$ ); IL-13 e VEGF ( $p = 0,001$ ); IFN- $\gamma$  e VEGF ( $p = 0,004$ ). Embora seja uma observação baseada em correlações fracas, é possível que esse estudo permita fazer uma hipótese sobre uma interdependência na produção dessas citocinas. Diante disso, observamos o quão importante é o papel desempenhado por inúmeros mediadores químicos no desenvolvimento da SMD.

Diversos são os fatores que, potencialmente, induzem a ativação, proliferação e disseminação das células MDSC's. A inibição dos efeitos das MDSC's (ou seja, por depleção das MDSC's ou indução da diferenciação) pode reverter o ambiente imunossupressor e restabelecer a vigilância imunológica na SMD. Embora a pesquisa biológica envolvendo as MDSCs tenha tido progresso, a relação entre a expressão das MDSC's, a secreção de citocinas e o prognóstico da SMD não está clara, e não há ainda critérios plausíveis para medir o estado funcional das MDSCs na SMD.

Por fim, ressaltamos que o presente estudo foi pioneiro a relacionar algumas interleucinas com a expressão das células MDSC's bem como seus subtipos, PMN-MDSC's e M-MDSC's, em pacientes portadores de SMD.

## 7. CONCLUSÕES

- A média de idade dos pacientes, distribuição quanto ao gênero, apresentação ao diagnóstico, classificação pela OMS e estratificação de risco pelo IPSS-R foram semelhantes a outros estudos brasileiros;
- Um aumento significativo do nível sérico de IL-10 foi observado na população de portadores de SMD estudada, quando comparada aos controles;
- Um aumento significativo do nível sérico de IL-13 foi observado na população de portadores de SMD estudada, quando comparada aos controles;
- Um aumento significativo do nível sérico de IFN- $\gamma$  foi observado na população de portadores de SMD estudada, quando comparada aos controles;
- Um aumento significativo do nível sérico de VEGF foi observado na população de portadores de SMD estudada, quando comparada aos controles;
- Adicionalmente, encontramos uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de VEGF e o número de neutrófilos foi observada na população de portadores de SMD estudada;
- Foi também observada uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de IL-13 foi observada na população de portadores de SMD estudada;
- Uma correlação negativa e significativa entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de ferritina foi observada na população de portadores de SMD estudada;
- Observou-se uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de IFN- $\gamma$  nos pacientes portadores de SMD;

- Os dados mostraram uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de IL-10 e os níveis de VEGF na população de portadores de SMD estudada;
- Houve uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de IL-13 e os níveis de IFN- $\gamma$  na população de portadores de SMD estudada;
- Uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos de IFN- $\gamma$  e os níveis de VEGF foi observada na população de portadores de SMD estudada;
- Foi observada uma maior expressão das células MDSC's nos pacientes categorizados como alto e muito alto risco quando comparados ao grupo muito baixo, baixo e risco intermediário;
- Houve um aumento significativo da expressão das células PMN-MDSC's nos portadores de SMD, quando comparado aos controles;
- Uma expressão significativa das células M-MDSC's foi observada nos pacientes portadores de SMD, quando comparada aos controles;
- É provável que as células MDSC's atuem ativamente no processo inflamatório como parte da patogênese da doença e possam constituir futuros alvos terapêuticos.

## 8. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier. 2012 p. 1-14.

ACUNER-OZBABACAN ES, ENGIN BH, GUVEN-MAIOROV E, KUZU G, et al. The structural network of Interleukin-10 and its implications in inflammation and cancer. **BMC Genomics**. 2014;15 Suppl 4(Suppl 4):S2.

ADÈS L, ITZYKSON R, FENAUX P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet**. 2014; 383(9936):2239–52.

AGRATI C, TUMINO N, BORDONI V, PINNETTI C, SABATINI A, et al. Myeloid Derived Suppressor Cells Expansion Persists After Early ART and May Affect CD4 T Cell Recovery. **Front. Immunol**. 2019. 10:1886.

ALBALAWI IA., MIR R., DUHIER FM. Genetic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) and Its Association with Disease Progression in Breast Cancer Population of Saudi Arabia. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2020. 21 (1), 139-145.

AL-KALI A, ZBLEWSKI D, FORAN JM, PATNAIK MS, et al. Outcome of Myelodysplastic Syndromes Over Time in the United States: A National Cancer Data Base Study From 2004-2013. **Mayo Clin Proc**. 2019 Aug;94(8):1467-1474.

APODACA MC., WRIGHT AE., RIGGINS AM., HARRIS WP., YEUNG RS., et al. Characterization of a whole blood assay for quantifying myeloid-derived suppressor cells. **Journal for ImmunoTherapy of Cancer** .2019. 7:230.

APTE RS., CHEN DS., FERRARA N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. **Cell**. 2019 March 07; 176(6): 1248–1264.

ARBER DA., et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. 2016. 19;127(20):2391-405.

BACHEGOWDA L, GLIGICH O, MANTZARIS I, SCHINKE C, WYVILLE D, CARRILLO T, BRAUNSCHWEIG I, STEIDL U, VERMA A. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes. **J Hematol Oncol**. 2013 Jul 10;6:50.

BÄCKDAHL, L.; BUSHELL, A.; BECK, S. Inflammatory signalling as mediator of epigenetic modulation in tissue-specific chronic inflammation. **The international journal of biochemistry & cell biology**. 2009. v. 41, n. 1, p. 176-184.

BANERJEE T, CALVI LM, BECKER MW, LIESVELD JL. Flaming and fanning: The Spectrum of inflammatory influences in myelodysplastic syndromes. **Blood Rev**. 2019 Jul;36:57-69.

BARDERAS R, BARTOLOME RA, FERNANDEZ-ACENERO MJ, TORRES S, CASAL JI. High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis. **Cancer Res** 2012;72(11):2780–2790.

BARREYRO L, CHLON TM, STARCZYNOWSKI DT. Chronic immune response dysregulation in MDS pathogenesis. **Blood**. 2018 Oct 11;132(15):1553-1560.

BASTIDA JM, LÓPEZ-GODINO O, VICENTE-SÁNCHEZ A, BONANAD-BOIX S, et al. Hidden myelodysplastic syndrome (MDS): A prospective study to confirm or exclude MDS in patients with anemia of uncertain etiology. **Int J Lab Hematol**. 2019 Feb;41(1):109-117.

BELLI C B, et al. Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **Amer. J. Hematol**. 2015. vol 90, n° 10.

BEJAR R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 2014;99(6):956-964.

BEN-NERIAH Y., KARIN M. Inflammation meets cancer, with NF- $\kappa$ B as the matchmaker. **Nature Immunology**, 2011.12: 715-723.

BERRAONDO, P., SANMAMED, M.F., OCHOA, M.C. et al. Cytokines in clinical cancer immunotherapy. **Br J Cancer** 120, 6–15 (2019).

BIZYMI N., BJELICA S., KITTANG A., MOJSILOVIC S., et al. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Hematologic Diseases: Promising Biomarkers and Treatment Targets. **Hemasphere**. 2019 Jan 28;3(1):e168.

BRADDOCK M., HANANIA NA., SHARAFKHANEH A., COLICE G., CARLSSON M. Potential Risks Related to Modulating Interleukin-13 and Interleukin-4 Signalling: A Systematic Review. **Drug Saf** (2018) 41:489–509.

BRENNER DR, SCHERER D, MUIR K., et al. A review of the application of inflammatory biomarkers in epidemiologic cancer research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2014 Sep;23(9):1729-51.

BRONTE V., BRANDAU S., CHEN S., COLOMBO MP., FREY A., et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **NATURE COMMUNICATIONS**. 2016. 7:1215.

CAO H, ZHANG J, LIU H, WAN L, ZHANG H, HUANG Q, XU E, LAI M. IL-13/STAT6 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer cells. **Oncotarget**. 2016 Sep 20;7(38):61183-61198.

CANDIDO J., HAGEMANN T. Cancer-Related Inflammation. **J Clin Immunol** (2013) 33 (Suppl 1): S79–S84.

CECI C., ATZORI MG., MIGUEL P., GRAZIANI G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and Its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. **Int. J. Mol. Sci**. 2020, 21, 1388.

CHEN J., FENG X., DESIERTO MJ., KEYVANFAR K., YOUNG NS. IFN-g-mediated hematopoietic cell destruction in murine models of immune-mediated bone marrow failure. **Blood**. 2015;126(24):2621-2631.

CHEN L, DENG H, CUI H, FANG J, ZUO Z, DENG J, LI Y, WANG X, ZHAO L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**. 2018 Dec 14;9(6):7204-7218.

CHEN L., SHI Y., ZHU W., GUO W., ZHANG M., CHE Y., et al. IL-10 secreted by cancer-associated macrophages regulates proliferation and invasion in gastric cancer cells via c-Met/STAT3 signaling. **Oncol Rep**.2019. (42): 595-604.

CONLON KC, MILJKOVIC MD, WALDMANN TA. Cytokines in the Treatment of Cancer. **J Interferon Cytokine Res**. 2019 Jan;39(1):6-21.

COSTANTINI S., CAPONE F., GUERRIERO E., CASTELLO F. An approach for understanding the inflammation and cancer relationship. **Immunology Letters** 126 (2009) 91–92.

CUI R, et al. Serum Iron metabolism and erythropoiesis in patients with myelodysplastic syndrome not receiving RBC transfusions. **Leuk Res.**; 38(5):545-550. 2015.

D'SILVA S, SUNIL B. R., SINGH M. Immune Dysregulation In Mds: The Role Of Cytokines And Immune Cells. 2019. DOI: 10.5772/intechopen.82101

DEL PRETE A., ALLAVENA P., SANTORO G., FUMARULO R., MASSIMILIANO. Molecular pathways in cancer-related inflammation. **Biochimica Medica** 2011;21(3):264–75.

DEL REY, M.; PERIACHO, M.; VELASCO, S.; et al. Alteration in Endoglin-Related Angiogenesis in Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia. **PLoS One** 2013. v.8, n.1, p.e53624.

DESAI SJ, PRICKRIL B., RASOOLY A. Mechanisms of Phytonutrient Modulation of Cyclooxygenase-2 (COX-2) and Inflammation Related to Cancer. **Nutr Cancer**. 2018 Apr;70(3):350-375.

DHABAL S., DAS P., BISWAS P., KUMARI P., VALENTIN P., et al. Regulation of monoamine oxidase A (MAO-A) expression, activity, and function in IL-13–stimulated monocytes and A549 lung carcinoma cells. **J. Biol. Chem.** (2018) 293(36) 14040 – 14064.

ECONOMOPOULOU, C.; PAPPA, V.; KONTSIOTI, F.; et al. Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow of adult de novo myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v.32, n.1, p. 61-69, 2008. Expert Review of Hematology, v. 11, n. 7, p. 577-86, 2018.

FIORANELLI M., GRAZIA RM. Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses

administration to low dose medicine new paradigm. **J Integr Cardiol**, 2014; Volume 1(1): 2-6.

FISHBEIN A., BRUCE D., CHARLES H., SERHAND N., PANIGRAHY D. Carcinogenesis: Failure of resolution of inflammation?. **Pharmacol Ther.** 2021 Feb;218:107670.

GABITASS RF.; ANNELS NE.; STOCKEN DD.; et al. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. **Cancer Immunol Immunother** (2011) 60:1419–1430.

GABRILOVICH DI., BRONTE V., CHEN SH., et al. The terminology issue for myeloid derived suppressor cells. **Cancer Res.** 2007; 67(1):425-426.

GABRILOVICH DI, NAGARAJ S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. **Nat Rev Immunol.** 2009 Mar;9(3):162-74.

GALDIERO MR, MARONE G, MANTOVANI A. Cancer Inflammation and Cytokines. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.** 2018 Aug;10(8).

GANGAT N; PATNAIK M.M.; TEFFERI A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **Am. J. Hematol.** 91:76–89, 2016.

GARRIDO MM, RIBEIRO RM, KRÜGER K, PINHEIRO LC, GUIMARÃES JT, HOLDENRIEDER S. Are Proinflammatory Cytokines Relevant for the Diagnosis of Prostate Cancer? **Anticancer Res.** 2021 Jun;41(6):3067-3073.

GATTERMANN, N. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS). **International Journal of Hematology.** 2018. v. 107, n. 1, p. 55-63.

GERMING U., KOBBE G., et al. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. **Deutsches Arzteblatt International**; 110(46): 783-790. 2013.

GLENTHØJ A., DUE ØRSKOV A., HANSEN J. W.; et al. Immune Mechanisms in Myelodysplastic Syndrome. **Int. J. Mol. Sci.**, 17, 944. 2016.

GÓMEZ G., WEI Y., COLLA S. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**; (29):1458-1469. 2015.

GREENBERG P L, TUECHLER H, SCAHNZ J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**; vol 120 (12): 2454-2465. 2012.

GREENBERG P, COX C, LEBEAU MM.; et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood** 89:2079-88, 1997.

GRETEN F R., GRIVENNIKOV S I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity.** 2019 Jul 16;51(1):27-41.

HAIST M.; STEGE H.; GRABBE S.; BROS M. The Functional Crosstalk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and Regulatory T Cells within the Immunosuppressive Tumor Microenvironment. **Cancers** 2021, 13, 210.

HAN D., TAO J., FU R., SHAO Z. Myeloid-derived suppressor cell cytokine secretion as prognostic factor in myelodysplastic syndromes. **Innate Immunity** 2020, Vol. 26(8) 703–715.

HASSERJIAN RP. Myelodysplastic Syndrome Updated. **Pathobiology**. 2019;86(1):7-13.

HE Q. LIU F. Unexpected role of inflammatory signaling in hematopoietic stem cell development: its role beyond inflammation. **Curr Opin Hematol.**, 23:18-22. 2016.

HEIDLAND A., KLASSEN A., RUTKOWSKI, P., BAHNER, U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**. 2016:19(Suppl. 10), S102–S109.

HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; MALCOVATI, L. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.22, p.75-91. 2008.

HUTCHISON S, SAHAY B, DE MELLO SC, SAYOUR EJ, et al. Characterization of myeloid-derived suppressor cells and cytokines GM-CSF, IL-10 and MCP-1 in dogs with malignant melanoma receiving a GD3-based immunotherapy. **Vet Immunol Immunopathol**. 2019 Oct;216:109912.

HYUN SY, JUNG NA E, JANG JI, CHUNG H, et al. Immunosuppressive role of CD11b+CD33+HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells-like blast subpopulation in acute myeloid leucemia. **Cancer Medicine**, V 9, p. 7007-7017. 2020.

INVERNIZZI R, QUAGLIA F *et al*. Importance of classical morphology in the diagnosis of Myelodysplastic Syndrome. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**; 7(1). 2015.

IVY KS, BRENT FERRELL P JR. Disordered Immune Regulation and its Therapeutic Targeting in Myelodysplastic Syndromes. **Curr Hematol Malig Rep**. 2018 Aug;13(4):244-255.

JORGOVANOVIC D., SONG M., WANG L., ZHANG Y. Roles of IFN- $\gamma$  in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research** (2020) 8:49.

KANTHOU C., TOZER G. Targeting the vasculature of tumours: combining VEGF pathway inhibitors with radiotherapy. **Br J Radiol** 2019; 92: 20180405.

KASAMATSU T, SAITOH T, MINATO Y, SHIMIZU H, YOKOHAMA A., et al. Polymorphisms of IL-10 affect the severity and prognosis of myelodysplastic syndrome. **Eur J Haematol**. 2016 Mar;96(3):245-51.

KASI LOKNATH KUMAR A.; WECKBAUGH B.; SIRRIDGE C.; et al. Myelodysplastic Syndrome with concomitant t(5;21)(q15;q22) and del(5q)(q13q33): case report and review of literature. **Stem Cell Investig**; 3:3. 2016.

KAY J., THADHANI E., SAMSON L., ENGELWARD B. Inflammation-induced DNA damage, mutations and cancer. **DNA Repair** 2019;83: 102673.

KIDANE D., CHAE WI., CZOCHOR J., ECKERT KA., GLAZER PM., et al. Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**. 2014;49:2,116-139.

KIRKWOOD KL., ZHANG L., THIYAGARAJAN R., SELDEEN KL., TROEN BR. Myeloid-Derived Suppressor Cells at the Intersection of Inflammation and Bone Fragility. **Immunological investigations**. 2018, VOL. 47, NO. 8, 844–854.

KITTANG AO, KORDASTI S, SAND KE, COSTANTINI B, et al. Expansion of myeloid derived suppressor cells correlates with number of T regulatory cells and disease progression in myelodysplastic syndrome. **Oncoimmunology**. 2015 Jun 24;5(2):e1062208.

KONG YY, FUCHSBERGER M, XIANG SD, APOSTOLOPOULOS V, PLEBANSKI M. Myeloid derived suppressor cells and their role in diseases. **Curr Med Chem**. 2013;20(11):1437-44.

KORNBLAU SM., MCCUE D., COOMBES KR., et al. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. **Blood**. 2010. Nov 18; 116(20): 4251-4261.

KULLING PM., OLSON K., HAMELE CE., TORO MF., et al. Dysregulation of the IFN- $\gamma$ -STAT1 signaling pathway in a cell line model of large granular lymphocyte leukemia. **PLoS ONE** 13(2): e0193429.

KUSMARTSEV S., GABRILOVICH DI. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. **Cancer Immunol Immunother**. 2006; 55(3): 237-245.

KWILASZ A.J., GRACE P.M, SERBEDZIJA P., MAIER S.F., WATKINS L.R. The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. **Neuropharmacology**. 2015; 96(Pt A): 55–69.

LASFAR A, ABUSHAHBA W, BALAN M, COHEN-SOLAL KA. Interferon lambda: a new sword in cancer immunotherapy. **Clin. Dev. Immunol**. 2011 349575.

LASFAR A., GOGAS H., ZLOZA A., KAUFMAN H. KIRKWOOD JM. IFN- $\lambda$  cancer immunotherapy: new kid on the block. **Immunotherapy** (2016) 8(8), 877–888.

LAW AMK.; VALDES-MORA F.; GALLEGU-ORTEGA D. Myeloid-Derived Suppressor Cells as a Therapeutic Target for Cancer. **Cells** 2020, 9, 561.

LAZEAR HM., NICE TJ., DIAMOND MS. Interferon-I: Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. **Immunity**. 2015: (43):15-28.

LEE, E. J. et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood.**; 30(1):1-10.2015.

LEUKES VN, DORHOI A, MALHERBE ST, MAASDORP E., et al. Targeting of myeloid-derived suppressor cells by all-trans retinoic acid as host-directed therapy for human tuberculosis. **Cell Immunol.** 2021 Jun;364:104359.

LI AJ., CALVI LM. The microenvironment in myelodysplastic syndromes: nichemediated disease initiation and progress. **Exp Hematol.** 2017 November ; 55: 3–18.

LIU Y., JIADI LV., LIU J., LIANG X., JIN X., et al. STAT3/p53 pathway activation disrupts IFN- $\beta$ -induced dormancy in tumor-repopulating cells. **J Clin Invest.** 2018;128(3):1057–1073.

LV M., WANG K., HUANG X. Myeloid-derived suppressor cells in hematological malignancies: friends or foes. **J Hematol Oncol** 12, 105 (2019).

MA X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **The Amer. J. Med.:** 125, S2-S5. 2012.

MAGALHÃES S M M, HEREDIA F F, FERNANDES L C M, *et al.* Beyond race-related disparities: is myelodysplastic syndrome the same everywhere? **Leukemia & Lymphoma**; 54(7): 1564-1566. 2013.

MAGALHÃES S. M. M. Síndromes Mielodisplásias – diagnóstico de exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; 28(3): 175-177. 2006.

MAGALHAES, SILVIA M. M. et al. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis Between Different Geographic Areas. **Blood. Washington: Amer Soc Hematology**, v. 116, n. 21, p. 785-786, 2010.

MALCOVATI L. LINDBERG E. H. BOWEN D. ADES L., CERMAK J. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the Europe LeukemiaNet. **Blood**, (17): 122. 2013.

MALCOVATI, L. et al. A WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) for Predicting Survival in Myelodysplastic Syndromes. **Blood.** 2005. v. 106, n. 11, p.788.

MANNINO MH. ZHU Z., XIAO H. BAI Q., WAKEFIELD MR., FANG Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. **Cancer Letters** . 2015. (367):103-107.

MARONE G, GRANATA F, PUCINO V, et al. The Intriguing Role of Interleukin 13 in the Pathophysiology of Asthma. **Front Pharmacol.** 2019 Dec 6;10:1387.

MARTIN-HIJANO L., SAINZ B JR. The Interactions Between Cancer Stem Cells and the Innate Interferon Signaling Pathway. **Front. Immunol.** 2020 Mar 31;11:526.

MARVEL D, GABRILOVICH DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. **J Clin Invest**. 2015 Sep;125(9):3356-64.

MATOS A, MAGALHÃES SMM, RAUH MJ. Immune Dysregulation and Recurring Mutations in Myelodysplastic Syndromes Pathogenesis. **Adv Exp Med Biol**. 2021 Jan 1.

MATOS AG, JUNIOR HLR, CASTRO MF, GONÇALVES RP, PINHEIRO RF, MAGALHÃES SMM. IL-8 and NF-κB are correlated in the myelodysplastic syndrome inflammatory response. **American Journal of Hematology. Med Oncol**. 2017 Aug 30;34(10):168.

MCCORMICK SM, HELLER NM. Commentary: IL-4 and IL-13 receptors and signaling. **Cytokine**. 2015 Sep;75(1):38-50.

MEHTA, P., MCAULEY, D. F., BROWN, M., et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. **Lancet** . 2020. 395(10229), 1033–1034.

MENDONÇA, P.D.S.; PINHEIRO, R.F.; MAGALHÃES, S.M.M. Myelodysplastic syndrome over time: a comparative analysis of overall outcome. **Mayo Clinic Proceedings**. 2019. v. 94, n. 12, p. 2593-94.

MILLRUD CR., BERGENFELZ C., LEANDERSSON K. On the origin of myeloid – derived suppressor cells. **Oncotarget** 2017; 8: 3649-3665.

MINTY A, CHALON P, DEROCQ JM, et al. Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. **Nature**. 1993; 362:248–50.

MOCELLIN S., PANELLI MC., WANG E., NAGORSEN D., MARINCOLA FM. The dual role of IL-10, Trends **Immunol**. 24 (2003) 36–43.

MOJIC M., TAKEDA K., HAYAKAWA Y. The Dark Side of IFN-γ: Its Role in Promoting Cancer Immuno-evasion. **Int. J. Mol. Sci**. 2018, 19, 89.

MORALES DE., KING KY. The Role of Interferon-Gamma in Hematopoietic Stem Cell Development, Homeostasis, and Disease. **Current Stem Cell Reports** (2018) 4:264–271.

MOSSER DM., ZHANG X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunological reviews**. 2008. (226): 205-218.

MUNN L. L. Cancer and inflammation. **WIREs Syst Biol Med** volume 9, issue 2, Pe1370 2016 DOI: 10.1002/wsbm.1370

MURRAY PJ. The JAK-STAT Signaling Pathway: Input and Output Integration. **J Immunol** 2007; 178:2623-2629.

NADAL C., BÉGUIN J., BENCHEKROUN G., LE ROUX D. The myeloid derived suppressor cells: Who are they? Can they be used as a diagnostic tool to investigate

metastasis in veterinary medicine?. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 2018 Dec;61:5-8.

NAKAYAMA S, YOKOTE T, HIRAOKA N, AKIOKA T, NISHIWAKI U, et al. Transforming growth factor  $\beta$ - and interleukin 13-producing mast cells are associated with fibrosis in bone marrow. **Hum Pathol.** 2017 Apr;62:180-186.

OFT M. IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. **Cancer Immunol Res.** 2014 Mar;2(3):194-9.

OH CK., GEBA GP., MOLFINO N. Investigational therapeutics targeting the IL-4/IL-13/STAT-6 pathway for the treatment of asthma. **Eur Respir Rev** 2010; 19: 115, 46–54.

OSTRAND-ROSENBERG S., FENSELAU C. Myeloid-derived suppressor cells: Immune suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment. **J Immunol.** 2018 January 15; 200(2): 422–431.

PARKER KH., DANIEL W. BEURY, AND SUZANNE OSTRAND-ROSENBERG. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. **Adv Cancer Res.** 2015; 128: 95–139.

POON, N., DIGHE, HWANG Y. Bone marrow MSCs in MDS: contribution towards dysfunctional hematopoiesis and potential targets for disease response to hypomethylating therapy. **Leukemia.** 2019; 33(6): 1542.

PRATS-MARTÍN C., BURILLO-SANZ S., MORALES-CAMACHO RM., LÓPEZ OP., et al. ASXL1 mutation as a surrogate marker in acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes and normal karyotype. **Cancer Medicine.** 2020; 9:3637–3646.

QI X., JIANG H., LIU P., et al. Increased myeloid-derived suppressor cells in patients with myelodysplastic syndromes suppress CD8+ T lymphocyte function through the STAT3-ARG1 pathway. **Leuk Lymphoma.** 2021 Jan;62(1):218-223.

QU X., TANG Y., HUA S. Immunological Approaches Towards Cancer and Inflammation: A Cross Talk. **Front Immunol.** 2018 Mar 20;9:563.

RALLIS KS, CORRIGAN AE, DADAH H, GEORGE AM, KESHWARA SM, SIDERIS M, SZABADOS B. Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. **Anticancer Res.** 2021 Jul;41(7):3247-3252.

SAIGUSA S., TANAKA K., INOUE Y., TOIYAMA Y., OKUGAWA Y., et al. Low Serum Interleukin-13 Levels Correlate with Poorer Prognoses for Colorectal Cancer Patients. **Int Surg.** 2014; 99:223–229.

SALLMAN DA, LIST A. The central role of inflammatory signaling in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Blood.** 2019 MAR 7;133(10):1039-1048.

SARAIVA M., O'GARRA A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**. 2010 Mar;10(3):170-81.

SAFARZADEH E, HASHEMZADEH S, DUIJF PHG, MANSOORI B, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells: An independent prognostic factor in patients with breast cancer. **J Cell Physiol**. 2019 Apr;234(4):3515-3525.

SANTOS TEJ. Estudo da expressão dos genes tp53, vegfa e hif1 $\alpha$  em pacientes com síndrome mielodisplásica, citopenia idiopática de significado indeterminado e citopenias não neoplásicas: associação com citocinas e fatores de prognóstico. 2019.

SAXENA A., KHOSRAVIANI S., NOEL S., MOHAN D., DONNER T., RAHIM A., HAMAD A. Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. **Cytokine**. 2015. (74):27-34.

SCHRODER M, MEISEL C, BUHL K, PROFANTER N, SIEVERT N, VOLK HD, et al. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. **J Immunol**. 2003; 170:5260–5267.

SHHRABI S, KHOSRAVI A., SHAHJAHANI M., RAHIM F., et al. Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights. **Oncology Reviews** 2016; volume 10:311.

SEYFIZADEH N., GHARIBI T., BABALOO Z. Interleukin-13 as an important cytokine: A Review On Its Roles In Some Human Diseases. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. 2015; 62 (4), pp. 341–378.

SHAMMO JM, KOMROKJI RS. Clinical consequences of iron overload in patients with myelodysplastic syndromes: the case for iron chelation therapy. **Expert Rev Hematol**. 2018 Jul;11(7):577-586.

SHI X., ZHENG Y., XU L., CAO C., DONG B, et al. The inflammatory cytokine profile of myelodysplastic syndromes A meta-analysis. **Medicine** (2019) 98:22.

SINGH N, BABY D, RAJGURU JP, PATIL PB, THAKKANNAVAR SS, PUJARI VB. Inflammation and Cancer. **Ann Afr Med**. 2019 Jul-Sep;18(3):121-126.

SNETSINGER B, FERRONE CK, RAUH MJ. Targeted, Amplicon-Based, Next-Generation Sequencing to Detect Age-Related Clonal Hematopoiesis. **Methods Mol Biol**. 2019;2045:167-180.

STARCZYNOWSKI DT., KARSAN A. Innate Immune Signaling in the Myelodysplastic Syndromes. **Hematol Oncol Clin N Am** 24 (2010) 343–359.

STEENSMA D P. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Treatment. **Mayo Clinic**; 90(7): 969-983. 2015.

STRUPP C, NACHTKAMP K, HILDEBRANDT B., et al. New proposals of the who working group (2016) for the diagnosis of myelodysplastic syndromes (MDS): characteristics of refined MDS types. **Leuk Res**. 2017 Jun;57:78-84.

SUZUKI A., LELAND P., JOSHI BH., PURI RK. Targeting of IL-4 and IL-13 receptors for cancer therapy. **Cytokine**. 2015 Sep;75(1):79-88.

SYED K., NAGUIB S., LIU ZJ., CIMMINO L., YANG FC. Novel combinations to improve hematopoiesis in myelodysplastic syndrome. **Stem Cell Research & Therapy** (2020) 11:132.

TABERNERO J. The Role of VEGF and EGFR Inhibition: Implications for Combining Anti-VEGF and Anti-EGFR Agents. **Mol Cancer Res** 2007;5(3).

TCYGANOV E.; MASTIO J.; CHEN E.; GABRILOVICH D. Plasticity of myeloid-derived suppressor cells in cancer. **Current Opinion in Immunology** 2018, 51:76–82.

THACI B., BROWN CE., BINELLO E., WERBANETH K., SAMPATH P., et al. Significance of interleukin-13 receptor alpha 2 – targeted glioblastoma therapy. **Neuro-Oncology**. 2014: 16(10), 1304–1312.

THOMPSON P., KHATAMI M., BAGLOLE CJ., et al. Environmental immune disruptors, inflammation and cancer risk. **Carcinogenesis**, Volume 36, Issue Suppl\_1, June 2015, Pages S232–S253.

TSANG E., LEITCH HA., Pre- and post treatment serum ferritin levels in patients with higher risk myelodysplastic syndromes receiving azacitidine. **Leukemia & Lymphoma** 2016. Nov;57(11):2709-11.

UMANSKY V., BLATTNER C., GEBHARDT C., UTIKAL J. The role of Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in cancer progression. **Vaccines (Basel)**. 2016 Nov 3;4(4):36.

VALDÉS-FERRADA J, MUÑOZ-DURANGO N, PÉREZ-SEPULVEDA A, et al. Peripheral Blood Classical Monocytes and Plasma Interleukin 10 Are Associated to Neoadjuvant Chemotherapy Response in Breast Cancer Patients. **Front Immunol**. 2020;11:1413.

VALKA J., VESELAA J., VOTAVOVA H., DOSTALOVA-MERKEROVAA M., URBANOVA Z., et al. Genetic Variant Screening of DNA Repair Genes in Myelodysplastic Syndrome Identifies a Novel Mutation in the XRCC2 Gene. **Oncol Res Treat**. 2019;42:263–268.

VEGLIA F., SANSEVIERO E., GABRILOVICH D. Myeloid-derived suppressor cells in the era of increasing myeloid cell diversity. **Nature Reviews | Immunology**. 2021. 21, pages485–498.

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

VEIGA CB., LAWRENCE EM., MURPHY AJ., HEROLD MJ., DRAGOLJEVIC D. Myelodysplasia Syndrome, Clonal Hematopoiesis and Cardiovascular Disease. **Cancers** 2021. 13:1968.

VETSIKA EK., KOUKOS A., KOTSAKIS A. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Major Figures that Shape the Immunosuppressive and Angiogenic. **Cells**. 2019, 8, 164.

WANG X., WONG K., OUYANG W., RUTZ S. Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2019;11:a028548.

WANG Y.; DING Y.; DENG Y.; ZHENG Y., WANG S. Role of myeloid-derived suppressor cells in the promotion and immunotherapy of colitis-associated cancer. **Journal for Immunotherapy of Cancer** 2020;8:e000609.

WOLACH O., STONE R. Autoimmunity and inflammation in Myelodysplastic Syndromes. **Acta Haematol**; 136: 108-117. 2016.

XING YF, CAI RM, LIN Q, YE QJ, et al. Expansion of polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in patients with end-stage renal disease may lead to infectious complications. **Kidney Int**. 2017 May;91(5):1236-1242.

XIONG B., NIE Y., YU Y., WANG S., ZUO X. Reduced miR-16 levels are associated with VEGF upregulation in high-risk myelodysplastic syndromes. **Journal of cancer**. 2021; 12(7): 1967-1977.

YANG L, DEBUSK LM, FUKUDA K, FINGLETON B, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. **Cancer Cell**. 2004; 6:409–421.

YANG L, QIAN Y, EKSIOGLU E, EPLING-BURNETTE PK, WEI S. The inflammatory microenvironment in MDS. **Cell Mol Life Sci**. 2015 May;72(10):1959-66.

YANG LI, LIN C. Mechanisms that drive inflammatory tumor microenvironment, tumor heterogeneity, and metastatic progression. **Semin Cancer Biol**. 2017; 47: 185–195.

YASEEN MM, ABUHARFEIL NM, DARMANI H, Daoud A. Recent advances in myeloid-derived suppressor cell biology. **Front Med**. 2021 Apr;15(2):232-251.

Z. SU; P.NI; C. ZHOU; J. WANG. Myeloid-derived suppressor cells in cancer and inflammatory diseases: angel or demon?. **Journal of Immunology**. 2016: 255-261.

ZAROBKIEWICZ M, KOWALSKA W, CHOCHOLSKA S, TOMCZAK W, et al. High M-MDSC Percentage as a Negative Prognostic Factor in Chronic Lymphocytic Leukaemia. **Cancers (Basel)**. 2020 Sep 14;12(9):2614.

ZHAO S, WU D, WU P, WANG Z, HUANG J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. **PLoS One**. 2015 Oct 6;10(10):e0139598.

ZHU J, INOMATA T, FUJIMOTO K, UCHIDA K, FUJIO K., et al. Ex Vivo-Induced Bone Marrow-Derived Myeloid Suppressor Cells Prevent Corneal Allograft Rejection in Mice. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 2021 Jun 1;62(7):3.

ZINI, G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. **Ann Lab Med** 2017; 37:465-474.

ZINGER ADAR,CHO WILLIAM C,BEN-YEHUDA ARIE. Cancer and Aging - the Inflammatory Connection[J]. **Aging and disease**, 2017, 8(5): 611-627.

# **ANEXOS**

## Anexo I: Instrumento de coleta dos dados paciente

### INSTRUMENTO DE COLETA

Ambulatório de Hematologia – Hosp Universitário Walter Cantídio

Paciente:

Prontuário:

Data Nascimento:

Data Diagnóstico:

Classificação da SMD:

Dados Hemograma:

Hemoglobina	
Plaquetas	
Leucócitos	
Neutrófilos	
Reticulócitos	

Mielograma:

% Blastos:

Biópsia:

Cariótipo:

Classificação IPSS-r:

Medicamentos em uso:

Coomorbidades:

Ferritina:

Dependência Transfusional: ( ) Sim ( ) Não

## ANEXO II: Aprovação do comitê de ética em pesquisa da UFC.

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CÉLULAS SUPRESSORAS DERIVADAS MIELÓIDES (MDSC's) COMO REGULADORAS DOS MECANISMOS IMUNOLÓGICOS EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS

**Pesquisador:** anacelia gomes de matos mota

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 88318318.9.0000.5054

**Instituição Proponente:** Departamento de Medicina Clínica da Universidade Federal do Ceará

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.812.259

#### Apresentação do Projeto:

O ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Universitário Cantídio - UFC possui mais de 100 pacientes cadastrados. Diante disso, pretende-se avaliar o perfil inflamatório de no mínimo 100 pacientes. O estudo é do tipo transversal analítico. A seleção dos participantes será feita no ambulatório através da adesão espontânea dos pacientes devidamente cadastrados e atendidos pela instituição, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Serão incluídos nos casos todos os participantes acima de 18 anos, de ambos os sexos, que tenham diagnóstico de SMD, confirmados por diagnóstico laboratorial, segundo os critérios da OMS (2008). Serão utilizadas, para fins comparativos, amostras de indivíduos saudáveis não fumantes, não etilistas, não obesos, sem infecção e que apresentem exames hematológicos e bioquímicos dentro dos valores normais, pareados de acordo com o sexo e a idade e em número correspondente ao de participantes do estudo. Para a quantificação das células MDSC's, será utilizado o citômetro de fluxo com a análise feita pela emissão de fluorescência das células (FACS - Fluorescence Activated Cell Sorter). Serão coletadas amostras de 10ml de sangue periférico e medula em tubos estéreis com EDTA. As células da amostra em suspensão serão marcadas com reagentes fluorescentes específicos e serão introduzidas numa câmara de fluxo vibratória. Para a determinação das citocinas (IL-1, IL-6, IL-10 e IL-13) e fator de crescimento (VEGF) serão realizadas por ELISA (Biosciense), para a qual serão coletados 10mL de sangue periférico em tubo

Continuação do Parecer: 2.812.259

vacutainer contendo gel separador.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar a relação das células MDSC's na regulação do sistema imunológico e correlacioná-los com os níveis séricos de IL-1, IL-6, IL-10, IL-13 em portadores de síndrome mielodisplásica de baixo e alto risco acompanhados no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC).

**Objetivo Secundário:**

-Mensurar a proporção destas células MDSC's em sangue periférico e na medula óssea;-Mensurar os níveis séricos de VEGF nos indivíduos estudados;-Correlacionar os níveis de VEGF com a proliferação dessas células MDSC's;-Mensurar os níveis séricos de IL-1, IL-6, IL-10 e IL-13 nos indivíduos estudados;-Correlacionar as interleucinas mensuradas na proliferação destas células;-Avaliar os marcadores fenotípicos que caracterizam as células MDSC's;-Diferenciar os marcadores para a população de células PMN-MDSC's da população de células M-MDSC's ;-Correlacionar os marcadores fenotípicos CD14/CD11b/CD15/CD66b com a população de células PMN-MDSC's;-Correlacionar os marcadores fenotípicos CD11b/CD14/HLA-DR/CD15 com a população de células M-MDSC's;-Diferenciar a ativação destas células nos subtipos de SMD e correlacioná-los ao seu prognóstico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Este estudo apresenta risco, como desconforto ou/e constrangimento, por conta do preenchimento da ficha de coleta de dados e presença de dor, infecção e manchas arroxeadas na região da coleta de sangue que será realizado no momento da entrevista pela própria pesquisadora, caso seja autorizado. Esses riscos são minimizados pelo sigilo das informações prestadas, bem como a realização dos procedimentos por profissionais qualificados e o oferecimento de apoio e/ou assistência para o pesquisado, caso seja necessário ou solicitado. Vale ressaltar que esses riscos são abolidos a partir do momento que tomar a decisão de não autorizar a coleta de dados ou a retirada do seu consentimento em qualquer momento da pesquisa.

**Benefícios:**

A presente pesquisa trará benefícios ao paciente tratando-se de melhor avaliação quanto ao diagnóstico, avaliação do seu perfil inflamatório direcionando-o a um tratamento mais específico.

**Endereço:** Rua Cel. Nunes de Melo, 1000

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-275

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8344

**E-mail:** [comep@ufc.br](mailto:comep@ufc.br)

UFC - UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ /



Continuação do Parecer: 2.812.259

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para a área estudada pois trará benefícios ao paciente tratando-se de melhor avaliação quanto ao diagnóstico, avaliação do seu perfil inflamatório direcionando-o a um tratamento mais específico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos de apresentação obrigatória foram devidamente apresentados. Conforme solicitado a pesquisadora refez TCLE bem como reformulou os riscos da pesquisa.

**Recomendações:**

Não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplica.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1059625.pdf	28/06/2018 00:34:05		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetofinal.pdf	28/06/2018 00:33:30	anacelia gomes de matos mota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	28/06/2018 00:32:53	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Outros	InstrumentodeColeta.pdf	17/04/2018 05:10:31	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	17/04/2018 05:08:38	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	17/04/2018 05:07:36	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	19/02/2018 22:04:41	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadora.pdf	19/02/2018 21:48:29	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	fiel.pdf	19/02/2018 21:46:22	anacelia gomes de matos mota	Aceito
Declaração de	hospital.pdf	19/02/2018	anacelia gomes de	Aceito

## Anexo III: Artigos publicados.

> *Int J Hematol.* 2020 May;111(5):742-744. doi: 10.1007/s12185-020-02848-3. Epub 2020 Mar 9.

### **Do small increases in serum ferritin impact prognosis in lower-risk MDS patients?**

Anacelia Gomes de Matos Mota <sup>1 2</sup>, Priscila da Silva Mendonça <sup>3 4 5</sup>,  
Howard Lopes Ribeiro Junior <sup>3 4 6</sup>, Ana Patrícia Nogueira Aguiar <sup>3 4</sup>,  
Ronald Feitosa Pinheiro <sup>3 4 7</sup>, Silvia Maria Meira Magalhães <sup>3 4 7</sup>

Affiliations

PMID: 32152878 DOI: 10.1007/s12185-020-02848-3

## Immune Dysregulation and Recurring Mutations in Myelodysplastic Syndromes Pathogenesis

Anacélia Matos, Silvia M. M. Magalhães, and Michael J. Rauh

### Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal stem cell malignancies characterized by ineffective hematopoiesis leading to peripheral cytopenias and variable risk of progression to acute myeloid leukemia. Inflammation is associated with MDS pathogenesis. Several cytokines, reactive species of oxygen/nitrogen and growth factors are directly or indirectly involved in dysfunction of the MDS bone marrow (BM) microenvironment. Mutations in genes mainly regulating RNA splicing, DNA methylation and chromatin accessibility, transcription factors, signal transduction and

the response to DNA damage contribute to 25  
ineffective hematopoiesis, genomic instability 26  
and MDS development. The inflammation- 27  
associated DNA damage in hematopoietic 28  
stem cells may also contribute to MDS devel- 29  
opment and progression with aggressive clinical 30  
characteristics. Many studies have aimed at 31  
clarifying mechanisms involved in the activity 32  
of immature myeloid cells as powerful 33  
modulators of the immune response and their 34  
correlation with aging, autoimmunity, and 35  
development of cancer. In this review, we 36  
explore recent advances and accumulating evi- 37  
dence uniting immune dysregulation, 38  
inflammaging and recurring mutations in the 39  
pathogenesis of MDS. 40

Authors Silvia M. M. Magalhães and Michael J. Rauh have equally contributed to this chapter.



## Cytokine

Available online 12 June 2021, 155617

In Press, Corrected Proof 



# Plasma IL-33 levels are decreased in patients with high-risk myelodysplastic syndrome and show no correlation with pro-inflammatory IL-6 levels

Luciana de Brito Falcão <sup>a, b</sup>  , Anacélia Gomes de Matos <sup>a, b</sup>, Deysi Viviana Tenazoa Wong <sup>c</sup>, Roberto César Pereira Lima-Júnior <sup>d</sup>, Priscila da Silva Mendonça <sup>a, b, e</sup>, Ana Patrícia Nogueira Aguiar <sup>a, b</sup>, Roberta Taiane Germano de Oliveira <sup>a, b</sup>, Emanna Odília de Castro Lima <sup>a, b</sup>, Ronald Feitosa Pinheiro <sup>a, b, f</sup>, Sílvia Maria Meira Magalhães <sup>a, b, g</sup>

--