

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

**Fundação Oswaldo Cruz**

Instituto Aggeu Magalhães

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Iasmyn Dayanne Santos do Nascimento

**Atividade de moléculas imunoreguladoras e efetoras na recuperação medular pós-quimioterapia e seu valor prognóstico nas leucemias**

Recife

2023

Iasmyn Dayanne Santos do Nascimento

**Atividade de moléculas imunoreguladoras e efetoras na recuperação medular pós-quimioterapia e seu valor prognóstico nas leucemias**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Recife

2023

Título do trabalho em inglês: Activity of immunoregulatory and effector molecules in medullary recovery after chemotherapy and its value prognosis in leukemia.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) - Código de Financiamento 001.

N244a Nascimento, Iasmyn Dayanne Santos do.  
Atividade de moléculas imunoreguladoras e efetoras na recuperação medular pós quimioterapia e seu valor prognóstico nas leucemias / Iasmyn Dayanne Santos do Nascimento. -- 2023.  
136 p. : il. color, fotos, mapas.

Orientadora: Norma Lucena Silva.  
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, 2023.  
Bibliografia: f. 101-110.

1. Leucemia. 2. Vesículas extracelulares. 3. Antígenos HLA-G. 4. Inibidores de Checkpoint Imunológico. I. Título.

CDU 577.27

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239  
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

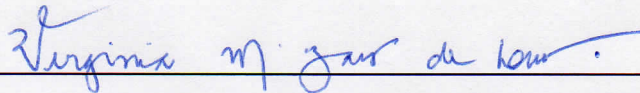
Iasmyn Dayanne Santos do Nascimento

**Atividade de moléculas imunoreguladoras e efetoras na recuperação medular pós-quimioterapia e seu valor prognóstico nas leucemias**

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 25 de setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA



---

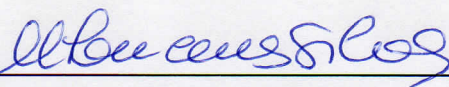
Dr<sup>a</sup>. Virginia Maria Barros de Lorena

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr<sup>a</sup>. Renata dos Santos Almeida

Ministério da Saúde do Brasil



---

Dr<sup>a</sup>. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho em memória da minha avó Maria de Lourdes Augusta dos Santos e da minha bisavó Noemia Batista, as matriarcas da minha família que sempre me incentivaram a estudar e a entregar o meu melhor.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pelo privilégio da vida, pela saúde e por ter me conduzido do início ao fim desse projeto.

Agradeço a minha família pelo apoio e solidariedade, em especial aos meus pais, Inajara Santos do Nascimento e Marcos Venicius Batista do Nascimento, vocês são e sempre serão a minha base e meu alicerce, todas as minhas conquistas e resultados são méritos seus. Agradeço também em especial ao meu noivo, Sidnei Gomes de Melo, obrigada por me acompanhar em diversas noites de estudo e finais de semana de dedicação e abdicação, compartilhar os meus sonhos e conquistas com você são um privilégio.

Agradeço a minha orientadora Dra. Norma Lucena – Silva, pela oportunidade de integrar sua equipe, por todo conhecimento compartilhado e por toda oportunidade de crescimento e enriquecimento científico, profissional e pessoal. Agradeço a minha coorientadora a Mestre Rossana Santos, por me mostrar toda a amplitude da citometria de fluxo, por me acompanhar no laboratório por diversas vezes fora do seu horário de trabalho e por ser minha amiga.

Agradeço aos meus colegas de laboratório do IMIP, João Lucas, Renan Garcia, Fernanda Medeiros e Laís Barracho, vocês foram essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal, a finalização deste trabalho não seria possível sem o auxílio e a colaboração de vocês. Obrigada por todos os conselhos e por todos os sorrisos nos dias difíceis.

Agradeço aos meus colegas do LIG, Mauro César, Neila Caroline, Katherine Aquino, Andreza Pamela, vocês foram essenciais para o andamento deste trabalho, obrigada por compartilharem comigo todas as emoções que as incertezas e os sucessos dos experimentos podem trazer.

Agradeço as minhas grandes amigas, Elane Beatriz, Dafne Luana e Julia Cirne, por me apoiar nos momentos difíceis, me incentivar na continuidade e finalização desse projeto e por celebrarem comigo cada pequena conquista. Vocês foram primordiais em cada etapa.

Áquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós, a Ele seja a glória na igreja e em Cristo Jesus, por todas as gerações, para todo o sempre! Amém!

-Efésios 3:20-21

## RESUMO

NASCIMENTO, Iasmyn Dayanne Santos do. Atividade de moléculas imunoreguladoras e efectoras na recuperação medular pós-quimioterapia e seu valor prognóstico nas leucemias. 2023. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2023.

A medula óssea é o principal órgão de repovoamento hematológico, seu microambiente é formado por uma complexa rede de interações, com células, moléculas, citocinas e vesículas. Essa rede interação é responsável pela manutenção da homeostasia e pela regulação da hematopoiese. Portanto, a desregulação nesse microambiente pode estar diretamente relacionada a proliferação e a fixação do clone leucêmico. Nesse estudo visamos descrever o microambiente medular, seus componentes celulares, a expressão de proteínas e moléculas imunomoduladoras, além da identificação de vesículas extracelulares, para compreender como esses fatores impactam no prognóstico de pacientes com leucemia aguda ao diagnóstico e no decorrer do tratamento. Avaliamos 40 pacientes pediátricos com diagnóstico de LLA-B (n: 15), LLA-T(n:9) e LMA (n:16). As amostras foram submetidas a painéis de marcação com anticorpos e analisadas através da citometria de fluxo. Para a identificação celular as amostras também foram submetidas ao controle de viabilidade, com 7AAD. Utilizamos as amostras ao diagnóstico de 20 pacientes. Para os pacientes com LLA, constatamos um aumento na expressão das moléculas de adesão CD44, CD9, além de um aumento na molécula moduladora PD1. Para os pacientes com LMA, averiguamos um aumento na expressão das moléculas CD44, CD9 e CD31 e para as moléculas moduladoras HLA-G e PD1. Para as vesículas, utilizamos 20 amostras de estroma medular de pacientes ao diagnóstico e na DRM, após a fase de indução. O estroma medular foi submetido ao protocolo de isolamento através da ultracentrifugação, sendo esse concentrado submetido a caracterização e validação. Através da MET, DLS e da nanocitometria, identificamos um concentrado heterogêneo de vesículas, e a expressão de marcadores característicos de VEs, como anexina e CD9. Ademais, as VEs secretadas pelas células leucêmicas não apresentaram resultados estatisticamente significativos, contudo, identificamos uma assimetria na relação do número de partículas e expressão de marcadores de superfície, além disso, constatamos que os pacientes com LLA-T secretam mais VEs e expressam mais HLA-G, achado esse não similar ao que encontramos no perfil celular. No mais, torna-se necessário a continuidade desse estudo, através da expansão do painel de identificação celular, além de utilizar os mesmos pacientes para os painéis de células e de VEs, aumentando a rastreabilidade das moléculas.

Palavras-chave: Leucemia, Vesículas extracelulares, Antígenos HLA-G, Inibidores de Checkpoint Imunológico.



## ABSTRACT

NASCIMENTO, Iasmyn Dayanne Santos do. Activity of immunoregulatory and effector molecules in medular recovery after chemotherapy and their prognostic value in leukemia. 2023. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2023.

The bone marrow is the main organ of hematological repopulation, its microenvironment is formed by a complex network of interactions, with cells, molecules, cytokines and vesicles. This interaction network is responsible for maintaining homeostasis and regulating hematopoiesis. Therefore, the deregulation in this microenvironment may be directly related to the proliferation and fixation of the leukemic clone. In this study, we aimed to describe the medullary microenvironment, its cellular components, the expression of proteins and immunomodulatory molecules, in addition to the identification of extracellular vesicles, in order to understand how these factors impact the prognosis of patients with acute leukemia at diagnosis and during treatment. We evaluated 40 pediatric patients diagnosed with B-ALL (n: 15), T-ALL (n:9) and AML (n:16). Samples were subjected to antibody staining panels and analyzed by flow cytometry. For cell identification, the samples were also submitted to viability control, with 7AAD. We used the diagnostic samples of 20 patients. For patients with ALL, we found an increase in the expression of adhesion molecules CD44, CD9, in addition to an increase in the modulator molecule PD1. For patients with AML, we found an increase in the expression of CD44, CD9 and CD31 molecules and for HLA-G and PD1 modulator molecules. For the vesicles, we used 20 samples of medullary stroma from patients at diagnosis and at MRD, after the induction phase. The medullary stroma was submitted to the isolation protocol through ultracentrifugation, and this concentrate was subjected to characterization and validation. Through TEM, DLS and nanocytometry, we identified a heterogeneous concentrate of vesicles, and the expression of characteristic markers of EVs, such as annexin and CD9. Furthermore, the EVs secreted by leukemic cells did not show statistically significant results, however, we identified an asymmetry in the relationship between the number of particles and the expression of surface markers, in addition, we found that patients with ALL-T secrete more EVs and express more HLA -G, this finding is not similar to what we found in the cellular profile. Moreover, it is necessary to continue this study, through the expansion of the cell identification panel, in addition to using the same patients for the cell and EV panels, increasing the traceability of the molecules.

Keywords: Leukemia, Extracellular vesicles, HLA-G antigens, immune checkpoint inhibitors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Rede de interações no microambiente saudável da medula óssea hematológica.....	20
Figura 2 -	Diferenciação celular – Hematopoiese.....	25
Figura 3 -	Ligações do HLA-G nas células do sistema imunológico.....	28
Figura 4 -	Ponto de controle imunológico PD1/PD-L1.....	31
Figura 5 -	Biogênese e composição das vesículas extracelulares.....	33
Figura 6 -	Efeitos antiapoptóticos mediados pelas células medulares.....	37
Fluxograma 1 -	Desenho da nossa população de estudo.....	39
Figura 7 -	Ilustração do gate utilizado para o controle da viabilidade.....	40
Quadro 1 -	Painel de mapeamento do microambiente medular.....	41
Quadro 2 -	Painel de mapeamento para as moléculas moduladoras.....	42
Figura 8 -	Ilustração de gates estabelecidos por intermédio dos pacientes controles, mediante a expressão do CD45.....	42
Fluxograma 2 -	Esquema utilizado para análise celular dos pacientes, a partir do isolamento pelo CD45 negativo.....	43
Fluxograma 3 -	Esquema utilizado para análise celular dos pacientes, a partir do isolamento pelo CD45 low.....	44
Fluxograma 4 -	Isolamento das vesículas extracelulares, metodologia correspondente à baixa recuperação, alta especificidade.....	45
Organograma 1 -	Descrição das amostras utilizadas para caracterização através da nanocitometria de fluxo.....	47

Figura 9 -	Histograma referente ao percentual de VEs identificadas na nanocitometria através do padrão Gigamix.....	48
Figura 10 -	Gates de referências para o CD9-V450/Anexina-PE/CD81-FITC.....	48
Fluxograma 5 -	Descrição dos subtipos leucêmicos utilizados para a identificação do HLA-G nas VEs.....	49
Quadro 3 -	Painel de identificação de HLA-G a partir de VEs secretadas por diferentes tipos celulares na leucemia, ao diagnóstico e na DRM.....	49
Figura 11 -	Parâmetros de qualidade.....	50
Figura 12 -	Viabilidade celular dos grupos analisados.....	56
Figura 13 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-</sup> , positivas para a molécula de adesão CD44.....	57
Figura 14 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-</sup> , CD34 <sup>-</sup> .....	58
Figura 15 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-</sup> , CD9 <sup>+</sup> e PD1 <sup>+</sup> .....	60
Figura 16 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-/+</sup> , CD44 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> .....	61
Figura 17 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-/+</sup> , CD90 <sup>+</sup> .....	63
Figura 18 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-</sup> , positivas para a molécula de adesão CD44 em pacientes com LMA.....	65
Figura 19 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-</sup> , HLA-G <sup>+</sup> e PD1 <sup>+</sup> .....	66
Figura 20 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-/+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD31 <sup>+</sup> .....	68
Figura 21 -	Ilustração de células medulares CD45 <sup>-/+</sup> , positivas para a proteína CD9, e as moléculas HLA-G e PD1.....	70
Figura 22 -	Visualização de vesículas extracelulares através da MET.....	71

Figura 23 -	Dimensionamento das vesículas extracelulares – DLS.....	72
Figura 24 -	Distribuição relativa do tamanho das VEs (nanopartículas).....	73
Figura 25 -	Histograma referente ao percentual de tamanho das VEs.....	74
Figura 26 -	Ilustração da imunomarcação realizada com CD9 e anexina.....	75
Figura 27 -	Ilustração da imunomarcação realizada com CD9 e anexina no sobrenadante do ultacentifugado.....	76
Figura 28 -	Ilustração da imunomarcação de VEs provenientes do ultracentrifugado do estroma de MO saudável, com CD9(+). ....	77
Figura 29 -	Ilustração da imunomarcação de VEs do plasma e MO patológica.....	78
Figura 30 -	Gráfico referente a média percentual da expressão da proteína de superfície CD34 ao diagnóstico e na doença residual mínima de pacientes com LLA-B.....	84
Figura 31 -	Média percentual da expressão das proteínas de superfície mensuradas ao diagnóstico entre os pacientes leucêmicos.....	87
Figura 32 -	Média percentual da expressão das proteínas de superfície mensuradas na DRM entre os pacientes leucêmicos.....	90

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Perfil antropométrico da população de estudo.....	52
Tabela 2 -	Variáveis clínico-laboratoriais.....	53
Tabela 3 -	Perfil morfológico ao diagnóstico de pacientes pediátricos com leucemia atendidos no IMIP.....	54
Tabela 4 -	Alterações moleculares avaliadas nos pacientes pediátricos com leucemia no IMIP.....	55
Tabela 5 -	LLA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45 <sup>-</sup> .....	57
Tabela 6 -	LLA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45 <sup>-</sup> .....	59
Tabela 7 -	LLA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45 <sup>-/+</sup> .....	61
Tabela 8 -	LLA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45 <sup>-/+</sup> .....	62
Tabela 9 -	LMA: Identificação de tipos celulares residentes na medula, a partir do CD45 <sup>-</sup> .....	64
Tabela 10 -	LMA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45 <sup>-</sup> .....	65
Tabela 11 -	LMA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45 <sup>-/+</sup> .....	67
Tabela 12 -	LMA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45 <sup>-/+</sup> .....	69
Tabela 13 -	Perfil Antropométrico da população de estudo – vesículas extracelulares.....	79
Tabela 14 -	Variáveis clínico-laboratoriais – VEs.....	80
Tabela 15 -	Perfil morfológico ao diagnóstico de pacientes pediátricos com leucemia atendidos no IMIP.....	81

Tabela 16 - Alterações moleculares avaliadas nos pacientes pediátricos com leucemia no IMIP.....	82
Tabela 17 - Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LLA-B.....	83
Tabela 18 - Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LLA-T.....	84
Tabela 19 - Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LMA.....	86

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

7AAD	7-Aminoactinomicina D
AECs	Células Endoteliais arteriais
BC	Beckman Coulter Life Sciences
BD	Becton Dickinson
CRC	Câncer Colorretal
DHL	Desidrogenase láctica
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRM	Doença residual mensurável
HÁ	Hialuronano/hialurônico
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
HSCs	Precursoros hematopoiéticos
IMIP	Instituto de medicina integral Professor Fernando Figueira
LLA-B	Leucemia linfoide aguda de células B
LLA-T	Leucemia linfoide aguda de células T
LMA	Leucemia mieloide aguda
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
miRNAs	Micro RNAs
MO	Medula óssea
MISEV	Informações mínimas para estudos com vesículas
MSCs	Células mesenquimais
NK	Células Natural Killer
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
OPN	Osteopontina
RCC	Câncer de células renais
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
sHLA-G	Antígeno leucocitário humano G- solúvel
VEs	Vesículas Extracelulares
VEs-MSCs	Vesículas extracelulares de células mesenquimais

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivos gerais.....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Comunicação bidirecional no microambiente medular.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Microambiente medular e seus componentes celulares.....</b>	<b>21</b>
<i>3.2.1 Células Mesenquimais.....</i>	<i>21</i>
<i>3.2.2 Células Endotelais.....</i>	<i>23</i>
<i>3.2.3 Células Hematopoiéticas.....</i>	<i>25</i>
<b>3.3 Moléculas Imunomoduladoras.....</b>	<b>27</b>
<i>3.3.1 HLA-G.....</i>	<i>27</i>
<i>3.3.2 PD1/PD-L1.....</i>	<i>29</i>
<b>3.4 Vesículas Extracelulares.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5 Desregulação do microambiente medular leucêmico.....</b>	<b>36</b>
<b>4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1 Considerações éticas.....</b>	<b>39</b>
<b>4.2 Desenho e população de estudo.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3 Isolamento das células do microambiente medular.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4 Citometria de fluxo–Avaliação das células da medula óssea.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Citometria de fluxo-Avaliação das moléculas solúveis.....</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Fluxograma de análise.....</b>	<b>42</b>
<b>4.7 Isolamento das vesículas extracelulares.....</b>	<b>43</b>
<b>4.8 Caracterização das vesículas extracelulares.....</b>	<b>46</b>
<b>4.9 Identificação de HLA-G nas vesículas extracelulares.....</b>	<b>47</b>
<b>4.10 Análise estatística.....</b>	<b>51</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Descrição demográfica da população estudada.....</b>	<b>52</b>
<b>5.2 Isolamento e inspeção da viabilidade celular.....</b>	<b>56</b>
<b>5.3 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia linfóide.....</b>	<b>56</b>



<b>5.4 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia mieloide.....</b>	<b>63</b>
<b>5.5 Validação da metodologia de isolamento e caracterização das vesículas extracelulares.....</b>	<b>71</b>
<b>5.6 Identificação de HLA-G nas Vesículas Extracelulares.....</b>	<b>79</b>
<i>5.6.1 Caracterização demográfica da população de estudo.....</i>	<i>79</i>
<i>5.6.2 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes de pacientes com LLA-B.....</i>	<i>82</i>
<i>5.6.3 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes de pacientes com LLA-T.....</i>	<i>83</i>
<i>5.6.4 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes de pacientes com LMA.....</i>	<i>85</i>
<i>5.6.5 Identificação HLA-G nas VEs provenientes de pacientes leucêmicos ao diagnóstico e na DRM.....</i>	<i>86</i>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>6.1 Descrição demográfica da população estudada para células e para VEs.....</b>	<b>92</b>
<b>6.2 Isolamento e inspeção da viabilidade celular.....</b>	<b>92</b>
<b>6.3 Avaliação das moléculas presentes na no microambiente medular de pacientes com leucemia linfoide.....</b>	<b>93</b>
<b>6.4 Avaliação das moléculas presentes na no microambiente medular de pacientes com leucemia linfoide.....</b>	<b>95</b>
<b>6.5 Validação da metodologia de isolamento e caracterização das Vesículas Extracelulares.....</b>	<b>98</b>

<b>6.6 Identificação de HLA-G nas Vesículas extracelulares.....</b>	<b>99</b>
6.6.1 <i>Identificação de HLA-G nas VEs de pacientes com LLA-B.....</i>	<b>99</b>
6.6.2 <i>Identificação de HLA-G nas VEs de pacientes com LLA-T.....</i>	<b>100</b>
6.6.3 <i>Identificação de HLA-G nas VEs de pacientes com LMA.....</i>	<b>100</b>
6.6.4 <i>Identificação de HLA-G nas VEs de pacientes com leucemia aguda ao diagnóstico e na doença residual mínima.....</i>	<b>101</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM.....</b>	<b>112</b>
<b>ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b>	<b>120</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO.....</b>	<b>121</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A medula óssea (MO) é o principal órgão de repovoamento hematológico, sua homeostasia é mantida através de uma rede de interações que compõem e formam o microambiente medular. Progenitoras hematopoiéticas, células mesenquimais e endoteliais residem nesse microambiente formando o estroma, responsável pelo equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e homeostase das células progenitoras.

Interações complexas entre a matriz extracelular, proteínas, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, moléculas de diferenciação, vesículas extracelulares e outros reguladores também auxiliam na manutenção da homeostase e na regulação da hematopoiese. Portanto, qualquer mudança nessa rede de interações pode ser danosa para o equilíbrio homeostático, podendo desencadear uma transformação maligna ou auxiliar na progressão e fixação de doenças hematológicas.

As leucemias abrangem um grupo de neoplasias hematológicas, caracterizadas pela expansão clonal de células comprometidas com a diferenciação de progenitores hematopoiéticos na MO, decorrentes de alterações genéticas sucessivas, que resultam com o impedimento do processo de diferenciação fisiológico e o acúmulo dessas células alteradas na MO. Assim, as células comprometidas, não funcionais, circulam no sangue periférico, ocasionando a sintomatologia da doença.

A caracterização desse clone leucêmico depende da linhagem da célula progenitora afetada, linfóide ou mielóide, e da evolução clínica, em aguda (evolução rápida e curta duração) ou crônica (evolução lenta e longa duração). A partir dessa classificação inicial, 12 subtipos leucêmicos são descritos e eles se distinguem através do estágio de maturação celular, imunofenótipo, características moleculares e características citogenéticas, sendo todos esses fatores indispensáveis para a classificação de risco, condução clínica, tratamento, remissão e cura dos pacientes.

Ao longo dos anos as terapias direcionadas a partir das classificações de risco fizeram com que houvesse uma redução no número de recaídas e um aumento na sobrevida global, já que o esquema quimioterápico passou a ser definido de acordo com a resposta inicial do paciente ao tratamento e a presença de marcadores moleculares e imunológicos que conduzem o prognóstico, possibilitando inclusive, o uso de inibidores e quimioterápicos combinados. Porém, para alguns subtipos

leucêmicos, ainda temos uma alta taxa de mortalidade e uma baixa sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Estudos indicam que essa baixa sobrevida livre de doença e sobrevida global dos pacientes está intrinsecamente ligada a fixação do clone leucêmico na MO, detectável através da doença residual mensurável (DRM), em que, a sua persistência após os ciclos de tratamento está associada a maiores taxas de recaída, independente do subtipo de leucêmico. Desta forma, a monitorização da DRM, utilizando métodos de detecção altamente sensibilizados, permite a identificação dessas células alteradas que fazem o paciente ter o risco acrescido de recidiva.

No entanto, nossa compreensão da hematopoiese humana e da biologia desse nicho medular associada a expressão de moléculas reguladoras e a expressão de vesículas extracelulares (VEs), que podem contribuir para a fixação desse clone leucêmico e a persistência na DRM, permanece limitada, devido a fatores como, a acessibilidade ao material humano, a heterogeneidade dessas células e a complexidade da rede de interações entre as células, as moléculas solúveis e as VEs

Nesse contexto, a proposta de mapeamento do microambiente medular a partir de epítomos de superfícies presentes na superfície celular e de VEs, é identificar a origem das VEs, esclarecendo o papel regulatório exercido pelas diferentes células (leucêmicas e não-leucêmicas) sobre o ambiente medular de forma determinante ou facilitadora para a fixação ou não do clone leucêmico. Além disso, a compreensão sobre a heterogeneidade das leucemias e a complexidade do ambiente tumoral em cada situação, ou seja, entre os pacientes que respondem ou não ao tratamento, permite a descoberta de novos marcadores prognósticos, de uso na monitorização da DRM para melhor condução terapêutica e clínica dos pacientes.

Nesse estudo, nós avaliamos a expressão de moléculas solúveis e de superfície nas diferentes células da medula, as características das VEs liberadas por essas células ao diagnóstico e após o tratamento de indução, e descrevemos alguns fatores associados ao risco de recaída, que podem em breve serem utilizados na rotina clínica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Descrever o microambiente medular, seus componentes celulares, a expressão de moléculas imunomoduladoras e a presença de vesículas extracelulares, visando compreender como esses fatores podem impactar no prognóstico de pacientes com leucemia aguda ao diagnóstico e na resposta ao tratamento.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização e o mapeamento das células do microambiente medular e analisar suas proporções comparando a medula fisiológica e patológica ao diagnóstico.
- Avaliar a expressão de moléculas imunomoduladoras (HLA-G, PD1, PD-L1) nas células do estroma medular fisiológico e patológico ao diagnóstico.
- Isolar, validar e caracterizar as vesículas extracelulares provenientes do estroma de medula óssea patológica.
- Analisar a expressão de HLA-G nas vesículas extracelulares e avaliar a coexpressão com marcadores de linhagens leucêmicas, hematopoiéticas e mesenquimais, ao diagnóstico e no início do tratamento.

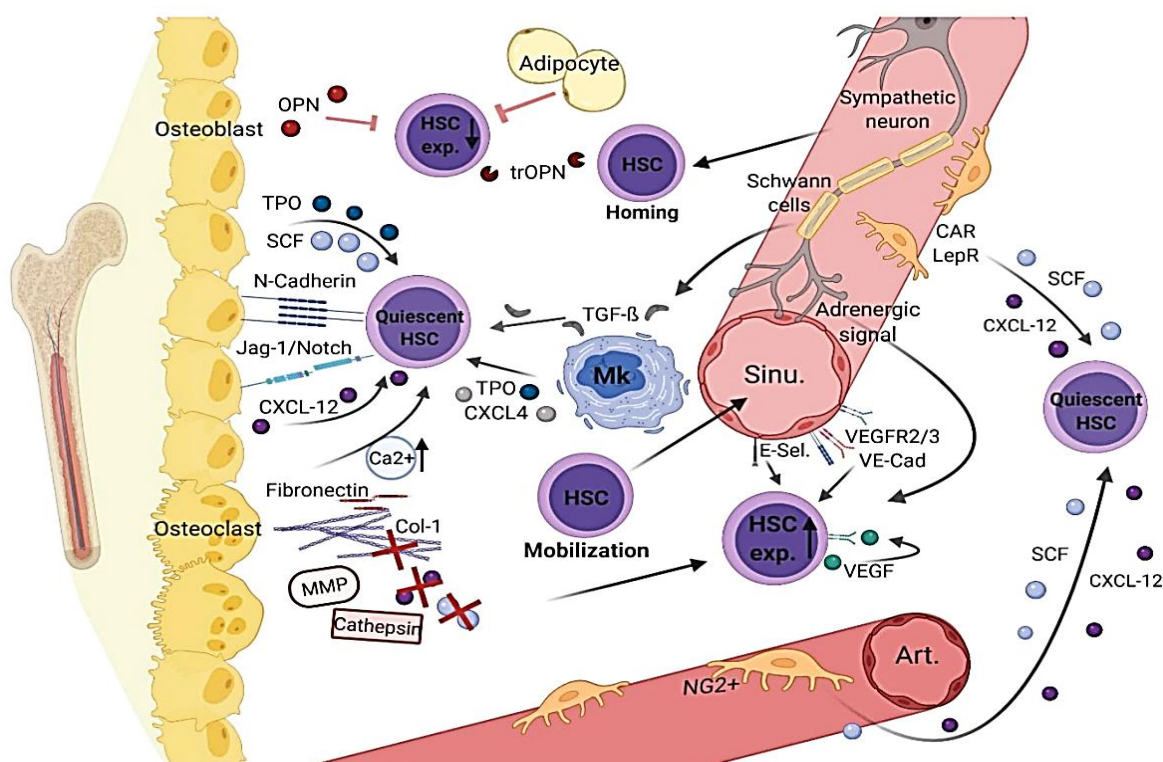
### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Comunicação bidirecional no microambiente medular

Fisiologicamente, as células hematopoiéticas se desenvolvem em um microambiente com uma complexa rede de interações, altamente qualificado e rigorosamente regulado por elementos celulares e não celulares que estão ligados entre si e proporcionam a homeostase da hematopoiese e a funcionalidade das células precursoras (HOUSHMAND et al., 2019; SENDKER et al., 2021).

Esse microambiente complexo (figura 1) é formado por vários elementos como células endoteliais, mesenquimais e estromais que incluem fibroblastos, células reticulares, adipócitos e osteoblastos (RIBEIRO-FILHO et al., 2019), é composto também por uma matriz extracelular, proteínas, fatores de crescimento, citocinas (como as interleucinas, trombopoietina e a eritropoietina), quimiocinas, moléculas de adesão (como a família das integrinas), moléculas de diferenciação, partículas naturalmente secretadas e um sistema nervoso que desempenha um papel importante na ligação do sistema nervoso central com a hematopoiese (YAO et al., 2021).

Figura 1- Rede de interações no microambiente saudável da medula óssea hematológica.



Fonte: SENDKER et al., 2021.

Essa rede de interações tem sido geralmente descrita em dois nichos especializados: perivascular/endotelial e endosteal/osteoblástico. O primeiro, foi subdividido em região perisinusoidal e periarteriolar, a depender dos vasos sanguíneos que o formam e de células endoteliais e perivasculares associadas. Já o nicho endosteal, localizado na superfície óssea, é responsável pelo revestimento dos osteoblastos (HOUSHMAND et al., 2019). Ao longo dos anos, essa distribuição celular dos precursores e a funcionalidade desses nichos na manutenção desse complexo, se tornou amplamente estudada, mas seus resultados ainda são controversos. A princípio, acreditava-se que a maioria das células hematopoiéticas precursoras estavam localizadas próximo a superfície endosteal, atualmente acredita-se que elas estão localizadas na parte central da medula óssea, longe do endóstio, e que são reguladas por subnichos perivasculares (SENDKER et al., 2021).

O consenso estabelecido é que, a regulação dos componentes dentro desses nichos propicia um suporte mecânico para as células tronco, contribuindo para a sua regulação, quiescência e proliferação. E que, além das populações de células hematopoiéticas, o microambiente medular é composto principalmente por populações heterogêneas de células estromais e matriz extracelular -MEC (KIHIRA et al., 2020; CICIARELLO et al., 2021). Atualmente, populações de células estromais, incluindo células-tronco mesenquimais (MSCs: células estromais mesenquimais), células endoteliais do tipo arteriolar e sinusoidal, macrófagos, megacariócitos, adipócitos, neurônios simpáticos e os componentes da MEC (colágeno, fibronectina, laminina e plasmina) se tornaram importantes alvos moduladores, e passaram a ser estudados.

## **3.2 Microambiente Medular e seus componentes celulares**

### *3.2.1 Células Mesenquimais*

As células-tronco mesenquimais estão envolvidas principalmente em artérias e vasos sinusoidais e constituem uma população heterogênea de células-tronco não hematopoiéticas (HOUSHMAND et al., 2019; BARACHINI et al., 2023). As MSCs possuem a capacidade de auto-renovação e exibem diferenciação multilinhagem

(BARACHINI et al., 2023), podendo se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tenócitos, miotubos (fibra muscular do tecido esquelético), células neurais e estroma para suporte hematopoiético, sendo essa diferenciação regulada por eventos genéticos, envolvendo fatores de transcrição (LAI et al., 2019; YANG et al., 2023).

Essas células multipotentes podem ser isoladas na medula óssea, no sangue proveniente do cordão umbilical, no tecido adiposo, no músculo, na placenta e mais recentemente estudos indicam sua identificação no sangue menstrual e no endométrio (LAI et al., 2019), nesses tecidos as células apresentam diferenciação tecido-específica, por isso, podem ser positivas para alguns marcadores de superfície celular, incluindo CD9, CD29, CD44, CD54, CD61, CD63, CD71, CD90, CD97, CD98, CD99, CD105, CD106, CD146, CD155, CD166, CD276 e CD304, sendo negativa para os marcadores de linhagens hematopoiéticas como CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, CD19 e CD79a (YANG et al., 2023). Para alguns destes marcadores, estudos demonstraram capacidades imunomoduladoras baseadas na desregulação da sua expressão.

Para a proteína CD90 (também conhecido como Thy-1), estudos demonstraram que essa proteína de superfície desempenha um papel importante na regulação da proliferação de células cancerígenas, metástase e angiogênese. Indicando que o CD90 pode ser um importante marcador prognóstico, em cânceres como do pâncreas, ovário, próstata, tireoide e câncer renal (SHAIKH et al., 2016; ZENG et al., 2019; GORDON et al., 2023), ou alvo promissor para imunoterapias direcionadas. Contudo, estudos também demonstraram que o CD90 tem papéis paradoxais, possivelmente atuando como supressor tumoral (KUMAR et al., 2016; SUAZAY et al., 2019).

Além do CD90, a molécula de adesão CD44 presente nas MSCs e amplamente expressa em linfócitos B e T e na matriz extracelular, possui um papel importante na tumorigênese e já foi reconhecido como um possível marcador de células cancerígenas e indutor da metástase (YAO et al., 2021). Isso se deve à sua capacidade de auxiliar a ligação dos componentes da matriz extracelular, incluindo hialuronano/hialurônico (HA) e osteopontina (OPN), e a moléculas mensageiras, como fatores de crescimento que estão presentes e são extremamente importantes no microambiente tumoral. HA e OPN já foram identificadas em alguns estudos como moléculas abundantes no nicho de células-tronco leucêmicas e em tumores sólidos



de vários tipos de câncer, contribuindo diretamente para a manutenção e fixação das células malignas com as demais células endoteliais vasculares (MAYANI et al., 2022; LEPUCKI et al., 2022).

Assim como o CD44, a proteína tetraspanina-CD9 é um regulador chave da adesão celular, atua diretamente na fisiologia dos leucócitos, células endoteliais, coagulação e atua como regulador na diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (LORICO et al., 2021; ONDRUŠŠEK et al., 2023). Além disso, o CD9 está frequentemente associado ao tráfico de vesículas extracelulares, que vem se tornando um importante alvo de estudos, principalmente as VEs derivadas de células progenitoras (VEs-MSCs). Essas VE-MSCs podem conter proteínas e RNAs, além de expressar marcadores regulatórios que interagem com células-alvo realizando o transporte de moléculas para compartimentos intracelulares. Para mais, foi relatado que vários miRNAs específicos derivados de EVs de MSC estão envolvidos na regulação imunológica, bem como na regulação da diferenciação, proliferação e atividade angiogênica (LAI et al., 2019; YANG et al., 2023)

Portanto, compreender esses mecanismos e os devidos papéis das moléculas envolvidas nessa interação será de enorme importância no desenvolvimento de futuras aplicações clínicas, como seu uso como um biomarcador nas malignidades, seu uso como alvo terapêutico ou até mesmo o uso para o transplante de células-tronco.

### 3.2.2 Células Endoteliais

As células-tronco vasculogênicas pós-natais humanas envolvidas na regeneração de vasos dão origem a células endoteliais, que quando imaturas, são raras e ainda não estão fixadas, possuindo então a capacidade de circular, proliferar e diferenciar-se em células endoteliais maduras, mas ainda não adquiriram marcadores característicos e ainda não formaram um lúmen (NG, Chun-Yi et al., 2023). Após a maturação, o tecido endotelial permite a conexão entre componentes da circulação sanguínea e os demais sistemas do organismo, realizando papéis múltiplos e importantes em eventos fisiológicos e em fisiopatológicos, atuando em processos como homeostase, angiogênese, regulação da pressão arterial e inflamação (LEUNG et al., 2022).

Durante a hematopoiese, essas células se desenvolvem em paralelo, sendo a hematopoiese definitiva dependente do desenvolvimento das células endoteliais no embrião (CANU et al., 2021). Estudos recentes mostraram que as células precursoras hematopoiéticas (HSCs) são derivadas de células endoteliais, e a artéria umbilical é um dos principais locais de nascimento das HSCs. Portanto, as células endoteliais arteriais (AECs) dentro do cordão umbilical podem conter redes de sinalização complexas para regular as HSCs nascentes. Acredita-se que o endotélio não apenas desempenha um papel fundamental na geração de HSCs definitivas, mas também é crítico para a auto-renovação de HSCs *in vitro* ou o repovoamento de BM *in vivo* (LI et al., 2020;)

Ademais, as células endoteliais são essenciais no processo de formação de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese, já que a interação entre as proteínas adesivas das células endoteliais, CD9, CD31, CD44, CD133 e os componentes da matriz extracelular promovem uma interação para a fixação dessas células, sendo indispensável para sua motilidade e na transmissão dos sinais regulatórios para a proliferação celular (ROSSI et al., 2019; NG, Chun-Yi et al., 2023).

Esse mesmo processo de angiogênese é essencial para o desenvolvimento do câncer, já que ele é neoangiogênese dependente, o que significa dizer que, ele depende de fatores que possam facilitar o seu processo de vascularização a partir de vasos pré-existentes (OLEJARZ, et a., 2020), com isso, estudos que investigam o mecanismo que auxiliam a vascularização do câncer e o mecanismo que promove a adesão seletiva das células cancerígenas ao endotélio da medula óssea têm se concentrado principalmente no papel das células progenitoras endoteliais circulantes e na compreensão da modulação causada pelas proteínas de superfície presente nessas células (AGUILAR-CAZARES et a., 2019).

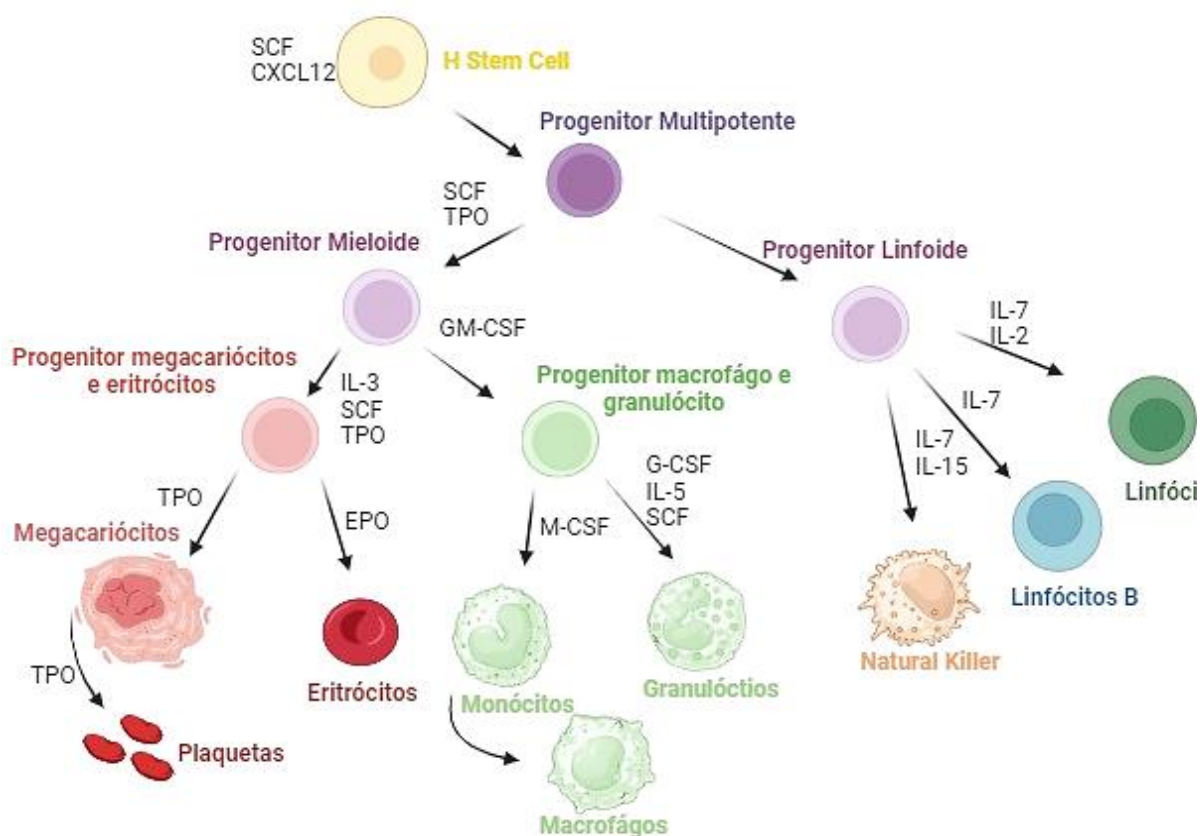
Porém, os estudos que avaliam a importância de células precursoras endoteliais e células hematopoiéticas na angiogênese tumoral são escassos, pela falta de modelos *in vivo* adequados e pela raridade dessas células. Por isso, se torna necessário estudos que sejam capazes de identificar o papel da célula endotelial progenitora, sua correlação com a expressão de moléculas de superfície, bem como o papel e sua atuação na fixação das células cancerígenas, evidenciando assim o seu papel atuante no microambiente medular, podendo ser um importante alvo terapêutico.

### 3.2.3 Células Hematopoiéticas

Como relatado anteriormente, as células tronco hematopoiéticas (HSC) residem principalmente na medula óssea, são células multipotentes do topo da hierarquia hematopoiética, capazes de promover a autorrenovação e diferenciação em progenitores hematopoiéticos, sendo a produção permanente das células sanguíneas e imunológicas maduras dependente desse mecanismo de especialização (ZAKRZEWSKI et al., 2019; DEMIRCI et al., 2020).

No nicho medular esses progenitores são conservados através de uma cascata de sinalização que também mantém a homeostasia. Enquanto sua progênie é direcionada para a diferenciação da linhagem (figura 2), as outras permanecem quiescentes e se dividem apenas para manter uma quantidade adequada de células sanguíneas diferenciadas e para renovar as células precursoras (MANNINO et al., 2022). Os progenitores se proliferam e se diferenciam na medula óssea ou então migram para outros órgãos hematopoiéticos ou linfoides, como os linfonodos, baço, timo (HOSSAIN, et al., 2022).

Figura 2- Diferenciação celular – Hematopoiese.



Fonte: Adaptado de GOMES et al., 2021.

Nota: As células-tronco hematopoiéticas dão origem as linhagens de células sanguíneas. Estágios distintos de células-tronco hematopoéticas e células progenitoras foram descritos correlacionando a expressão do marcador de superfície e as propriedades funcionais. As principais citocinas de instrução de linhagem e fatores de crescimento para cada tipo hematopoiético estão indicadas em negrito.

A hematopoiese é favorecida e controlada por um conjunto de fatores extrínsecos como, fatores de crescimento, citocinas e interleucinas que são produzidas pelas próprias células do nicho medular (MANNINO et al., 2022; MIAO et al., 2020). Esse processo se inicia com o comprometimento da célula pluripotente com as linhagens. A linhagem linfoide dará origem aos linfócitos T e B e a linhagem mieloide dará origem os eritrócitos, os granulócitos, os monócitos e as plaquetas. Essas linhagens já possuem menor potencial de diferenciação do que as células-tronco e já apresentam características morfológicas com a presença de antígenos de superfície específicos da sua linhagem sanguínea (CHENG et al., 2020; COMAZZETTO et a., 2021).

Além disso, o próprio nicho também é regulado pelas células hematopoiéticas. Como os macrófagos que auxiliam na regulação dos osteoblastos, os megacariócitos que são associados ao tecido endotelial, ou os neutrófilos que quando super expressos causam lesões teciduais (COSSÍO et al., 2019; DE KRUIJF et al., 2020). Assim, para a manutenção da homeostase, existe uma orquestração complexa e altamente dinâmica entre os compartimentos hematopoiéticos e não hematopoiéticos no nicho medular com uma regulação mediada por sinais intrínsecos e extrínsecos do microambiente, que resulta no suporte, controle, proliferação e diferenciação das células. Sendo assim, alterações mediadas pelos componentes dessa rede e a quebra dessa homeostasia podem afetar toda uma cascata de diferenciação e implicar em diversas disfunções celulares (NIAZI et al., 2020).

Desse modo, ainda que a hematopoiese tenha sido amplamente estudada por muitos anos, a maior parte do nosso conhecimento sobre os diferentes fatores necessários para a regulação da mesma, resulta de estudos de diferenciação *in vitro* ou com outros animais, levantando assim questões relativas à sua relevância e reprodutibilidade *in vivo* (GOMES et al., 2021). Por isso, estudos que sejam direcionados a elucidar toda essa cascata de regulação em humanos são fundamentais.

### 3.3 Moléculas Imunomoduladoras

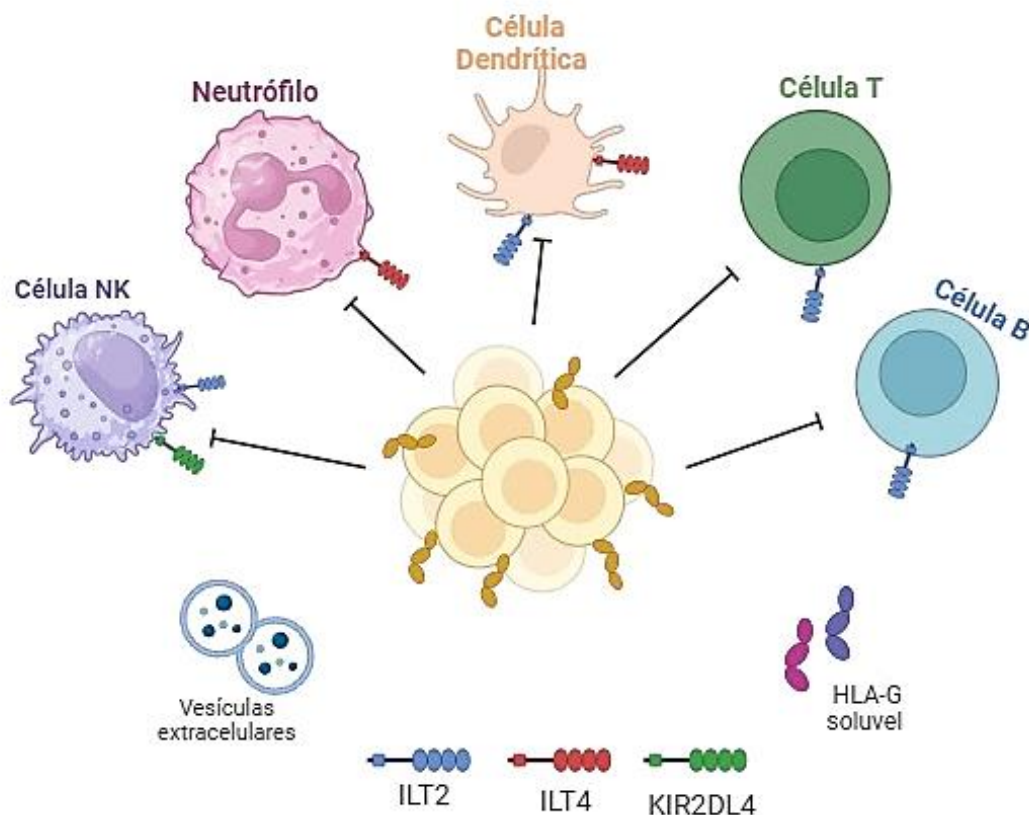
#### 3.3.1 HLA-G

As moléculas imunomoduladoras recebem essa classificação com base na sua capacidade de atuar em mecanismos imunológicos visando estimular ou inibir a resposta natural e/ou específica. O HLA-G enquadra-se perfeitamente nessa categoria, já que ele medeia a tolerância imunológica materno-fetal, promove o checkpoint imunológico em doenças autoimunes e inflamatórias e participa da evasão imunológica, promovendo assim o crescimento tumoral e o escape das células cancerígenas do sistema imunológico saudável (SWETS et al., 2018; ATTIA et al., 2020).

O *gene do antígeno leucocitário humano G (HLA-G)* está localizado no cromossomo 6, na região 6p21.3, sendo uma molécula não clássica do principal complexo de histocompatibilidade (HLA de classe I). É uma molécula polimórfica, possui 88 alelos, 26 variantes de proteínas registradas e sete isoformas, codificadas através do *splicing* alternativo (SCHWICH et al., 2020; ZHUANG et al., 2021). O HLA-G exerce função moduladora nos sistemas imunológicos inatos e adaptativos, independente da sua isoforma, interagindo através da ligação com os receptores ILT2, ILT4 e KIR2DL4, presente nas células de defesa, como nos monócitos, células B, natural killer, neutrófilos, células T, células dendríticas e células de origem mieloide (KRIJGSMAN et al., 2020; LIN, Aifen et al., 2021).

Ao ligar-se aos receptores celulares do sistema imunológico (figura 3), o HLA-G é capaz de interferir na proliferação de células T CD4+, controlar a citotoxicidade de células natural killer (NK), auxiliar na alteração da maturação e diferenciação de células dendríticas (DC) e na ativação de células B, além promover a diminuição da apresentação de antígenos, alterando assim a comunicação celular. Além disso, as moléculas HLA-G solúveis (sHLA-G) são capazes de desencadear apoptose em linfócitos T CD8+ específicos de antígeno (DA SILVA, et al., 2018; CONTINI et al., 2020).

Figura 3- Ligações do HLA-G nas células do sistema imunológico no microambiente tumoral.



Fonte: Adaptado de DA SILVA et al., 2018.

Nota: O HLA-G, seja na superfície das células tumorais, na sua forma solúvel ou associado a vesículas extracelulares, inibe diferentes características das células imunes através da interação com os receptores inibitórios ILT2 e ILT4, permitindo que as células tumorais escapem da vigilância imunológica.

Ao promover a inibição do sistema imune saudável, as células provenientes de patologias, como as tumorais, se beneficiam dessa modulação (ATTIA et al., 2020). O mecanismo de checkpoint imunológico (ou ponto de verificação imunológico) promovido pelo HLA-G ou sHLA-G já foi descrito em estudos com malignidades e correlacionados com a baixa sobrevida, prognóstico, resposta terapêutica, evolução e desfecho clínico (SCHWICH et al., 2020).

Em diferentes tipos de cânceres sólidos, como melanoma, câncer de mama, câncer de rim, pulmão, esôfago, carcinomas gástricos, pancreáticos, linfomas, câncer de tireoide, câncer colorretal, câncer de endométrio, no colo do útero e no ovário, é possível identificar uma maior expressão de HLA-G no tecido tumoral, sendo essa expressão correlacionada com um maior índice de metástase, já que ele também já foi identificado em vesículas extracelulares, que irão carrear essa molécula para outro

sítio longe do tumor, modulando a resposta imune, promovendo a infiltração celular e caracterizando o pior prognóstico destes pacientes (DA SILVA et al., 2018; KRIJGSMAN et al., 2020; LIN, Aifen et al., 2021).

Nas leucemias, estudos realizados com sHLA-G mostram que a secreção aumentada dessa molécula é maior nos subtipos de leucemia aguda nas linhagens monocíticas e linfoides e que pode ser correlacionada com um aumento no nível de leucócitos e com o desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica (GROS et al., 2006), em estudos anteriores do nosso grupo, os altos níveis de sHLA-G em pacientes com LLA-T ao diagnóstico também foram associados ao aumento da contagem de leucócitos e ao desequilíbrio na expressão de citocinas, indicativos de um mau prognóstico (ALMEIDA et al., 2018).

Apesar do HLA-G ter se mostrado um importante marcador de prognóstico e um excelente alvo para terapia com imunobiológicos, a aplicabilidade desses achados ainda não são viáveis, devido a dois fatores: a princípio, não é possível a utilização de modelos murinos para a compreensão dos efeitos moduladores do HLA-G e para a testagem dos anticorpos anti-HLA-G para aplicação clínica, além disso, em humanos a expressão da molécula tem sido controversa, já que utilizando a mesma metodologia em tumores semelhantes o nível de expressão apresenta heterogeneidade, devido a identificação de suas isoformas através dos anticorpos monoclonais, que geralmente só reconhecem apenas uma ou duas isoformas de HLA-G (KRIJGSMAN et al., 2020).

Mediante esses fatores, a heterogeneidade da expressão de HLA-G e a insuficiência dos anticorpos, permanece sendo um problema o uso da imunoterapia no câncer baseada em anticorpos anti-HLA-G (LIN, Aifen et al., 2021). Outro ponto importante e pouco explorado com relação a expressão de HLA-G é a sua mediação com a expressão de outras moléculas, como o ligante PD-L1, para esse, estudos identificaram que as células cancerígenas tumorais e estromais de osteossarcomas orais super expressam essas moléculas sugerindo um favorecimento para a prospecção do microambiente que promove o escape das células cancerígenas do sistema imune (ARANTES et al., 2017).

### 3.3.2 PD1/PD-L1

Assim como o HLA-G, a via de ligação PD1/PD-L1 é conhecida como checkpoint imunológico ou ponto de verificação imunológica (PATSOUKIS et al.,

2020). Em um organismo saudável, esta via induz e mantém a tolerância imunitária periférica, obtendo um efeito positivo na prevenção da inflamação excessiva dos tecidos e de doenças autoimunes, auxiliando na proteção do tecido normal contra danos. O receptor de morte programada 1 (PD-1/CD279) é uma glicoproteína transmembrana, codificada pelo *gene PDCD1*, onde sua expressão é potencializada por estímulos apoptóticos (JIANG et al., 2019; PATSOUKIS et al., 2020), pode ser detectada na superfície das células T durante o desenvolvimento do timo (timócitos CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup>) e na periferia de vários tipos de células hematopoiéticas, como linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células B, monócitos, células natural killer, células dendríticas após a estimulação com citocinas ( como IL-2, IL17, IL-15 e IL-21) e sinais de receptores de células T (ZHU et al., 2017; HAN et al., 2020).

Quando uma célula T reconhece um antígeno expresso por um complexo MHC em uma célula alvo, são produzidas citocinas, que iniciam o processo inflamatório e, finalmente, levam à expressão de PD-L1 no tecido. O PD-L1/CD274 é o ligante de morte programada, comumente expresso em células cancerosas e apresentadoras de antígenos. Os ligantes PD-L1 e PD-L2/CD273 são membros das famílias CD28, B7-H1 e B7-DC, respectivamente, desempenham papéis críticos na inibição e exaustão de células T, prejudicando sua capacidade de secretar citocinas pró-inflamatórias como IL-2, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF) e moléculas citolíticas como a perforina (ZHU et al., 2017; FILIPPONE, A. et al., 2022;).

Essa via de sinalização tem sido constantemente usada pelas células cancerígenas para promoverem o escape do sistema imunológico, através da inibição do funcionamento do sistema imune saudável, induzindo sua apoptose e alteração na secreção de citocinas inflamatórias, como a inibição da produção da perforina e promoção da secreção de IL-10 (citocina inibitória), auxiliando assim na metástase tumoral através da infiltração dessas células (HAN et al., 2020).

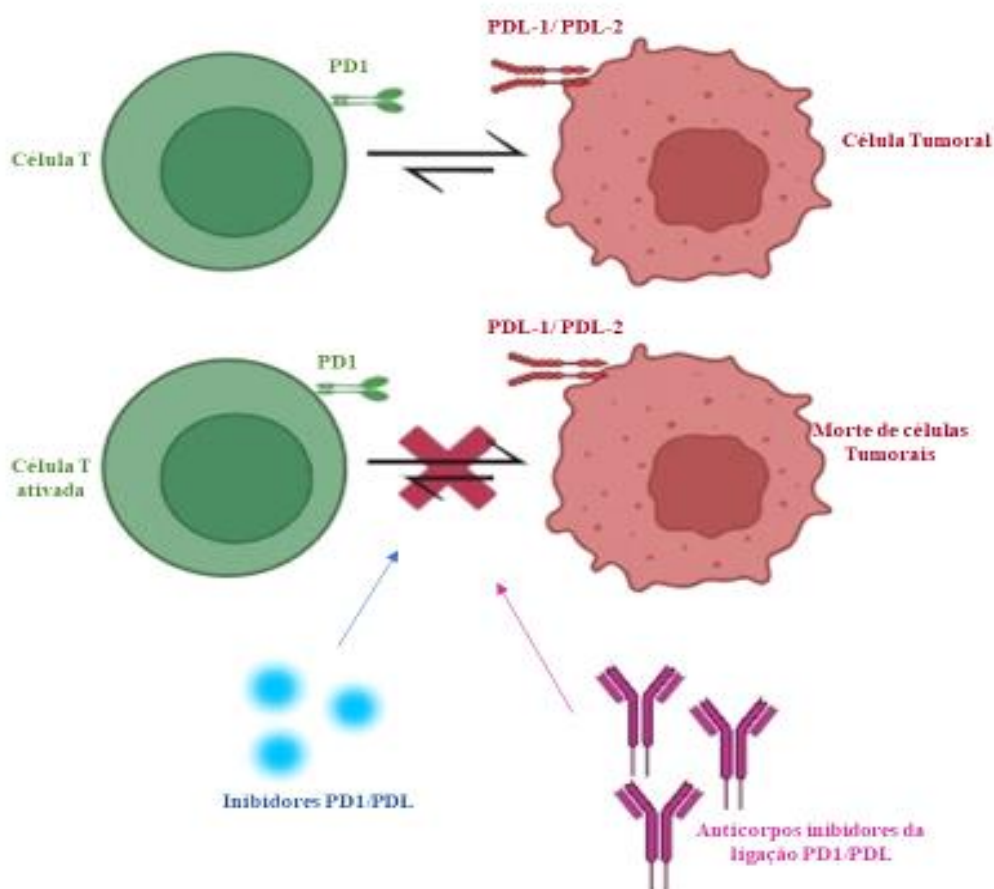
Estudos indicam que a superexpressão de PD-L1 e PD-1 em células tumorais e linfócitos infiltrantes de tumor, respectivamente, correlaciona-se com o mau prognóstico em alguns cânceres humanos e que sua inibição pode evitar processos como: alta tolerância de células T, aumento da apoptose de células T saudáveis, exaustão de células T e aumento na função de células Treg imunossupressoras (ALSAAB et al., 2017; KIM, Sehui et al., 2019; JIANG et al., 2019). Por isso, na busca de um biomarcador funcional para as imunoterapias, a via de sinalização PD1/PD-L1 foi observada em diversos tipos de câncer (JIMBU et al., 2021). Para o câncer de



células renais (RCC), melanoma, carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e câncer colorretal (CRC), a alta expressão de PD-L1 resultou em uma escassez resposta imune efetora ao tumor (ALSAAB et al., 2017).

James P. Allison e Tasuku Honjo, ganhadores do Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2018, evidenciaram um tratamento baseado em imunoterapia capaz de suprimir essa imunomodulação negativa, mostrando que a inibição dessa ligação é capaz de eliminar as células cancerígenas de forma mais eficaz. Recentemente, fármacos e anticorpos anti PD-1 humano, foram testados em ensaios pré-clínicos e aprovados pela FDA -Food and Drug Administration-EUA (figura 4). Para múltiplos tipos de malignidades, resultando em tratamentos promissores para a regressão durável do tumor e o prolongamento da estabilização da doença, mesmo em pacientes com cânceres avançados (JIANG et al., 2019; YI Ming et al., 2022).

Figura 4: Ponto de controle imunológico PD1/PD-L1 como um alvo potencial para prevenir a progressão tumoral, a partir da imunoterapia.



Fonte: Adaptado de FILIPPONE, A. et al., 2022.

Nota: Ponto de controle imunológico PD-1/PDL-1 na tumorigênese (Painel A). Bloqueio de PD-1/PDL-1 por anticorpos direcionados e inibidores específicos (Painel B).

Os inibidores testados impossibilitam farmacologicamente a ligação PD-1/PD-L1, fazendo com que as células cancerígenas não escapem do sistema imune (Yi Ming et al., 2022). Porém, para que esse tratamento funcione, é necessário que o organismo do paciente produza células T efetoras, para que essas sejam capazes de reconhecer as células alteradas (ALSAAB et al., 2017). A partir dos resultados obtidos nos tumores sólidos, os estudos foram direcionados para as neoplasias hematológicas, incluindo leucemias e linfomas. No linfoma de Hodgkin (HL), a alta expressão de PD1 foi associada a infiltração do tumor. Já na leucemia, o ligante PD-L1 foi altamente expresso pelas células cancerígenas, podendo estar relacionado a fixação do clone leucêmico, progressão da doença e aos índices de recaída (JIMBU et al., 2021; IOANNOU et al., 2021).

A possibilidade da utilização da terapia anti-PD1 em neoplasias hematológicas pode promover o recrutamento das células T e realizar uma resposta imune efetiva importante para a evolução clínica dos pacientes, evidenciando a potencialidade desse biomarcador e seu potencial uso como imunobiológico.

As células tumorais podem apresentar diversas estratégias imunomoduladoras que lhes permitem evadir ou resistir às respostas imunes antitumorais, o que pode influenciar negativamente o prognóstico do paciente, e a sua sobrevida, entretanto ainda não foi possível elucidar todos os questionamentos a respeito das moléculas moduladoras, como a origem da expressão, função em diferentes sítios e correlação da sua expressão com os efeitos causados no sistema imune e na continuidade das malignidades, por isso, estudos que evidenciem essa rede de interação são imprescindíveis.

### **3.4 Vesículas extracelulares**

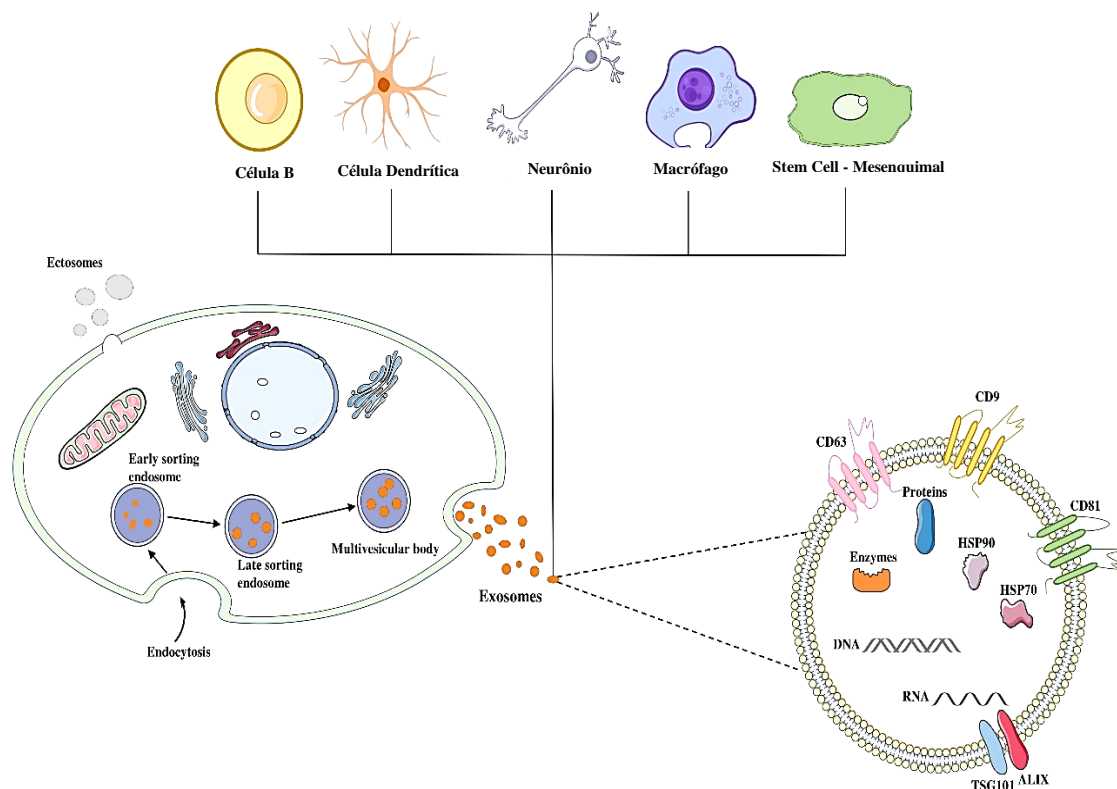
Como abordado anteriormente, a importância das células que compõem o microambiente medular na progressão de doenças hematológicas tornou-se amplamente evidenciada nos últimos anos, estudos mostram que essas células apresentam moléculas de superfície capazes de modular o sistema imune, e para além, essas células também secretam vesículas extracelulares, corpos apoptóticos e nanopartículas, que auxiliam no carreamento de fatores solúveis, e facilitam a comunicação celular. Essas partículas são classificadas e diferenciadas de acordo

com a forma que são secretadas pelas células de origem, seu tamanho, biogênese e a sua morfologia (NIEUWLAD et al., 2022).

Nos últimos anos, os estudos têm sido direcionados ao possível papel das VEs nas mais diversas patologias, contudo, estudar VEs é um desafio, devido as suas propriedades físicas, sua heterogeneidade e como isso afeta o isolamento, a detecção e sua caracterização, além de que, por se tratar de partículas nanométricas, se torna necessário a utilização de equipamentos com alta sensibilidade para detecção (POUPARDIN et al., 2021). Mediante a isso, a Sociedade Internacional de Vesículas criou uma série de diretrizes através do MISEV (Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular vesicles) a fim de assegurar que os dados que estão sendo gerados e publicados, são replicáveis, confiáveis e condizentes com o que podemos encontrar nas VEs e não apenas falsos positivos ou negativos (LOTVALL et al., 2014; THÉRY et al., 2018; WITWER et al., 2021).

A partir das diretrizes já estabelecidas, é factível acreditar que as VEs são secretadas por todos os tipos celulares (figura 5), o que traduz a sua heterogeneidade, podendo apresentar tamanho, função e composição diferentes. As VEs podem ser liberadas diretamente da membrana da célula-mãe, através do brotamento ou após a fusão dos corpos multivesiculares endossomais com a membrana plasmática. Sua classificação se dá de acordo com o tamanho, em vesículas pequenas que variam de <100nm - <200nm, vesículas médias, >200 e vesículas grandes >500nm. Elas podem ser encontradas no plasma, urina, ascite, linfa, líquido cefalorraquidiano e no estroma medular (THÉRY et al., 2018; OLEJARZ, et al., 2020; DEVILLE et al., 2021).

Figura 5- Biogênese e composição das vesículas extracelulares. As VEs podem ser secretadas por quase todos os tipos de células do corpo, como MSCs, células dendríticas e linfócitos B.



Fonte: Adaptado de YANG et al., 2023 (Traduzido).

Nota: Componentes fluidos e extracelulares podem entrar nas células com proteínas da superfície celular através de endocitose e invaginação da membrana plasmática. Este processo leva à formação de endossomos de classificação precoce. As VEs são secretadas e expressam marcadores de superfície EV CD63, CD9 e CD81, e contêm DNA, RNA e algumas proteínas comuns, incluindo proteínas de biogênese.

Funcionalmente, acredita-se que as VEs possam ser utilizadas como transportadores de moléculas de sinalização, participem da troca de informações e biomateriais por meio da transferência de proteínas, DNA, RNA e microRNA e também dos processos de resposta imune, apresentação de antígenos, transporte de fatores inflamatórios, citocinas, migração celular, e invasão de células tumorais implicando em importantes papéis fisiológicos e patológicos através da comunicação cruzada com células adjacentes - interação local e células alvo distantes - interação sistêmica (SIMEONE et al., 2020).

Contudo, todos esses fatores dependem da sua composição, pois ela reflete as células que lhe secretaram e esse fator orienta sua biodistribuição, absorção e internalização nos tecidos. As VEs podem apresentar na sua superfície diversos marcadores, como anexina, HLA-G, CD63, CD9 e CD81, além de serem compostas por lipídios (colesterol, fosfatil serina, esfingomiéline e ceramíneas), proteínas (moléculas apresentadoras de antígeno, moléculas de adesão, moléculas transportadoras de membrana, enzimas, proteínas do citoesqueleto e da transdução

de sinal), ácidos nucléicos ou moléculas patogênicas como toxinas e virions (LORICO et al., 2021; WITWER et al., 2021).

Estudos já apontam as diferenças entre os VEs liberadas por células normais e os que são expressos a partir de células cancerígenas. Na metástase tumoral e na resposta à quimioterapia, as VEs podem fornecer aos tumores nutrientes, oxigênio, metabólitos e vários outros fatores, além de promover fatores angiogênicos, devido ao transporte de moléculas de adesão que podem estar diretamente ligados aos fatores metastáticos (WEIDLE et al., 2017).

No microambiente hematológico, quando produzidos na medula óssea (MO) por células leucêmicas ou estromais estabelecem linhas bidirecionais de comunicação entre essas células e são capazes de modificar as suas funções. Quando liberados por células leucêmicas interagem com células endoteliais promovendo a angiogênese (NIAZI et al., 2020), influenciando na resistência a drogas quimioterápicas, além de induzir fatores oncogênicos (MUDGAPALLI et al., 2019; DENG et al., 2020).

Dentro do próprio quadro das leucemias, acredita-se que as VEs podem divergir na composição, já que os derivados da LMA podem ser ricos em RNAs codificadores e não codificantes específicos, que estão intimamente relacionados à patogênese da LMA. Esses podem ser absorvidos e promover negativamente a expressão de genes relacionados à regulação hematopoiética, e em células estromais, diminuindo a capacidade de formação de colônias de células progenitoras-tronco hematopoiéticas, inibindo a transcrição hematopoiética, sendo através desses fatores a promoção da inibição da função hematopoiética normal na MO (YAN et al., 2021).

A transferência dos bioativos celulares com o objetivo de alterar a função celular, a interação com receptores de membrana, alteração nas vias de transdução de sinal, modulação do fenótipo celular, ou indução para o agravamento a doença (MUDGAPALLI et al., 2019) fazem com que as VEs apresentem um significado como biomarcadores para diagnóstico, prognóstico, resposta ao tratamento e tenham um potencial uso terapêutico de impacto no processo saúde/doença. Porém, os papéis biológicos e funcionais dessas VEs na leucemia ainda não são totalmente esclarecidos, e os mecanismos regulatórios e de transporte ainda permanecem incertos portanto, o seu estudo permite esclarecer os mecanismos celulares envolvidos nas diferentes vias biológicas.

### 3.5 Desregulação do microambiente medular leucêmico

Como já postulado anteriormente, a desregulação e a perda do equilíbrio na rede de interações do microambiente medular causam danos em níveis locais e sistêmicos, além de desencadear processos patológicos e facilitar a sua progressão.

As leucemias originam-se de lesões genéticas ou epigenéticas em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e em progenitores linfóide/mieloide, que dão origem à expansão clonal e ao acúmulo desordenado de células indiferenciadas e disfuncionais na medula óssea e no sangue periférico. As leucemias são o câncer mais comum em crianças e adolescentes no mundo, representando 1 a cada 3 casos de câncer diagnosticados, em 2017 a América Latina foi listada como a região onde as crianças mais perdem a vida pela doença (LINS et al., 2017; FORCE et al., 2019).

Para reverter essa métrica, ao longo dos anos obtivemos diversos avanços no combate as leucemias. Com relação ao diagnóstico, ele se tornou mais rápido e mais específico, auxiliando na identificação de alterações moleculares, citogenéticas e imuno fenotípicas, contribuindo para a classificação de risco dos pacientes e assim o direcionamento dos seus tratamentos, ajustando o percentual de quimioterápicos. Esses aperfeiçoamentos, tem proporcionado para esses pacientes uma maior chance de remissão com o tratamento e assim uma maior sobrevida global e sobrevida livre de doença (VAN DONGEN et al., 2012; OMAR et al., 2022).

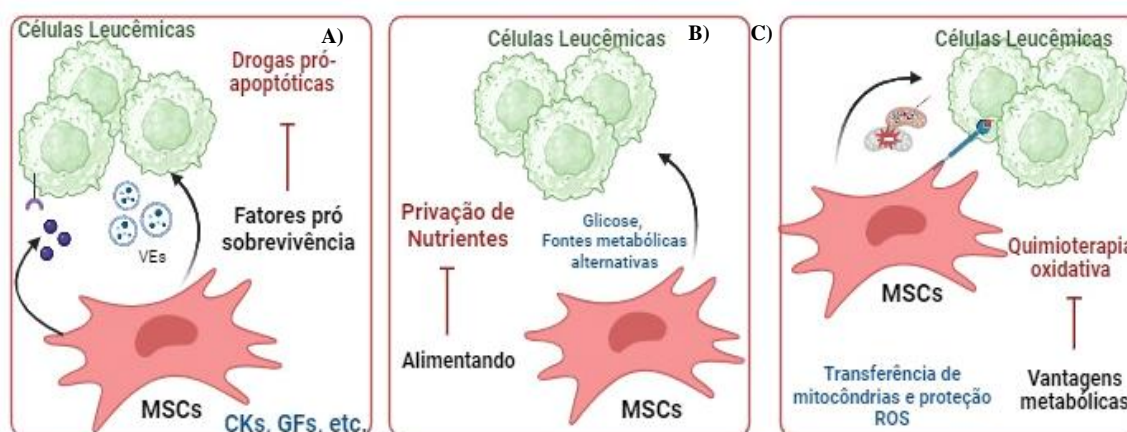
A remissão no tratamento leucêmico significa que após a terapia de indução, o paciente respondeu ao tratamento e apenas um percentual mínimo de células blásticas foram ou não identificadas na medula. Para os pacientes atendidos no Instituto de Medicina Integral professor Fernando Figueira (IMIP), altas taxas de remissão para a leucemia linfóide de baixo risco (90%) foram alcançadas, contudo, a falha do tratamento e a recaída ainda são obstáculos expressivos na LMA, que possui sobrevida de apenas 60% (LINS et al., 2017; PEDROSA et al., 2020).

Essa recaída é determinada pelo aumento no número de células imaturas, desencadeadas por um precursor leucêmico que se fixou na medula, no caso células leucêmicas quimiorresistentes. Mediante a isso, essas células residuais são monitoradas após a terapia de indução e ao longo do protocolo de tratamento, através da avaliação da doença residual mensurável (DRM) por citometria de fluxo ou da biologia molecular no caso da leucemia promielocítica e Filadélfia positiva (VAN DOGEN et al., 2012; JUÁREZ-AVENDAÑO et al., 2021).

No entanto, apesar de métodos extremamente sensíveis e acurados, pacientes que apresentam negatividade na doença residual mensurável ainda podem não responder ao tratamento e sofrerem recaída da doença, além do mais, as características precisas das células quimiorresistentes e os mecanismos subjacentes à mudança celular de estado sensível para o resistente aos medicamentos ainda são indefinidos, principalmente *in vivo*. Acredita-se que, assim como a maturação hematopoiética, essa fixação do clone leucêmico seja regulada por fatores extrínsecos e intrínsecos, como fatores de crescimento, moléculas de adesão, citocinas e VEs (DANDER et al., 2021; CICIARELLO et al., 2021).

Mais recentemente, foi descrito que as células imunológicas e estromais também poderiam fomentar a resistência aos medicamentos, influenciando e modificando as características intrínsecas às células (KIHIRA et al., 2020). Especificamente, entre as células progenitoras do estroma, já aqui anteriormente citadas, as MSCs (figura 6) e inicialmente descritas como um dos componentes essenciais para o nicho e manutenção das HSC, elas têm se revelado como um fator modulador de proteção para as células leucêmicas contra terapias (CICIARELLO et al., 2021).

Figura 6- Efeitos antiapoptóticos mediados pelas células medulares.



Fonte: Adaptado de CICIARELLO et al., 2021.

Nota: Mecanismos de resistência à terapia dependentes de MSC. As células estromais mesenquimais (MSCs)- em roxo- sustentam as células leucêmicas de diversas maneiras. ( **A** ) fornecendo fatores pró-sobrevivência (diretamente, mediados por VEs. ( **B** ) fornecendo substratos metabólicos alternativos à glicose, ( **C** ) religando o metabolismo celular. Cada um desses mecanismos interfere em uma estratégia terapêutica diferente (vermelho).

O tratamento citotóxico utilizado para as leucemias tem por objetivo promover a indução da morte celular programada através da apoptose (VASAN et al., 2019). Contudo, estudos indicam que o microambiente medular, com enfoque nas células MSCs tem oferecido proteção contra agentes citotóxicos, ativando sinais

antiapoptóticos e levando a maior sobrevivência celular, resistência e ineficiência a terapia. Além da inativação quimioterápica, a presença dessas células leucêmicas no contexto medular altera a quiescência desse nicho e promovem um ambiente inflamatório, com o aumento da liberação de citocinas e quimiocinas, pró inflamatórias, danificando os tecidos adjacentes e promovendo um ambiente ideal para sua proliferação (MIAO et al., 2020).

Mediante o exposto, é admissível acreditar que as células cancerígenas remodelam o comportamento dos componentes iniciais desse nicho para fixação do clone leucêmico e promova a inibição da hematopoiese fisiologicamente normal, causando alterações críticas no nicho medular. Contudo, essa modulação bidirecional pode ser ativada por muitas vias e por muitos fatores, por isso ainda é pouco descrita e compreendida.



## 4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E METODOLOGIA

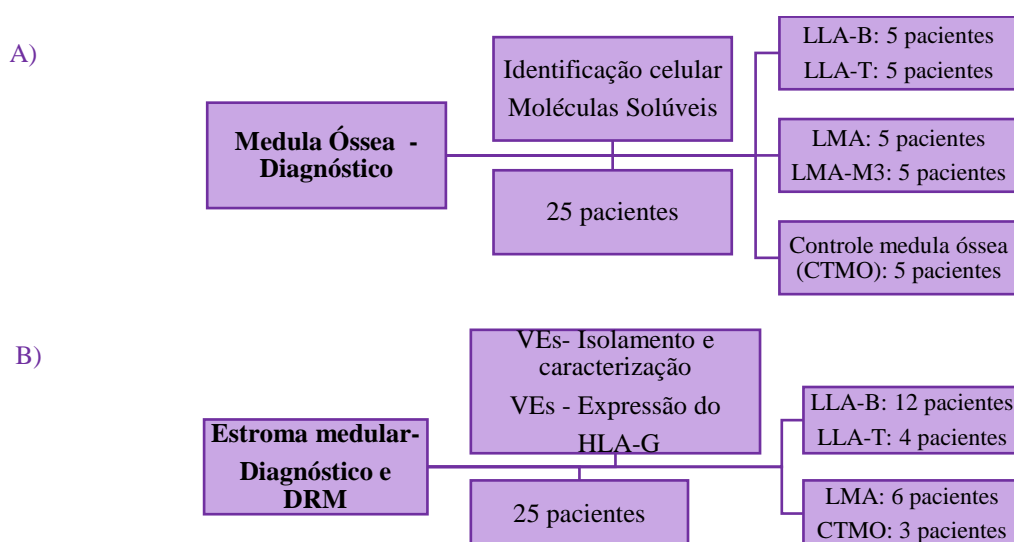
### 4.1 Considerações éticas

Esse trabalho é integrante de um projeto maior em andamento no grupo, intitulado: “Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância” (CAAE:83186017.6.0000.5190) que visa esclarecer a diferença nos níveis de HLA-G entre as leucemias mieloides e linfoides e a diferença entre a forma solúvel ou acoplada nas vesículas extracelulares. Esse projeto é uma parceria entre o Laboratório de Imunogenética da Fundação Oswaldo Cruz de Pernambuco (FIOCRUZ-PE) e o setor de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP).

### 4.2 Desenho e população de estudo

Este estudo é experimental e descritivo, sendo a nossa população de estudo composta por 50 pacientes menores de 22 anos atendidas no setor da Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira-IMIP/PE. Os pacientes controles são pacientes que tiveram hipótese diagnóstica para leucemia descartada. As amostras foram obtidas a partir da rotina clínica diagnóstica, que inclui o exame citológico, imunofenotipagem, biologia molecular, e posterior armazenamento em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Fluxograma 1 - Desenho da nossa população de estudo. A) Pacientes para avaliação das células; B) Pacientes para avaliação das VEs.



Fonte: A autora,2023.

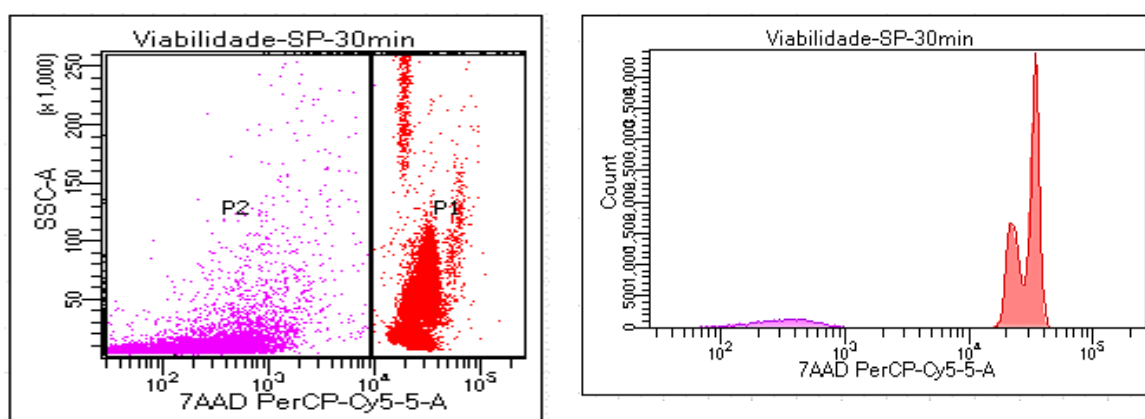
O critério para avaliação da DRM nas fases de indução ou consolidação da quimioterapia, dependem do tipo de leucemia e do protocolo clínico de tratamento pré-definido. Os pacientes com LMA-M3 formam um subgrupo, pois o protocolo de tratamento para esses pacientes é diferente das demais LMAs. Os dados clínicos (sexo, idade, prognóstico), laboratoriais (hemoglobina, hematócrito, plaqueta, DHL, 1ª DRM-imuno) e de desfecho (remissão, recaída, óbito) foram obtidos a partir de prontuários do paciente no início do protocolo clínico e durante a execução desse estudo.

### 4.3 Isolamento das células do microambiente medular

As células foram obtidas após a separação dos componentes da medula óssea por centrifugação, através do gradiente de densidade estabelecido pelo Ficoll-Hystopaque e centrifugado mais uma vez a 1,500xg por 10min a 4°C. Posteriormente, realizamos a contagem e congelamento de  $5 \times 10^6$  das células, com 70% de meio RPMI, 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido), sendo armazenamos no freezer -80°C.

Após descongeladas essas células foram submetidas verificação da viabilidade com marcação com 7AAD (7-Aminoactinomicina D), um composto químico fluorescente com afinidade para o DNA. Para o controle da nossa viabilidade e padronização do gate, células de um doador saudável, do sangue periférico foram submetidas a etanol 100% e marcadas com o 7AAD (figura 7), definindo que as células mortas (positivas para o 7AAD) se encontram após a marca de  $10^4$ , possibilitando a retirada delas da análise.

Figura 7- Ilustração do gate utilizado para o controle da viabilidade, a partir de células de doador saudável, submetidas a apoptose e marcação com 7AAD.



Fonte: A autora, 2023.

#### 4.4 Citometria de Fluxo – Avaliação das células da medula óssea

Para compreender a biologia do nicho medular e compreender as interações celulares que acontecem entre os progenitores hematopoiéticos humanos e as demais células que fazem parte desse microambiente, determinamos um painel de anticorpos para oito antígenos com diferentes fluorocromos (quadro 1). Para as células mesenquimais a identificação foi através do CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> e CD44<sup>+</sup>, para as raras células endoteliais utilizamos o CD133<sup>+</sup> e o CD31<sup>+</sup>, células hematopoiéticas utilizamos o CD45<sup>+</sup>, e como marcador de imaturidade o CD34<sup>+</sup>, sendo todos esses marcadores relacionados com o HLA-G, visando o estudo da modulação imune no ambiente tumoral.

Quadro 1 - Painel de mapeamento do microambiente medular.

Painéis	Marcadores							
	FITC	PE	Percp5.5	PEcy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 1</b>	CD90	HLA-G	CD34	CD105	CD133	CD44	CD31	CD45
Clone	(5E10)	(MEMG/9)	(8G12)	(TEA3/1711)	(W6B3C1)	(J.173)	(5.6E)	(2D1)

Fonte: A autora, 2023.

A fluorescência foi mensurada no citômetro FACSCanto II (Becton Dickson, San Jose, EUA) compensado segundo os parâmetros do Euroflow, que consiste em um grupo de especialistas que desenvolve e padroniza testes de citometria de fluxo rápidos, precisos e altamente sensíveis para diagnóstico e classificação de malignidades hematológicas. Foi realizada a aquisição de  $1-5 \times 10^5$  de eventos para cada tubo. Os dados foram analisados utilizando o software Kaluza, Beckman Coulter.

#### 4.5 Citometria de Fluxo para avaliação das moléculas solúveis no microambiente medular

O perfil da expressão das moléculas moduladoras (HLA-G, PD1, PD-L1) nas células foi avaliado através da utilização de um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, EUA -BD e Beckman Coulter Life Sciences -BC), estabelecido pelo grupo com o objetivo de identificar antígenos de diferenciação específicos nas linhagens celulares na medula fisiológica e patológica (quadro 2).

Quadro 2 - Painel de mapeamento para as moléculas moduladoras.

Painéis	Marcadores							
	FITC	PE	Percp5.5	PEcy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 2</b>	CD90	HLA-G	PD1	CD13	PD-L1	CD19	CD9	CD45
Clone	(5E10)	(MEMG/9)	(PD1.3)	(L138)	(PD-L1)	(J3-119)	(M-L13)	(2D1)

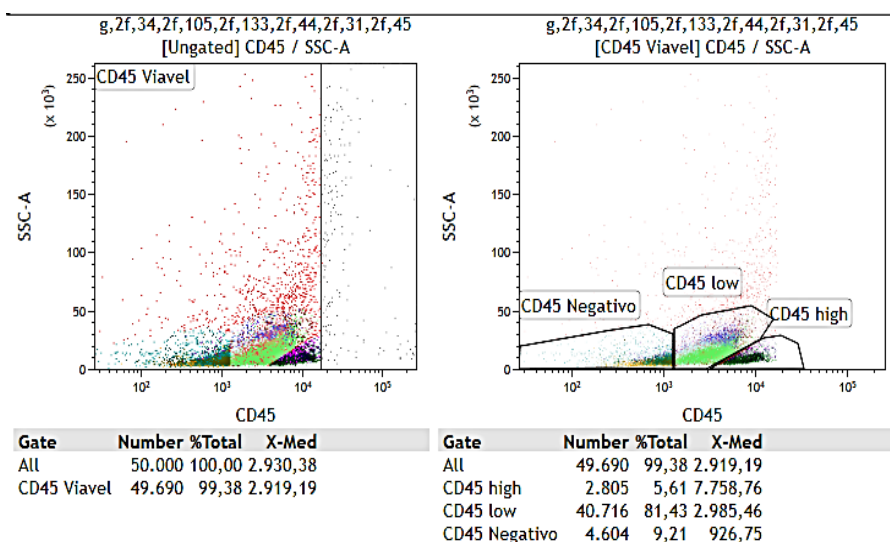
Fonte: A autora, 2023.

A fluorescência novamente foi mensurada no citometro FACSCanto II (Becton Dickson, San Jose, EUA), sendo realizada a aquisição de  $1-5 \times 10^5$  de eventos para cada tubo. Assim como no tópico anterior, os dados foram analisados utilizando o software Kaluza, Beckman Coulter Life Sciences.

#### 4.6 Fluxograma de Análise

Estabelecemos os gates inicialmente através do CD45, definidos em CD45*high*/alta, CD45*low*/baixa expressão e CD45negativo (figura 8). Para este trabalho as nossas análises consideram apenas o CD45*low*/baixa expressão e o CD45negativo, porque o CD45*high* é característico de linfócitos maduros normais e a sua inclusão representaria um viés na análise com a inserção de falsos positivos.

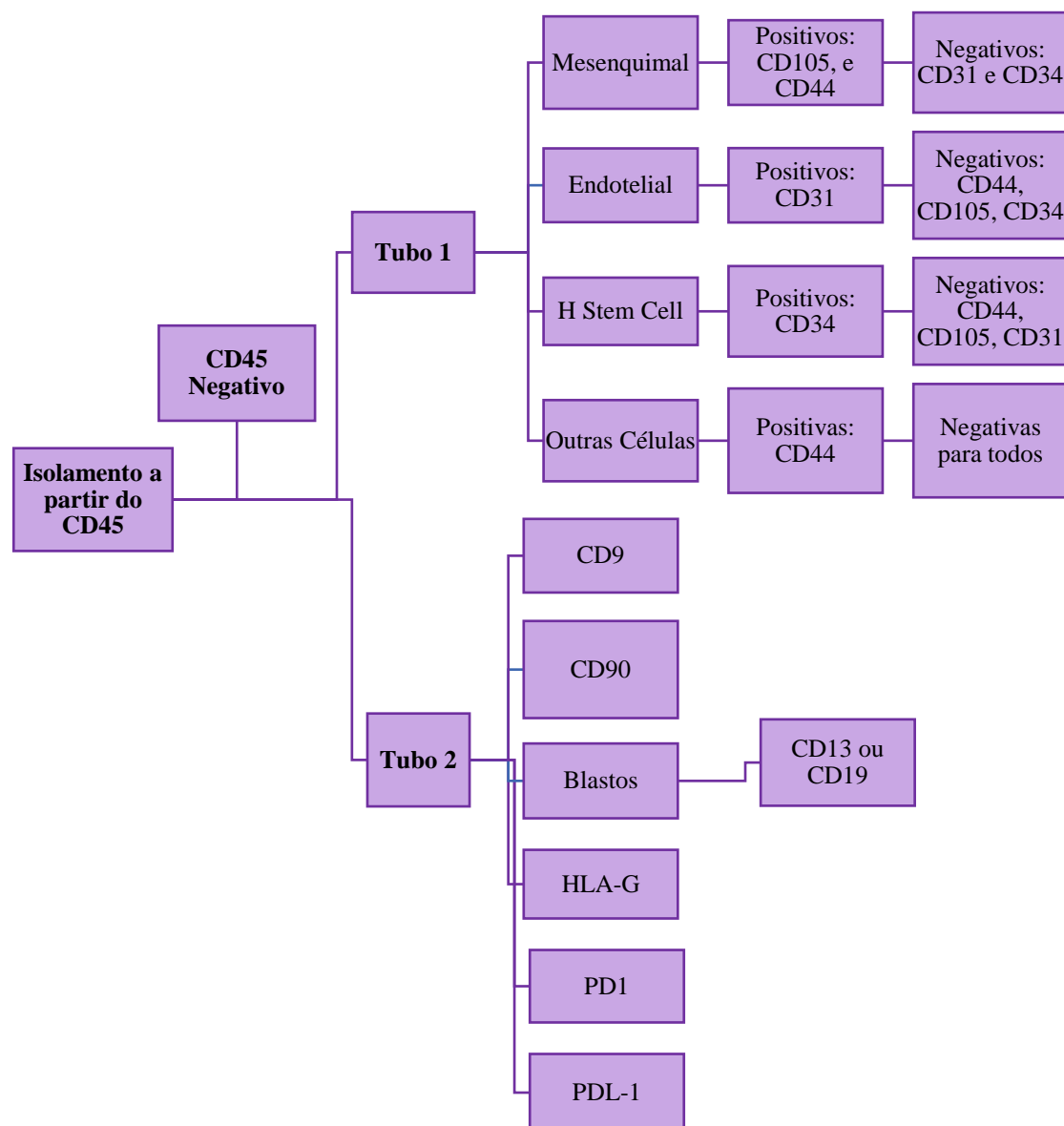
Figura 8- Ilustração de gates estabelecidos por intermédio dos pacientes controles, mediante a expressão do CD45.



Fonte: A autora, 2023.

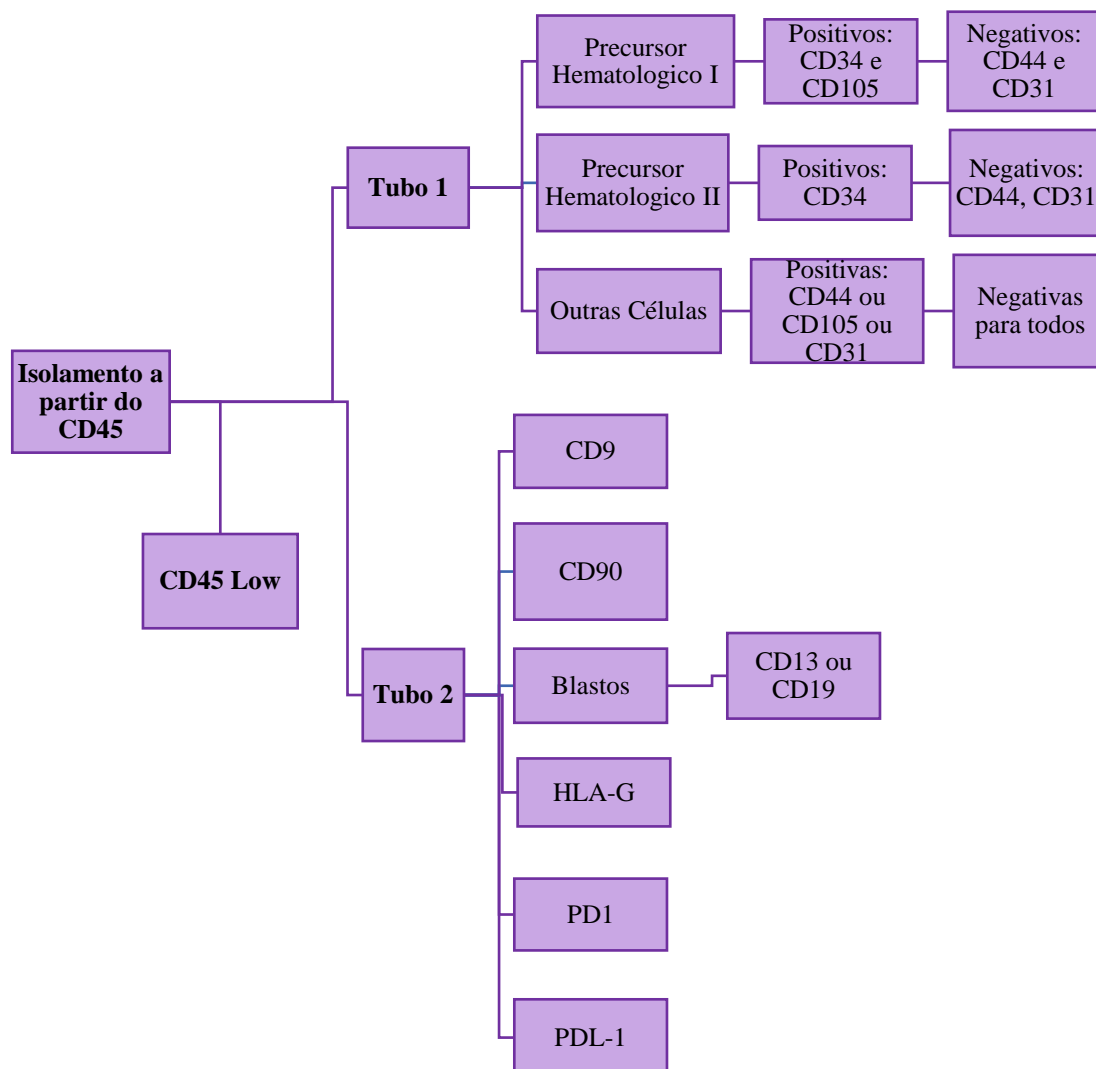
Posteriormente, os resultados foram descritos em valor percentual de células positivas ou negativas para determinado anticorpo (fluxograma 2). Sendo a sua intensidade de expressão determinado pelos valores medianos das fluorescências.

Fluxograma 2- Esquema utilizado para análise celular dos pacientes, a partir do isolamento pelo CD45 negativo.



Fonte: A autora, 2023.

Fluxograma 3- Esquema utilizado para análise celular dos pacientes, a partir do isolamento pelo CD45 low.



Fonte: A autora, 2023.

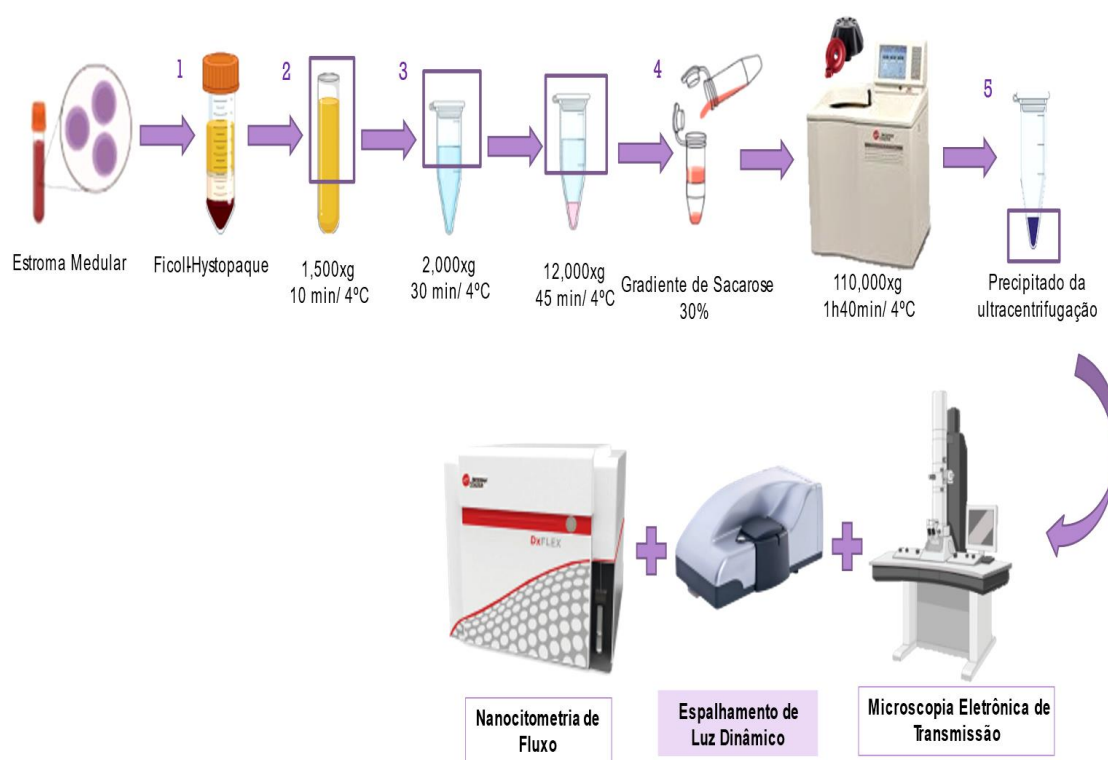
Todas as análises compararam os resultados entre os grupos controle/linfóide e controle/mieloide. Dessa forma, os resultados estão dispostos de maneira que se torna possível identificar as modulações exercidas pelas moléculas em cada linhagem.

#### 4.7 Isolamento das vesículas extracelulares

As amostras de estroma medular foram obtidas após a separação dos componentes da medula óssea por centrifugação através do gradiente de densidade

estabelecido pelo Ficoll-Hystopaque (Thermo Fisher), e, como forma de garantir uma preparação livre de células, foi novamente centrifugado a 1.500xg por 10min a 4°C. Posteriormente o estroma foi armazenado em freezer -80°C. Após o descongelamento o estroma foi diluído em uma proporção 1:1 com tampão PBS1x para diminuir a viscosidade do estroma e submetido a centrifugação a 2.000xg por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante submetido a nova centrifugação a 12.000xg por 45 minutos a 4°C, com o objetivo de remover o máximo de restos celulares da amostra. O sobrenadante dessa última centrifugação foi submetido a uma ultracentrifugação a 110.000xg por 1 hora e 40 minutos a 4°C através do rotor de ângulo fixo 70ti, com gradiente de sacarose a 30%. O precipitado do ultra centrifugado foi suspenso em PBS1x para a caracterização das vesículas extracelulares através de diferentes metodologias (fluxograma 4).

Fluxograma 4- Isolamento das vesículas extracelulares, metodologia correspondente à baixa recuperação, alta especificidade.



Fonte: A autora, 2023.

A metodologia de isolamento escolhida para esse estudo garante um padrão de baixa recuperação, por conter muitas etapas que podem alterar a integridade das

VEs ou promover a perda do material biológico. Porém, garante uma alta especificidade já que através dos processos de lavagens e centrifugações as partículas maiores presentes nesse estroma foram retiradas. Para garantir a confiabilidade do nosso estudo os sobrenadantes das ultracentrifugações também foram marcados e avaliados na nanocitometria. Além disso, nós avaliamos a veracidade dos nossos resultados, realizando a nanocitometria de amostras apenas até a etapa da centrifugação média, sem a ultracentrifugação.

#### **4.8 Caracterização das vesículas extracelulares**

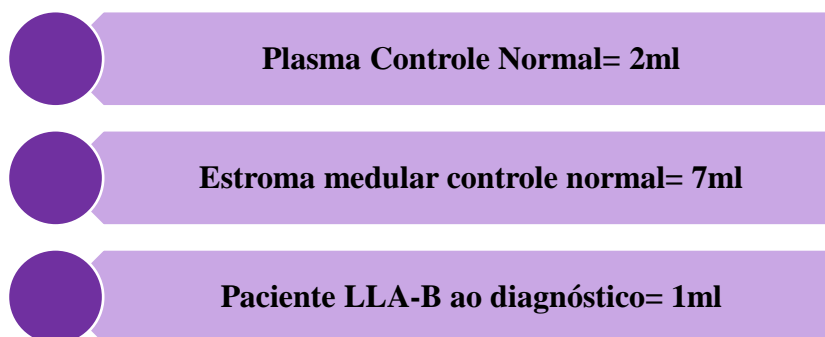
A acurácia do nosso isolamento foi verificada a partir caracterização das vesículas extracelulares, realizada seguindo as recomendações do MISEV (Informações Mínimas para Estudos de Vesículas Extracelulares) 2018 e 2022. Para isso foram utilizadas 3 metodologias com sensibilidade acurada para partículas de menor tamanho.

- A. **Microscopia eletrônica de Transmissão (MET).** Para essa metodologia utilizamos 7ml de um concentrado de estroma medular de paciente normal. O precipitado da ultracentrifugação foi submetido a contrastação negativa, sendo fixado com glutaraldeído (GA) a 2,5% e corado com uma solução filtrada de 2% de acetato de uranila (UA). A análise foi realizada no microscópio eletrônico de transmissão a 120kV. Sendo essa metodologia realizada em parceria com o Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz-PE com o objetivo de identificar vesículas de diferentes tamanhos.
- B. **Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).** Para a mensuração da DLS, utilizamos 2ml do estroma medular de um paciente com LLA-B ao diagnóstico. O precipitado da ultracentrifugação foi diluído de 1/10 e avaliado quanto ao índice de dispersão (PDI), potencial zeta (PZ) e ao seu diâmetro, sendo mensurado em triplicata e em temperatura ambiente através do Zetasizer Nano (Malvern Panalytical).
- C. **Nanocitometria de fluxo.** Por último, os ultracentrifugados foram avaliados segundo os parâmetros de alta resolução para a nanocitometria de fluxo com



limite de detecção mínima de 80nm, através do Citômetro - DxFLEX Beckman Coulter Life Sciences, sendo um dos lasers na faixa do ultravioleta para a avaliação do plot SSC x FSC. Submetemos nossas VEs a marcação com os anticorpos monoclonais, anti-anexina, anti-CD9, anti-CD81, anti-CD235a e anti-CD41 (Becton Dickinson and Company, EUA) para a caracterização das VEs, seguindo a recomendação do MISEV (Minimal information for studies of extracellular vesicles), 2018 e 2022

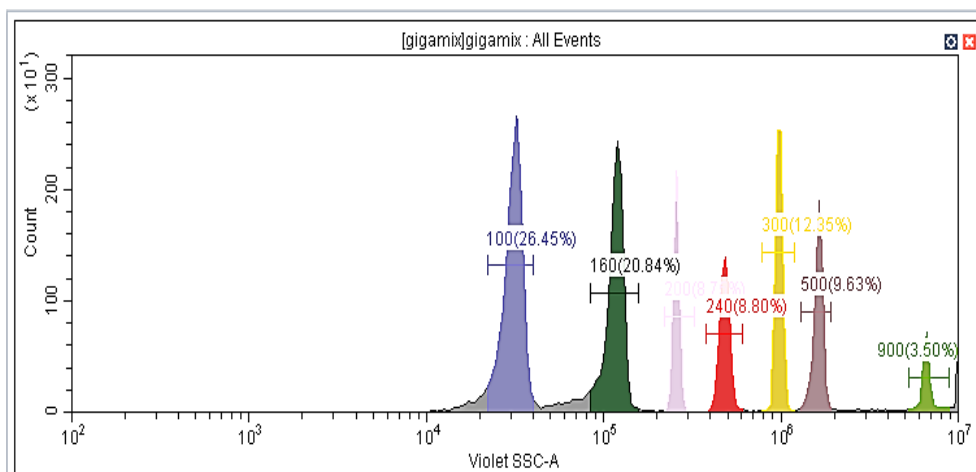
Organograma 1- Descrição das amostras utilizadas para caracterização através da nanocitometria de fluxo com o equipamento DXFlex -Beckman Coulter Life Sciences.



Fonte: A autora, 2023.

Na nanocitometria de fluxo as VEs ultracentrifugadas foram identificadas e comparadas com o Megamix-Plus (Biocitex), um concentrado de *beads* com nanopartículas de tamanhos conhecidos e certificados, a fim de padronizar o tamanho das partículas no nosso concentrado. Os eventos foram checados quanto aos parâmetros SSC e FSC utilizando o laser ultravioleta, sendo toda a análise de fluorescência realizada pelo software CytExpert para a plataforma DXflex.

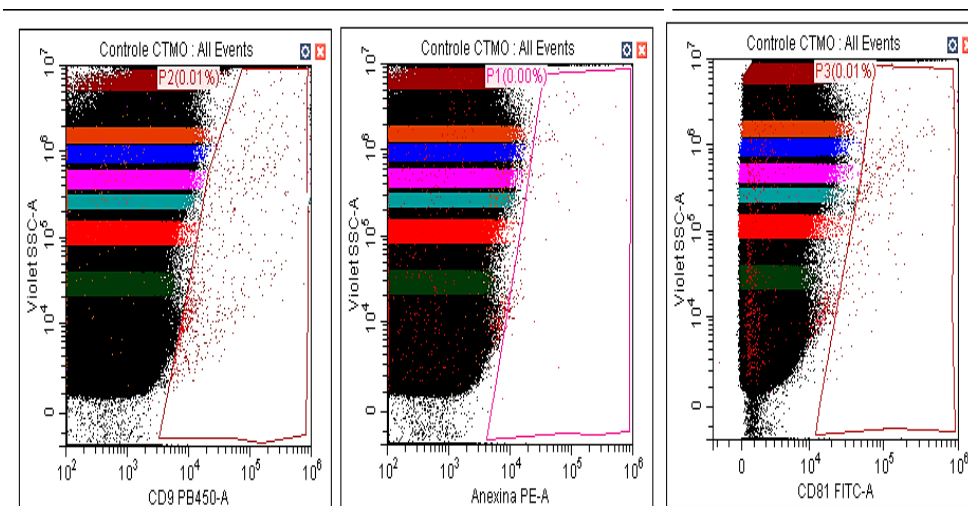
Figura 9- Histograma referente ao percentual de VEs identificadas na nanocitometria através do padrão Gigamix.



Fonte: A autora, 2023.

Os gates utilizados para a identificação da nossa população de estudo foram otimizados através dos controles de marcação com tubos contendo apenas tampão e anticorpos específicos para a identificação de VEs, com o objetivo de identificar e retirar a autofluorescência emitida (figura 10).

Figura 10- Gates de referências para o CD9-V450/Anexina-PE/CD81-FITC. A detecção da autofluorescência deve ficar menor ou igual a 0,01% dentro do gate.



Fonte: A autora, 2023.

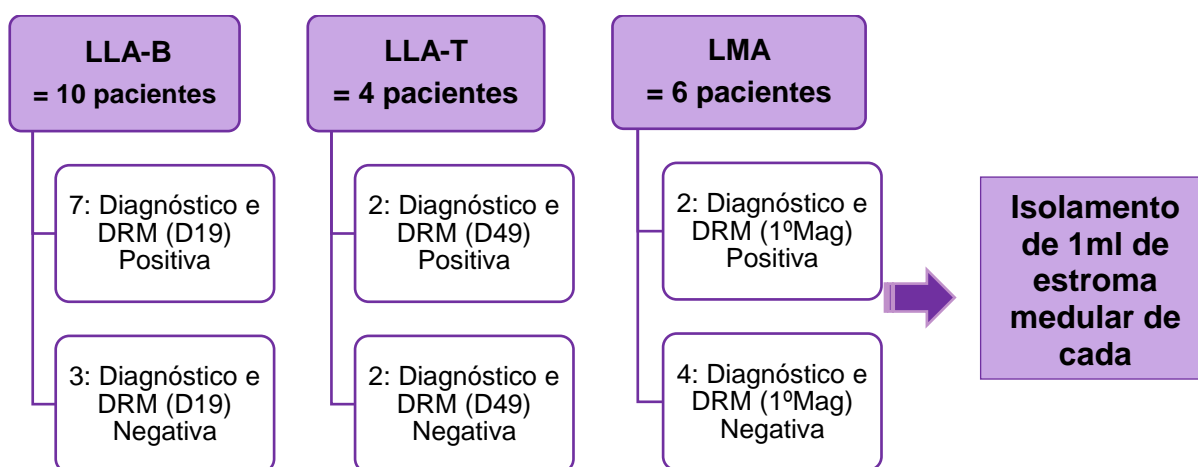
Nota: Em todos os experimentos replicamos os tubos contendo apenas anticorpos e tampão, utilizando como controle de gate durante as análises.

#### 4.9 Identificação de HLA-G nas Vesículas extracelulares

**A) Citometria de Fluxo:** Para a identificação da expressão de HLA-G nas VEs,

avaliamos um novo grupo pediátrico composto por vinte pacientes ao diagnóstico e durante a fase de indução ou consolidação do tratamento leucêmico (a depender da leucemia e do protocolo de tratamento). A metodologia de isolamento dessas VEs foi o mesmo descrito no tópico 4.3, porém, não utilizamos o gradiente de sacarose para que pudéssemos analisar todas as VEs, inclusive as liberadas pelas células maiores, sem nenhuma perda.

Fluxograma 5- Descrição dos subtipos leucêmicos utilizados para a identificação do HLA-G nas VEs.



Fonte: A autora, 2023.

Através dos anticorpos monoclonais avaliamos a coexpressão do HLA-G com as possíveis linhagens de células secretoras dessas VEs (quadro 3). Os marcadores utilizados foram: Mieloide (CD33 ou CD13), linfoides (CD7 ou CD19), hematológica (CD45 e CD34), mesenquimal (CD90) e para VEs (CD9 e HLA-G).

Quadro 3- Painel de identificação de HLA-G a partir de VEs secretadas por diferentes tipos celulares na leucemia, ao diagnóstico e na DRM.

Painéis	Marcadores						
	FITC	PE	Percp5.5	PEcy7	APC	V450	V500
<b>Painel LLA-B</b>							
<b>Tubo 1(LLA-B)</b>	HLA-G		CD34	CD19		CD9	
<b>Clone</b>	(MEM G/11)		(8G12)	(SJ25C1)		(M-L13)	
<b>Tubo 2 (LLA-T e LMA)</b>	HLA-G			CD33	CD7	CD9	
<b>Clone</b>	(MEM G/11)			(P67-6)	(M-T701)	(M-L13)	
<b>Tubo 3 (Mesenquimal)</b>	HLA-G	CD90				CD9	CD45
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(EPR3133)				(M-L13)	(2D1)
<b>Painel LLA-T</b>							
<b>Tubo 1(LLA-T)</b>	HLA-G		CD34		CD7	CD9	

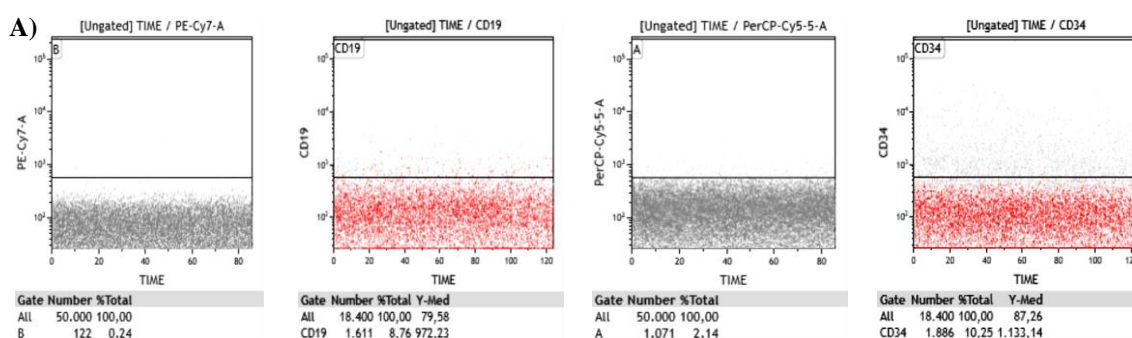
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(8G12)	(M-T701)	(M-L13)
<b>Tubo 2(LLA-B e LMA)</b>	HLA-G	CD19	CD13	CD9
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(HIB19)	(L138)	(M-L13)
<b>Tubo 3 (Mesenquimal)</b>	HLA-G	CD90	CD9	CD45
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(EPR3133)	(M-L13)	(2D1)
<b>Painel LMA</b>				
<b>Tubo1 (LMA)</b>	HLA-G	CD34	CD13	CD9
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(8G12)	(L138)	(M-L13)
<b>Tubo2 (LLA-B e LLA-T)</b>	HLA-G	CD19	CD7	CD9
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(HIB19)	(M-T701)	(M-L13)
<b>Tubo3(Mesenquimal)</b>	HLA-G	CD90	CD9	CD45
<b>Clone</b>	(MEM G/11)	(EPR3133)	(M-L13)	(2D1)

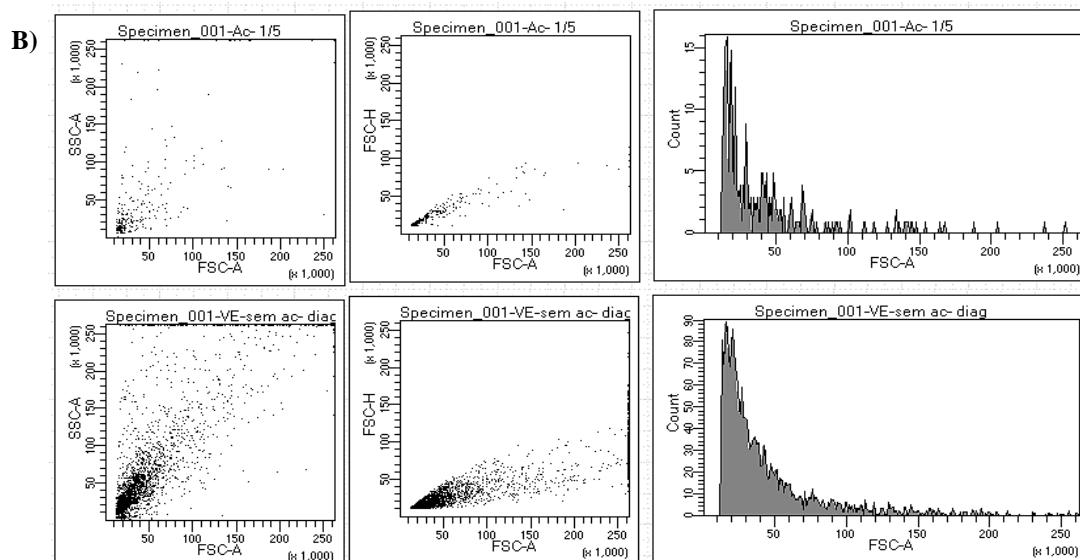
Fonte: A autora, 2023.

A fluorescência foi mensurada no citômetro FACSCanto II (Becton Dickson, San Jose, EUA) com limite de detecção de 500nm, sendo realizada a aquisição de todos os eventos para cada tubo, não sendo considerados os parâmetros de tamanho e complexidade interna do laser ultravioleta para estratégia de gates, por isso, para esses resultados nos referimos apenas como vesículas extracelulares, sem distinção de vesículas menores ou médio/grandes.

Como parâmetro de qualidade, realizamos um padrão de marcação com tubos contendo apenas anticorpos e tampão, assim como na nanocitometria, para a comparação dos padrões de autofluorescência. Além disso, testamos diferentes concentrações de anticorpos para minimizar a formação de aglomerados de anticorpos, e definimos uma diluição de 1:5 dos coquetéis de anticorpos e comparamos com a intensidade de fluorescência emitida pelas VEs sem marcação (figura 11).

Figura 11– Parâmetros de qualidade. A- Gates de referência através do time para autofluorescência para os anticorpos apenas com tampão e com VEs. B- Padronização da diluição dos anticorpos para diminuir interferências.





Fonte: A autora, 2023.

Os dados foram analisados utilizando os softwares Diva (Becton Dickinson, EUA) e Kaluza (Beckman Coulter Life Sciences), estando os resultados descritos em valor percentual de partículas positivas ou negativas para determinado anticorpo.

#### 4.10 Análise estatística

Os dados foram descritos utilizando média ou mediana para variáveis contínuas e percentagens para as categóricas. Os valores médios das medianas de fluorescência para cada marcador em cada população isolada foram comparadas nas amostras ao diagnóstico e na amostra correspondente a DRM, considerando os pacientes classificados como de baixo risco e alto risco. Os valores de expressão das moléculas solúveis e antígenos de superfície foram correlacionados ao tipo e quantidade de células afetadas, alterações moleculares, leucometria, hemoglobina, hematócrito, plaqueta e DHL ao diagnóstico, ao resultado da primeira DRM pela citometria de fluxo, e ao desfecho clínico (óbito, recaída, remissão completa, resistência ao tratamento e ocorrência de segunda neoplasia), dados obtidos dos prontuários dos pacientes. Os resultados de expressão de moléculas alvos foram analisados com o software GraphPad Prism V5.0, considerando  $P < 0,05$  como significativo. Após o teste Kolmogorov- Smirnov de normalidade, na comparação de dados paramétricos foi usado teste t de Student ou ANOVA, e a de dados não paramétricos usando Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para 2 ou mais grupos, respectivamente.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Descrição demográfica da população estudada

Para a identificação celular das moléculas solúveis ao diagnóstico, este estudo envolveu 25 pacientes, 5 pacientes controles e 20 pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda. Dentre as características antropométricas da nossa população de estudo (tabela 1), observamos que existe uma maior porcentagem de meninos acometidos para os pacientes da linhagem linfoide e de meninas acometidas para a linhagem mieloide. Em relação a idade, nossa população se distribui entre crianças com 1 ano até os 22 anos de idade, sendo esse paciente com maior idade uma recaída atendida no setor pediátrico. No mais, o grupo LLA-B correspondente aos pacientes mais novos, menores de 6 anos.

Tabela 1– Perfil antropométrico da população de estudo (dados coletados dos prontuários clínicos).

<b>Leucemias=</b>	<b>LLA-B</b>	<b>LLA-T</b>	<b>LMA</b>	<b>LMA-M3</b>
N/%=	5	5	5	5
<b>Características</b>				
<b>Sexo</b>				
Masculino	3 (60%)	5(100%)	2(40%)	2(40%)
Feminino	2 (40%)	0(0%)	3(60%)	3(60%)
<b>Idade (em anos)</b>				
Min – Max	1-6	7-22	6-17	10-17
Média (desvio)	3,20 (1,92)	14,0 (5,79)	12,4 (4,04)	13,6(2,88)
Mediana	3	15	13	13

Fonte: A autora, 2023.

A classificação de risco utilizado no protocolo do IMIP leva em consideração os dados clínicos e laboratoriais do paciente ao diagnóstico (Tabela 2). As alterações laboratoriais associadas a leucemia, incluem o aumento do número de leucócitos, diminuição da hemoglobina, hematócrito e plaquetas alteradas, geralmente associadas na clínica ao quadro de febre, aumento de frequência cardíaca, tonturas, dores ósseas e hemorragias. Além disso, o aumento do lactato desidrogenase (DHL) na injúria tecidual, está diretamente associado a lise tumoral e a doenças agudas.

Tabela 2– Variáveis clínico-laboratoriais (dados coletados dos prontuários clínicos).

<b>Características</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>
<b>LLA-B</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	9.000	47.100	21.520	15.459,85	18.400
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	8,00	10	8,82	0,57	9
<b>Hematocrito (%)</b>	25,70	29	27,34	1,11	28
<b>Plaqueta (uL)</b>	11.000	54.000	26.500	20.108,04	20.500
<b>DHL (U/L)</b>	340	2.457	982,6	854,84	767
<b>LLA-T</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	6.900	507.000	125.760	213.985,24	41.700
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	5,6	15	9,62	3,78	10
<b>Hematocrito (%)</b>	17,5	46	29,16	11,18	30
<b>Plaqueta (uL)</b>	13.000	266.000	143.000	103.109,17	174.000
<b>DHL (U/L)</b>	254	2.271	873,40	837,73	536
<b>LMA</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	3.600	36.200	14.420	12.369,3	9.800
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	6,8	10	8,62	1,47	9
<b>Hematocrito (%)</b>	21	31	25,88	4,17	26
<b>Plaqueta (uL)</b>	18.000	163.000	67.000	57.000	42.000
<b>DHL (U/L)</b>	160	2.460	794,8	944,42	473
<b>LMA-M3</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	2.100	14.100	5.880	4.999,20	3.600
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	5	11	8,4	2,21	9
<b>Hematocrito (%)</b>	15,5	32	25,34	6,16	28
<b>Plaqueta (uL)</b>	10.000	56.000	23.600	18.528,36	16.000
<b>DHL (U/L)</b>	170	584	316,8	136,66	268

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Variáveis utilizadas para a classificação de risco de pacientes pediátricos com diagnóstico leucêmico, atendidos no IMIP.

Considerando a classificação morfológica da FAB (Tabela 3) através do mielograma, observamos que a média de blastos é maior para os pacientes com LLA-B, (84,4%) e menor para os pacientes com LMA (49,4%), sendo semelhante entre os pacientes com LLA-T e LMA-M3. A média do percentual de granulócitos é menor para a linhagem LLA-B em comparação com as demais linhagens, sendo a média do percentual de eritroblastos semelhantes entre as linhagens LLA-B, LLA-T e LMA-M3 e maior para LMA.

Tabela 3– Perfil morfológico ao diagnóstico de pacientes pediátricos com leucemia atendidos no IMIP.

<b>Características</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>
<b>LLA-B</b>					
Eritroblastos%	0	13	3,4	5,41	1
Granulócitos%	0	6	1,6	2,51	1
Linfócitos%	4	22	10,6	7,67	6
Blastos%	75	93	84,4	8,76	85
Megacariócitos					
Ausente=	3 (60%)				
Presente-normal=	2 (40%)				
<b>LLA-T</b>					
Eritroblastos%	1	6	3,0	2,12	3
Granulócitos%	0	47	15,6	20,84	4
Linfócitos%	2	29	11,2	10,38	8
Blastos%	18	91	70,2	30,24	85
Megacariócitos					
Ausente=	3(60%)				
Presente-baixo=	2(40%)				
<b>LMA</b>					
Eritroblastos%	3	24	11,6	7,8	9
Granulócitos%	4	43	23,0	16,45	25
Linfócitos%	6	21	10,8	6,14	8
Blastos%	35	81	49,4	19,17	40
Plasmáticas%	1	2	1,33	0,58	1
Megacariócitos					
Ausente=	1(20%)				
Presente-baixo=	4(80%)				
<b>LMA-M3</b>					
Eritroblastos%	1	9	4,75	3,5	5
Granulócitos%	6	19	10,25	5,97	8
Linfócitos%	3	9	6,25	2,75	7
Blastos%	52	87	72,2	13,54	70
Megacariócitos					
Presente-alto=	2(40%)				
Presente-baixo=	3(60%)				

Fonte: A autora, 2023.

Definimos fatores de risco também a partir dos achados genéticos (tabela 4). Com isso, para os nossos pacientes com LLA-B, 40% dos pacientes apresentaram um prognóstico favorável, que se refere a principal translocação encontrada  $t(12;21)$  ( $p13;q22$ ), seguida de 40% dos pacientes que apresentaram prognóstico desfavorável, correspondente as translocações 1;19 (*Oncogene E2A-PBX*), e 9;22



(*gene BCR-ABL*), ademais, apenas 20% expressam um prognóstico intermediário, sem alterações gênicas. Para os pacientes com LLA-T, 80% dos pacientes não possuem alterações gênicas (considerando as alterações testadas) e 20% possuem a translocação 10;14 (*oncogene Hox11*), consideradas com prognósticos intermediários e favoráveis, respectivamente. Para os pacientes com LMA, 60% dos pacientes estudados não possuem alterações gênicas, condizentes ao prognóstico intermediário e 40% com prognóstico favorável (inv16 e t8;21). Para o subgrupo M3, os pacientes apresentaram translocação 15;17 (*gene PML*), característico da própria doença e equivalente ao prognóstico favorável.

Tabela 4– Alterações moleculares avaliadas nos pacientes pediátricos com leucemia no IMIP (Painel estabelecido pelo serviço).

<b>Leucemias=</b>	<b>LLA- B</b>	<b>LLA-T</b>	<b>LMA</b>	<b>LMA-M3</b>
N (%) =	5	5	5	5
<b>Características</b>				
<b>Alteração Gênica</b>				
Sem alterações	1(20%)	4(80%)	3(60%)	-
t(1;19)	1(20%)	-	-	-
t(8;21)	-	-	1(20%)	-
t(9;22)	1(20%)	-	-	-
t(12;21)	2(40%)	-	-	-
t(15;17)	-	-	-	5(100%)
Hox11	-	1(20%)	-	-
Inv16	-	-	1(20%)	-
<b>Fator de Risco</b>				
Favorável	2(40%)	1(20%)	2(40%)	5(100%)
Intermediário	1(20%)	4(80%)	3(60%)	-
Desfavorável	2(40%)	-	-	-

Fonte: A autora, 2023.

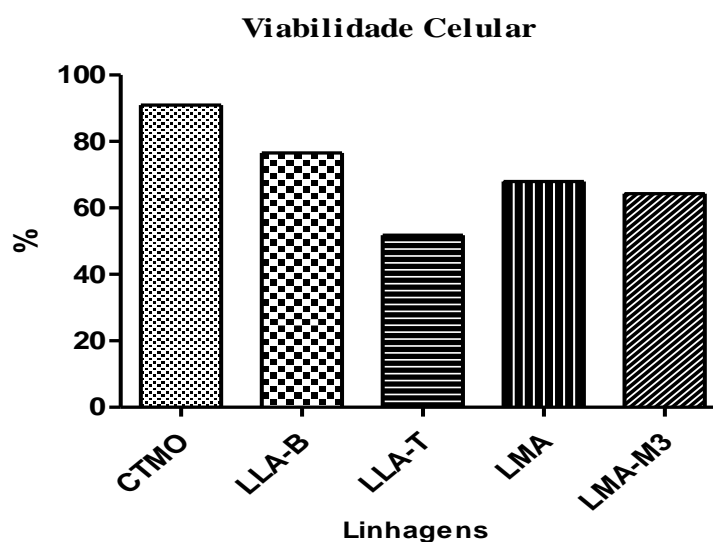
A respeito das recidivas, para os pacientes com LLA-B, apenas 1 paciente (20%) recaiu, o mesmo tinha prognóstico favorável. Para os 5 pacientes com LLA-T, 3 recaíram (60%), destes, 2 (40%) possuem prognóstico intermediário e 1 (20%) favorável. Para a linhagem mieloide, apenas 1 paciente (20%) do subtipo M3 recaiu. No decorrer e até o término deste trabalho, nenhum paciente veio a óbito.

## 5.2 Isolamento e inspeção da viabilidade celular

Após descongeladas e submetidas a marcação com o 7AAD (7-Aminoactinomicina D), identificamos que todos os grupos apresentaram viabilidade acima de 50% das células adquiridas (figura 12), sendo a melhor viabilidade apresentada pelo grupo controle com média de 90,96%, seguidos da LLA-B com 76,53%, LMA com 67,92%, LMA-M3 com 64,32% e por último pela LLA-T com 51,82%.

Figura 12: Viabilidade celular dos grupos analisados.

	CTMO	LLA-B	LLA-T	LMA	LMA-M3
Min-Max	82,93 - 95	43,93 - 88	15,77 - 93	17,71 - 92	18,3 - 93
Média	90,96	76,53	51,82	67,92	64,32
Desvio	4,61	18,73	33,99	30,13	28,43
Mediana	92	85	49	81	69



Fonte: A autora, 2023.

## 5.3 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia Linfoide

Para o CD45 negativo no tubo de identificação celular (tabela 5), é possível constatar que não temos diferença percentual para as células mesenquimais, endoteliais e H Stem Cell. Contudo, para outros tipos celulares é possível observar que existe um aumento na expressão da molécula de adesão CD44, não associado a células mesenquimais, estatisticamente significativo (figura 13).

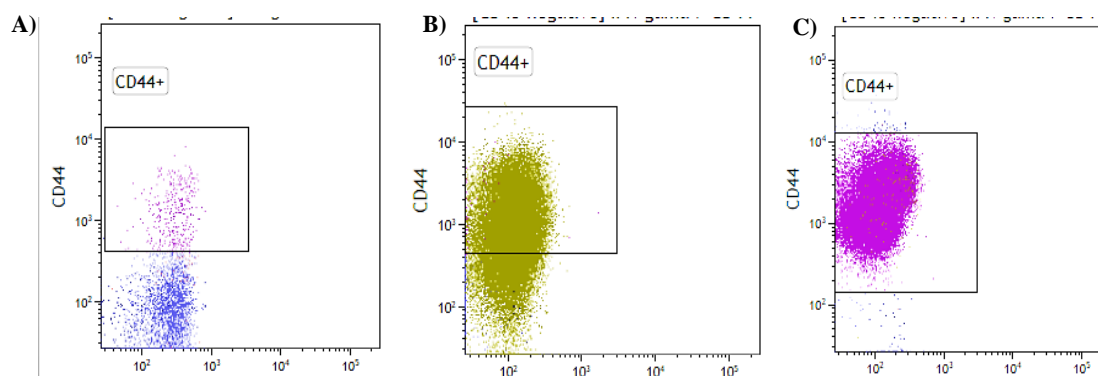
Tabela 5 - LLA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45<sup>-</sup>.

Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 1</b>						
<b>Mesenquimal% (CD44<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>)</b>						0,9704
CTMO	0,16	1	0,50	0,29	0,42	
LLA-B	0,08	1	0,50	0,29	1	
LLA-T	0,06	2	0,68	0,73	0	
<b>Endotelial% (CD31<sup>+</sup>)</b>						0,4019
CTMO	0,06	13	3,67	5,32	1	
LLA-B	0,07	2	0,64	0,87	0,11	
LLA-T	0,22	3	1,03	0,98	1	
<b>H Stem Cell% (CD34<sup>+</sup>)</b>						0,1309
CTMO	0,02	0,47	0,14	0,19	0,04	
LLA-B	0,01	14,77	2,96	6,60	0	
LLA-T	0	0,06	0,02	0,02	0	
<b>Células CD44<sup>+</sup>% (CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup>, CD90<sup>-</sup>)</b>						0,0122
CTMO	0,08	15	3,79	6,45	1	
LLA-B	0,32	63	28,67	29,08	22	
LLA-T	31,38	90	62,05	24,32	68	
<b>Outras Células% (precursor leucêmico, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>)</b>						0,0305
CTMO	2,12	14	5,60	4,66	4	
LLA-B	0	92	31,37	35,04	23	
LLA-T	13,76	67	46,42	23,43	61	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: identificação na MO saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

Figura 13- Ilustração de células medulares CD45<sup>-</sup>, positivas para a molécula de adesão CD44.

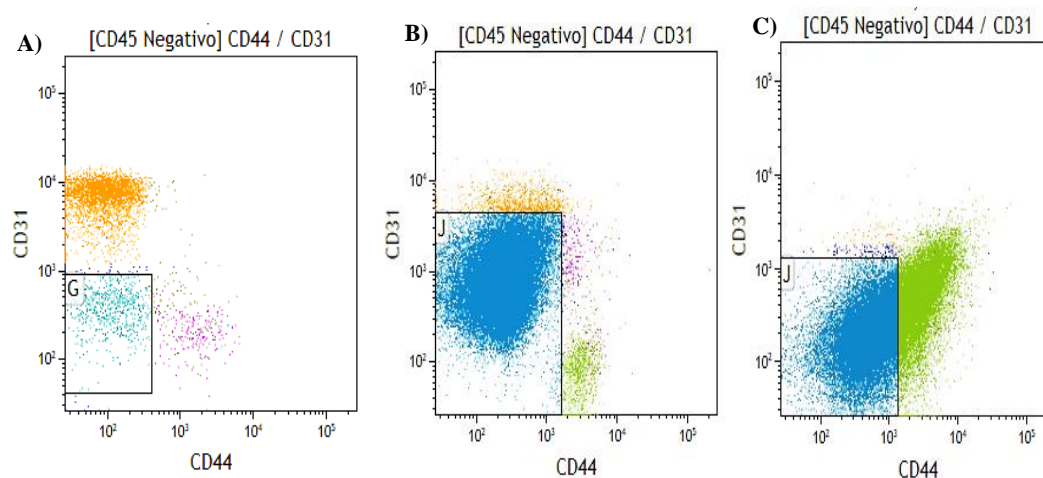


Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LLA-B e no gráfico C, pacientes com LLA-T.

Ademais, observamos um aumento estatisticamente significativo de outras células que não apresentam positividade para nenhum dos marcadores presentes nesse tubo, tendo potencial para possíveis blastos (figura 14).

Figura 14- Ilustração de células medulares  $CD45^-$ , negativas para marcadores hematológicos (CD34), mesenquimais (CD44, CD90 e CD105) e endotelial (CD133 e CD31). Células em destaques pelo gate na cor azul em ambos os gráficos.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos células residentes da medula normal de crianças saudáveis; no gráfico B são possíveis blastos de leucemia de células B e no gráfico C de leucemia de células T.

No tubo 2 (tabela 6), observamos que as células dos pacientes com LLA-B expressam 10x mais a proteína CD9 do que as células dos pacientes controle e de LLA-T (figura 14). Os pacientes avaliados não apresentaram positividade para a proteína CD90. Para os marcadores de linhagens leucêmicas (CD13 e CD19), o marcador mieloide (CD13) não apresentou diferença entre os indivíduos avaliados, porém, para o marcador da linhagem linfóide (CD19), tivemos resultados estatisticamente significativos para os pacientes com LLA-B, como prenunciado, considerando que esse marcador é expresso nos blastos característicos da patologia.

Tabela 6 - LLA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45.

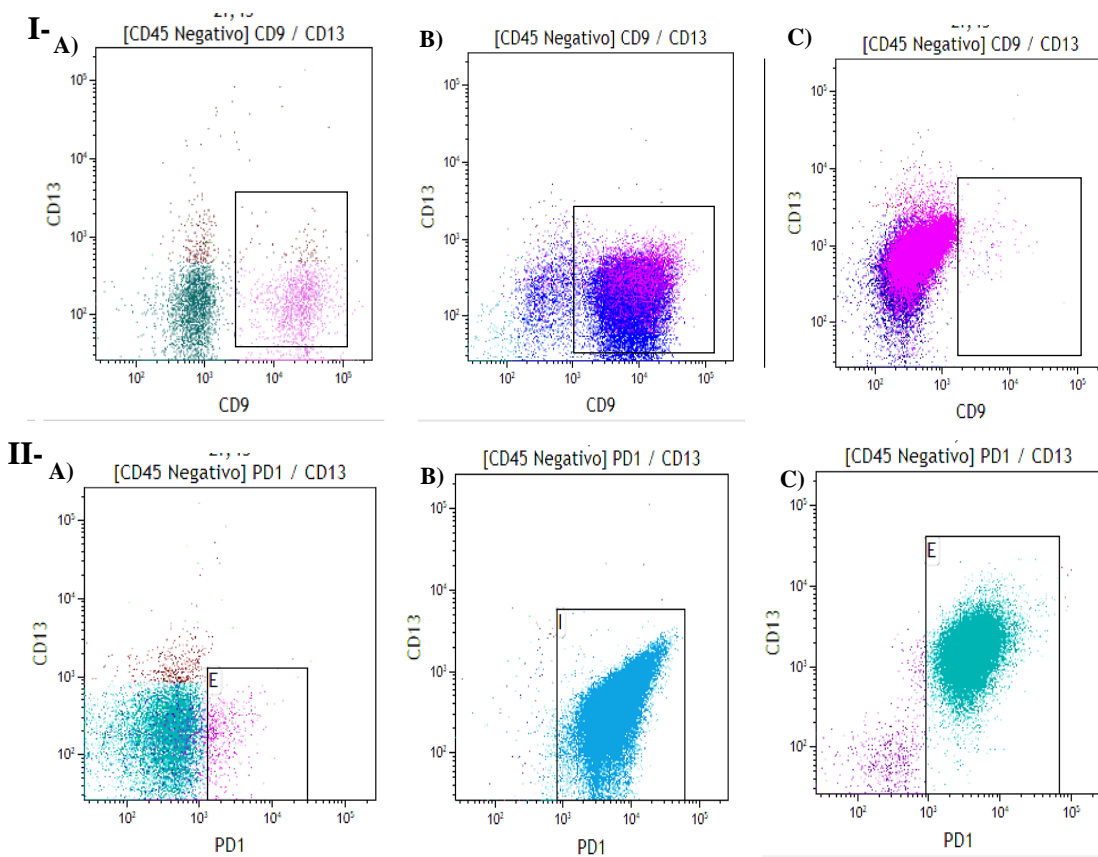
<b>Característica</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>	<b>P&lt;0,05</b>
<b>Tubo 2</b>						
<b>CD9%</b>						<b>0,0155</b>
CTMO	0,38	14	4,4	5,74	2	
LLA-B	21,5	60	48,43	15,54	55	
LLA-T	0,07	54	11,28	24,16	0	
<b>CD90%</b>						0,1429
CTMO	0	2,53	0,51	1,13	0	
LLA-B	0,02	2	0,37	0,70	0,07	
LLA-T	0	0,11	0,03	0,05	0	
<b>CD13%</b>						0,6355
CTMO	0,09	2	0,81	0,89	1	
LLA-B	0,07	2	0,49	0,65	0	
LLA-T	0,0	2	0,76	0,85	1	
<b>CD19%</b>						<b>0,0066</b>
CTMO	0,01	0,1	0,04	0,04	0,01	
LLA-B	57,94	89	77,17	11,94	79	
LLA-T	0,01	0,16	0,07	0,06	0,03	
<b>HLA-G</b>						0,3679
CTMO	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
LLA-B	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
LLA-T	0	24,37	4,87	10,90	0,5	
<b>PD1</b>						<b>0,0089</b>
CTMO	0,01	1	0,28	0,58	0,2	
LLA-B	21,92	91	58,71	29,75	60	
LLA-T	33,93	79	52,2	18,01	49	
<b>PD-L1</b>						0,6140
CTMO	0,01	2	0,35	0,73	0	
LLA-B	0	1	0,18	0,27	0	
LLA-T	0,01	0	0,04	0,05	0	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Expressão mensurada na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

Para além, das três moléculas moduladoras avaliadas (HLA-G, PD1 e PD-L1), apenas o marcador de morte programada, PD1, apresentou resultados estatisticamente promissores para ambas as leucemias linfóides (figura 15).

Figura 15- Ilustração de células medulares CD45<sup>-</sup>, positivas para a proteína CD9, demonstradas nos gráficos da seção I, e para a molécula moduladora PD1, demonstrada nos gráficos do bloco II.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos A verificamos células residentes da medula normal de crianças saudáveis; nos gráficos B são da leucemia de células B e nos gráficos C de leucemia de células T.

Para o CD45<sup>low</sup> (tabela 7), encontramos uma diminuição na expressão da molécula de adesão CD44, sendo a média percentual semelhante entre os pacientes com LLA-T e controle e 4x menor nos pacientes com LLA-B. Para o CD105 (sem correlação com precursor hematopoiético) não encontramos diferenças percentuais ou estatísticas entre os grupos analisados, porém, alguns pacientes possuem coexpressão com a molécula CD44. Para os precursores hematopoiéticos, apenas o precursor II (CD34<sup>+</sup> e CD105<sup>-</sup>) apresentou resultados significativos, devido a uma diminuição considerável na média percentual entre os grupos. Para o CD31 não obtivemos relevância estatística. Por fim, assim como no CD45<sup>-</sup> observamos a população negativa para os marcadores presentes neste tubo, e nesse caso obtivemos uma diminuição estatisticamente significativa (figura 16).

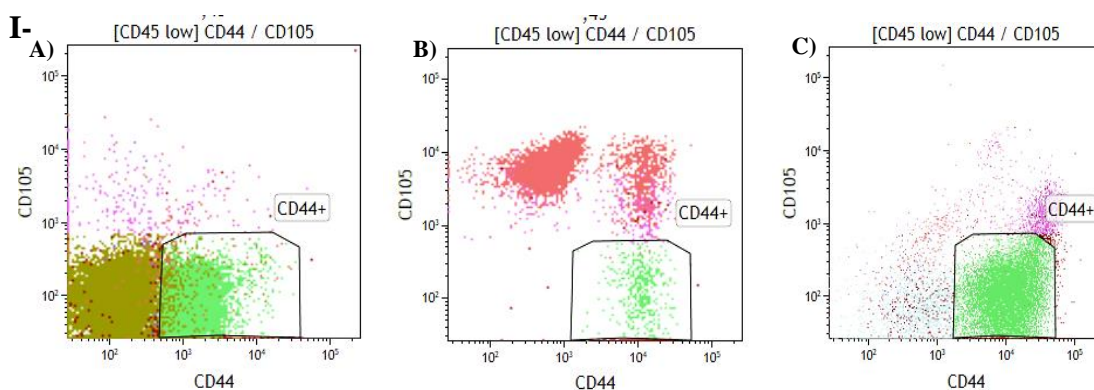
Tabela 7– LLA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45<sup>-/+</sup>.

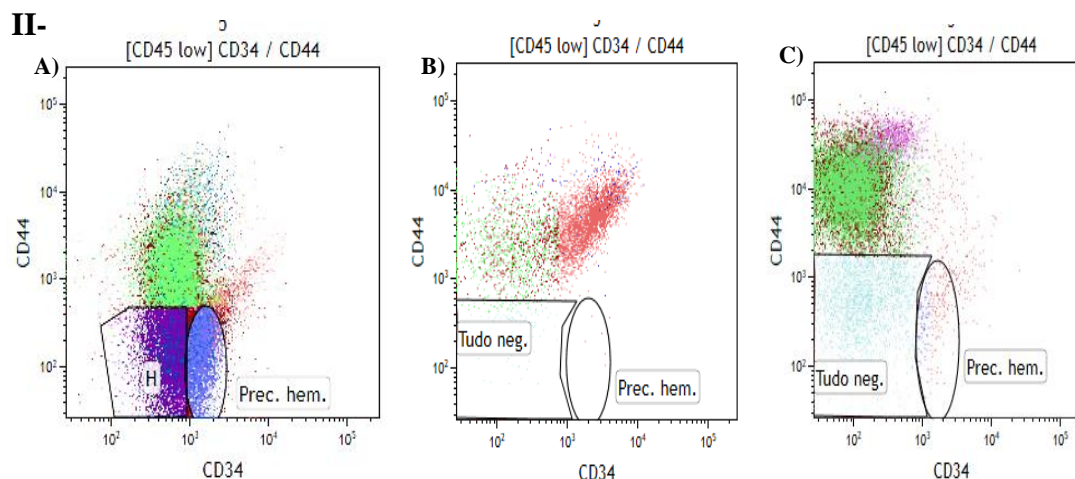
Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 1</b>						
<b>CD44%</b>						<b>0,0305</b>
CTMO	14,09	18	15,9	1,39	16	
LLA-B	0,82	14	3,95	5,41	2	
LLA-T	0,74	25	9,16	9,44	7	
<b>CD105%</b>						<b>0,8845</b>
CTMO	0,25	3	0,81	1,03	0,38	
LLA-B	0,05	8	1,97	3,31	0,43	
LLA-T	0,28	2	0,78	0,67	1	
<b>Precursor Hematopoiético I% (CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>)</b>						<b>0,8670</b>
CTMO	0,31	2	0,86	0,48	1	
LLA-B	0,26	9	4,53	3,96	7	
LLA-T	0,08	10	3,16	4,13	1	
<b>Precursor Hematopoiético II% (CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>)</b>						<b>0,0379</b>
CTMO	0,55	17	8,62	6,77	8	
LLA-B	0	0,23	0,09	0,10	0,11	
LLA-T	0	19	4,0	8,65	0	
<b>CD31%</b>						<b>0,0673</b>
CTMO	1,78	26	7,26	10,77	3	
LLA-B	0,2	9	2,17	3,8	1	
LLA-T	0	2,77	0,73	1,2	0	
<b>Outras células% (CD45<sup>-/+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>)</b>						<b>0,0107</b>
CTMO	2,76	49	25,88	20,58	24	
LLA-B	0,01	0,44	0,20	0,18	0,18	
LLA-T	0,01	19	5,19	7,75	1	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Identificação realizada na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

Figura 16: Ilustração de células medulares CD45<sup>-/+</sup> positivas para a molécula CD44, demonstradas nos gráficos da seção I, e para o precursor hematopoiético II, demonstrado com a população negativa, no bloco II.





Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos A verificamos células residentes da medula normal de crianças saudáveis; nos gráficos B são da leucemia de células B e nos gráficos C de leucemia de células T

No tubo 2 (tabela 8), dentre as proteínas de superfície analisadas (CD9, CD13, CD19, CD90), apenas a proteína CD90 apresentou resultados estatisticamente significativos, expondo que entre o grupo controle e as leucemias, pode ocorrer uma diminuição na expressão dessa proteína (figura 17). Para as moléculas moduladoras (HLA-G, PD1 e PD-L1), identificamos um aumento na média percentual para as moléculas HLA-G e PD1 nos pacientes com a leucemia de células T, e uma diminuição na média percentual para os pacientes com leucemia de células B, com enfoque no ligante PD-L1. Contudo, para ambos os casos, não obtivemos resultados estatisticamente relevantes.

Tabela 8 – LLA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45<sup>-/+</sup>.

Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 2</b>						
<b>CD9%</b>						0,6977
CTMO	0,94	20	7,08	8,01	2	
LLA-B	0,8	13	8,67	5,14	11	
LLA-T	0	13	5,48	6,42	2	
<b>CD90%</b>						<b>0,0131</b>
CTMO	3,9	13	6,57	3,47	6	
LLA-B	0,05	3	0,97	1,24	1	
LLA-T	0	4	1,58	1,71	2	
<b>CD13%</b>						0,1809
CTMO	3,01	28	10,22	10,26	7	
LLA-B	0,33	12	3,18	4,79	1	

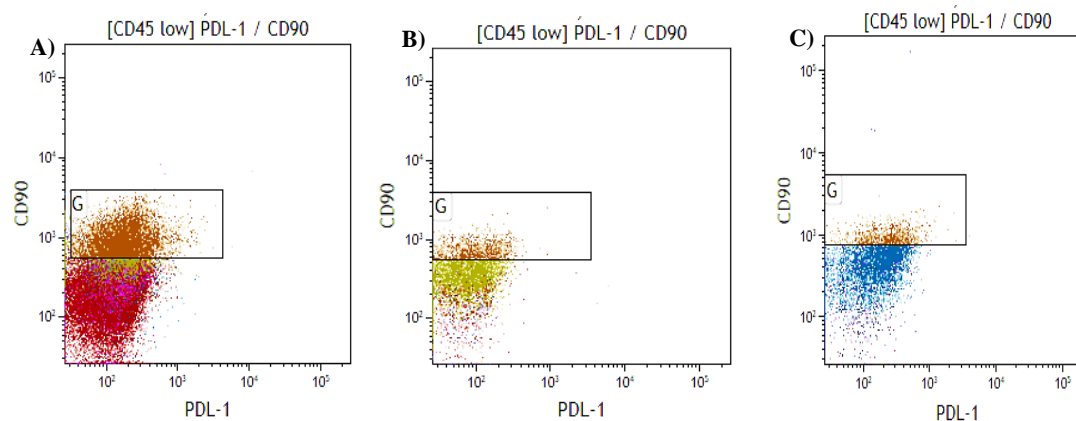


LLA-T	0,04	20	5,79	8,41	2	
<b>CD19%</b>						0,4449
CTMO	0,67	8	3,02	2,98	2	
LLA-B	1,14	17	10,25	6,43	12	
LLA-T	0,23	21	9,21	9,86	6	
<b>HLA-G%</b>						0,1010
CTMO	0,1	1	0,22	0,16	0,2	
LLA-B	0,1	0	0,18	0,08	0	
LLA-T	0,1	6	3,21	1,98	4	
<b>PD1%</b>						0,1367
CTMO	1,76	8	4,54	2,57	4	
LLA-B	2,85	14	9,48	4,61	11	
LLA-T	0,3	56	26,35	22,32	22	
<b>PD-L1</b>						0,0506
CTMO	0,2	2	1,27	0,82	1	
LLA-B	0,01	1	0,15	0,26	0,05	
LLA-T	0	4	1,01	1,67	0	

Fonte: A autora,2023.

Nota: Moléculas mensuradas na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

Figura 17: Ilustração de células medulares CD45<sup>+/+</sup> positivas para a proteína CD90.



Fonte: A autora,2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LLA-B e no gráfico C, pacientes com LLA-T.

#### 5.4 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia Mieloide

Para o CD45 negativo no tubo de identificação celular (tabela 9), assim como no grupo dos pacientes com leucemia linfóide, é possível constatar que não temos diferença percentual para as células mesenquimais e H Stem Cell. Contudo, para as células endoteliais, identificamos um aumento na média percentual da expressão da

proteína CD31 nos pacientes com LMA e uma diminuição nos pacientes com o subtipo M3. Ademais, assim no grupo para pacientes com leucemia linfóide, para outros tipos celulares é possível observar que existe um aumento na expressão da molécula de adesão CD44, não associado a células mesenquimais, em 8x para os pacientes com o subtipo M3 e em 5x para os demais pacientes com LMA, sendo esse resultado estatisticamente significativo (figura 18).

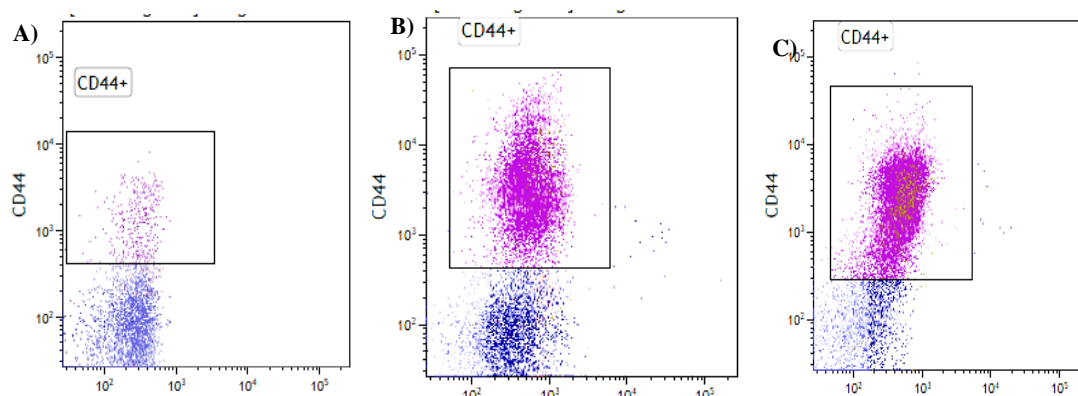
Tabela 9– LMA: Identificação de tipos celulares residentes na medula, a partir do CD45<sup>-</sup>.

Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 1</b>						
<b>Mesenquimal% (CD44<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>)</b>						0,6126
CTMO	0,16	1	0,50	0,29	0,42	
LMA	0,05	2	0,62	0,64	0,39	
LMA-M3	0,37	1	0,68	0,30	1	
<b>Endotelial% (CD31<sup>+</sup>)</b>						0,7558
CTMO	0,06	13	3,67	5,32	1	
LMA	0,09	34	7,37	14,98	0,33	
LMA-M3	0,58	1	0,69	0,11	1	
<b>H Stem Cell% (CD34<sup>+</sup>)</b>						0,2460
CTMO	0,02	0,47	0,14	0,19	0,04	
LMA	0,0	2	0,63	0,70	0,22	
LMA-M3	0,15	1	0,44	0,34	0	
<b>Células CD44+% (CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup>, CD90<sup>-</sup>)</b>						0,0207
CTMO	0,25	16	3,8	6,85	1	
LMA	1,36	43	21,13	16,53	23	
LMA-M3	5,57	52	30,80	18,69	31	
<b>Outras Células% (precursor do clone leucêmico, CD45<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>)</b>						0,4538
CTMO	2,12	14	5,60	4,66	4	
LMA	0,03	27	11,28	11,32	7	
LMA-M3	3,61	14	9,25	4,31	9	

Fonte: A autora, 2023.

Notas: Identificação realizada na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia mieloide aguda ao diagnóstico.

Figura 18- Ilustração de células medulares CD45<sup>-</sup>, positivas para a molécula de adesão CD44 em pacientes com leucemia mieloide aguda.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

No tubo 2 (tabela 10), observamos que a média percentual da expressão da proteína CD9 é semelhante entre o grupo controle e os pacientes com LMA, e reduzida para o subgrupo M3. Para a proteína CD90 identificamos um aumento percentual nos pacientes com LMA, contudo, os achados não demonstraram significância estatística. Para os marcadores de linhagens leucêmicas, com o marcador mieloide (CD13) obtivemos resultados estatisticamente significativos, como previsto, considerando que o mesmo é utilizado para caracterizar os blastos presentes na patologia

Tabela 10- LMA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45<sup>-</sup>.

Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 2</b>						
<b>CD9%</b>						0,3362
CTMO	0,38	14	4,4	5,74	2	
LMA	0,2	23	4,98	10,10	1	
LMA-M3	0,23	2	0,96	0,72	1	
<b>CD90%</b>						0,1084
CTMO	0	2,53	0,51	1,13	0	
LMA	0,01	9	2,25	3,79	1	
LMA-M3	0,01	0,04	0,03	0,01	0,03	
<b>CD13%</b>						<b>0,0358</b>
CTMO	0,09	2	0,81	0,89	1	
LMA	0,39	53	29,95	26,33	45	
LMA-M3	15,44	49	30,95	12,60	30	

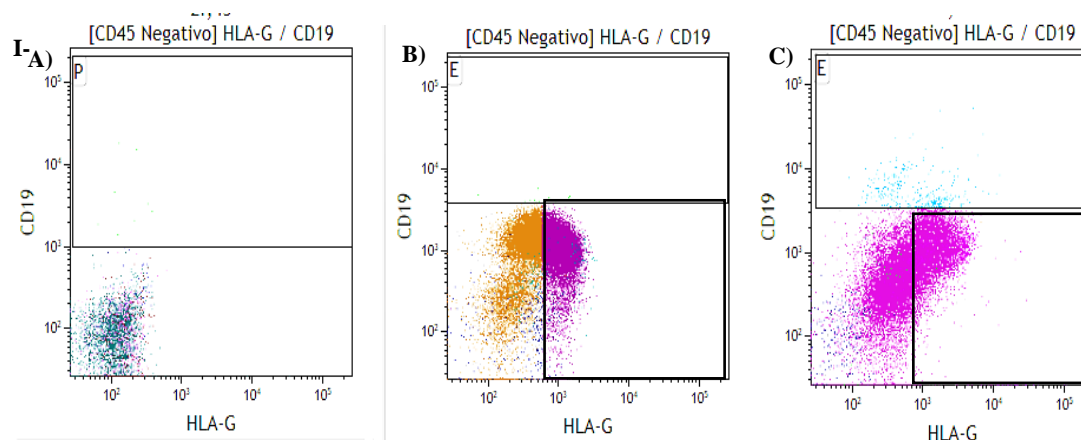
<b>CD19%</b>						<b>0,0155</b>
CTMO	0,01	0	0,04	0,04	0,02	
LMA	0,03	0	0,25	0,14	0,26	
LMA-M3	0,03	1	0,45	0,30	0,6	
<b>HLA-G</b>						<b>0,0073</b>
CTMO	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	
LMA	0,03	32	9,47	14,18	0,3	
LMA-M3	0,11	18	5,0	7,36	3	
<b>PD1</b>						<b>0,0131</b>
CTMO	0,01	2	0,28	0,58	0,02	
LMA	0,4	50	29,37	25,51	45	
LMA-M3	14,9	48	29,94	12,37	28	
<b>PD-L1</b>						0,1823
CTMO	0,01	2	0,35	0,73	0,02	
LMA	0,08	15	3,47	6,37	0,43	
LMA-M3	0,01	25	5,51	10,91	1	

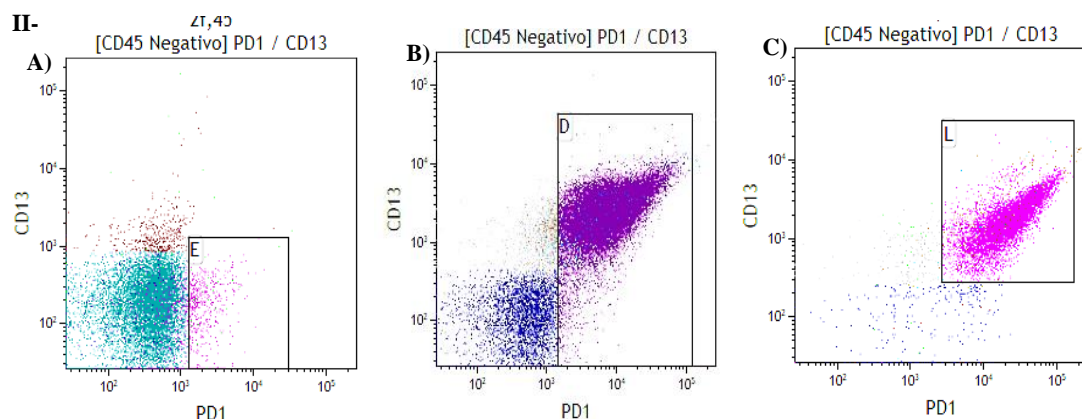
Fonte: A autora, 2023.

Nota: Expressão de moléculas na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia mieloide aguda ao diagnóstico.

Ademais, das três moléculas moduladoras avaliadas (HLA-G, PD1 e PD-L1), obtivemos resultados promissores com o HLA-G e com o PD1, exibindo um aumento percentual significativo para ambas as leucemias em comparação com o grupo controle (figura 19). Para o PD-L1, identificamos um aumento na média percentual, mas esse achado não demonstrou resultados estatísticos.

Figura 19- Ilustração de células medulares CD45<sup>-</sup>, positivas para a molécula moduladora HLAG, demonstrada nos gráficos da seção I, e para a molécula moduladora PD1, demonstrada nos gráficos do bloco II.





Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

Para o CD45<sup>low</sup> nos pacientes com LMA aguda (tabela 11), não encontramos diferenças percentuais ou estatísticas, entre os grupos analisados, para as proteínas de superfície CD105 e CD44, entretanto, para a molécula de adesão CD44, encontramos um aumento na média percentual de sua expressão. Dentre os precursores hematopoiéticos, apenas o precursor I (CD34<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>) apresentou resultados significativos, devido a um aumento na média percentual entre os grupos, com foco no subgrupo da LMA, resultado semelhante ao apresentado pela proteína CD31. Por fim, assim como no CD45<sup>-</sup> observamos a população negativa para os marcadores presentes neste tubo, e nesse caso obtivemos uma diminuição percentual, mas não significativa (figura 20).

Tabela 11– LMA: Identificação de tipos celulares residentes na medula a partir da análise do CD45<sup>-/+</sup>.

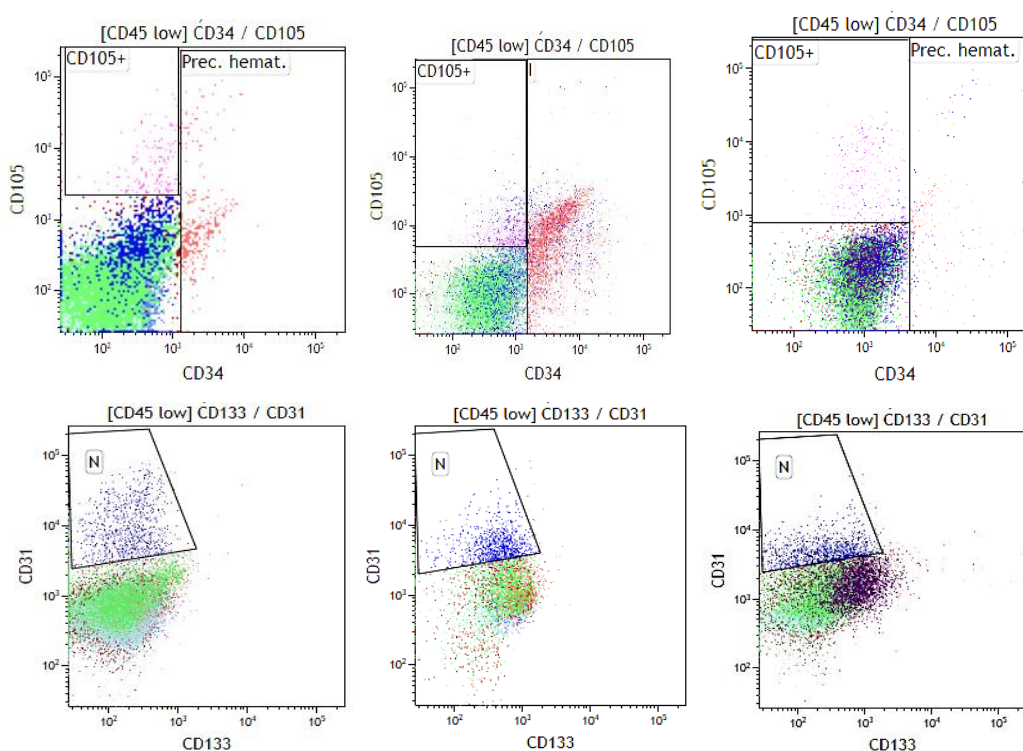
Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>Tubo 1</b>						
<b>CD44%</b>						0,5117
CTMO	14,09	18	15,9	1,39	16	
LMA	6,29	90	32,79	33,36	19	
LMA-M3	7,52	36	20,80	12,25	20	
<b>CD105%</b>						0,3184
CTMO	0,25	3	0,81	1,03	0,38	
LMA	0,01	1	0,45	0,56	0	
LMA-M3	0,12	1	0,33	0,33	0	
<b>Precursor Hematopoiético I% (CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>)</b>						<b>0,0209</b>
CTMO	0,31	2	0,86	0,48	1	

LMA	1,17	77	18,63	32,87	3	
LMA-M3	0,91	4	2,04	1,10	2	
<b>Precursor Hematopoiético II% (CD34<sup>+</sup>, CD105<sup>-</sup>)</b>						0,0764
CTMO	0,55	17	8,62	6,77	8	
LMA	0,19	10	2,97	4,10	1	
LMA-M3	0,13	5	1,30	2,08	0	
<b>CD31%</b>						<b>0,0185</b>
CTMO	1,78	26	7,26	10,77	3	
LMA	1,95	90	20,89	38,85	4	
LMA-M3	0,57	2	1,10	0,71	1	
<b>Outras células% (CD45<sup>-/+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD105<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>)</b>						0,0846
CTMO	2,76	49	25,88	20,58	24	
LMA	0,3	14	4,45	5,45	3	
LMA-M3	0,53	24	6,72	9,71	3	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Identificação realizada na medula óssea saudável e patológica de pacientes com leucemia aguda ao diagnóstico.

Figura 20: Ilustração de células medulares CD45<sup>-/+</sup> positivas para o precursor hematopoiético I, demonstradas nos gráficos da seção I, e para a proteína de superfície CD31, demonstrado nos gráficos do bloco II.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

No tubo 2 (tabela 12), dentre as proteínas de superfície analisadas (CD9, CD13, CD19, CD90), apenas as proteínas CD9 e CD13 apresentaram resultados estatisticamente significativos. Para o CD9 identificamos uma diminuição na média percentual entre o grupo controle e o grupo de pacientes com LMA e um aumento de percentual no grupo de pacientes com LMA-M3 (figura 21). Para as moléculas moduladoras (HLA-G, PD1 e PD-L1), identificamos um aumento na média percentual da expressão desses marcadores nos grupos leucêmicos, em comparação com o grupo controle, sendo para ambos os casos o enfoque na LMA-M3. Destes marcadores, apenas para a molécula PD-L1 não obtivemos resultados significativos.

Tabela 12- LMA: Identificação de proteínas de superfície e moléculas moduladoras a partir da análise do CD45<sup>+/+</sup>.

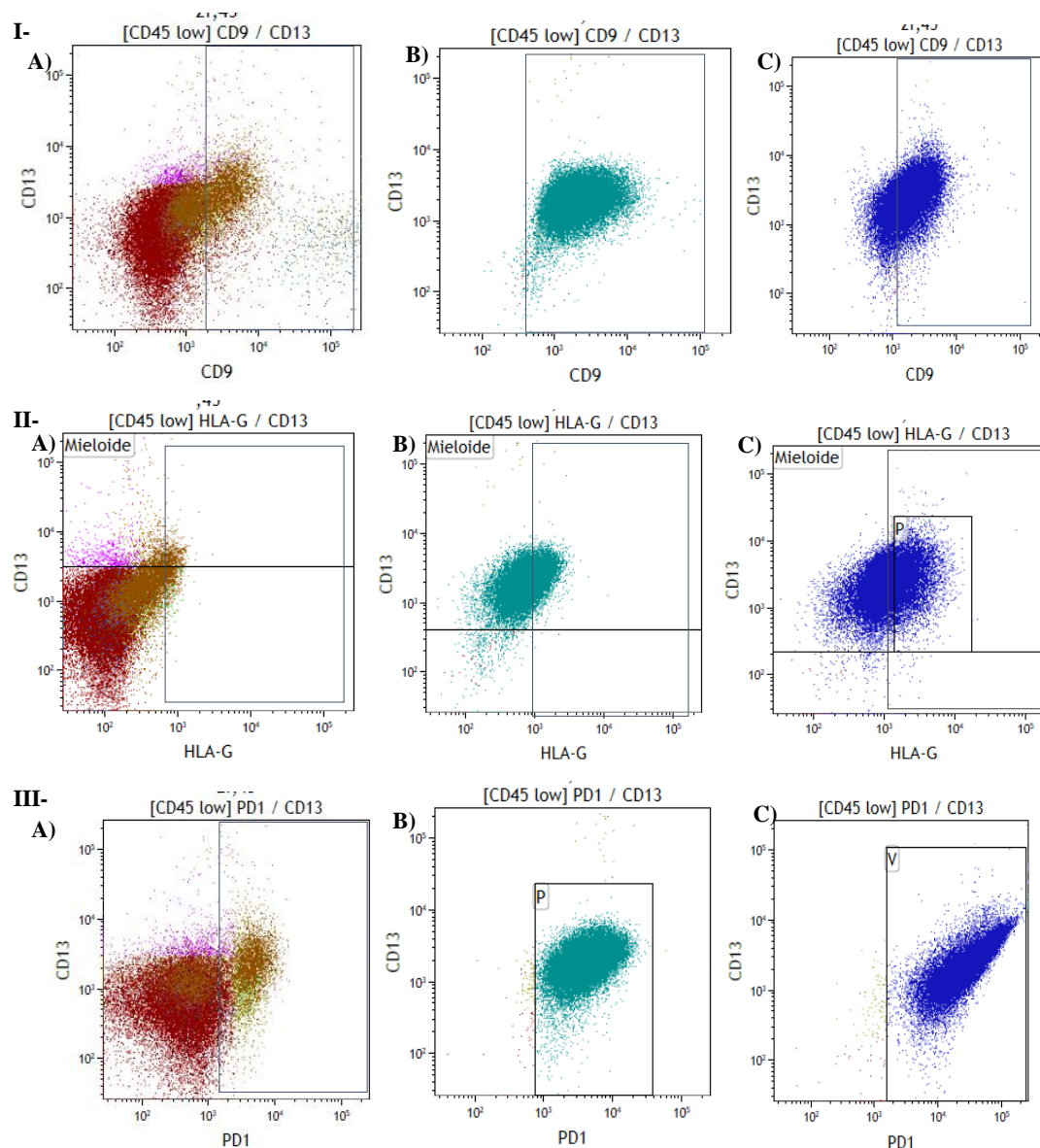
<b>Característica</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>	<b>P&lt;0,05</b>
<b>Tubo 2</b>						
<b>CD9%</b>						<b>0,0365</b>
CTMO	0,94	20	7,08	8,01	2	
LMA	0,21	17	5,93	6,82	3	
LMA-M3	12,57	29	19,88	6,07	18	
<b>CD90%</b>						0,1212
CTMO	3,9	13	6,57	3,47	6	
LMA	7,8	36	15,35	11,69	9	
LMA-M3	5	19	10,45	6,70	7	
<b>CD13%</b>						<b>0,0148</b>
CTMO	3,01	28	10,22	10,26	7	
LMA	15,66	90	33,24	31,79	20	
LMA-M3	32,53	66	44,7	15,07	35	
<b>CD19%</b>						0,0614
CTMO	0,67	8	3,02	2,98	2	
LMA	0,02	3	0,65	1,13	0	
LMA-M3	0,28	2	0,76	0,49	1	
<b>HLA-G</b>						<b>0,0343</b>
CTMO	0,1	1	0,22	0,16	0,2	
LMA	0	24	11,60	10,37	7	
LMA-M3	9,08	22	12,42	5,31	10	
<b>PD1%</b>						<b>0,0052</b>
CTMO	1,76	8	4,54	2,57	4	
LMA	12,17	68	27,93	23,00	21	
LMA-M3	33,24	66	44,94	14,82	35	
<b>PD-L1</b>						0,1791
CTMO	0,2	2	1,27	0,82	1	

LMA	0,1	5	2,6	2,24	3
LMA-M3	0,28	11	6,27	4,58	8

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Verificação realizada com pacientes saudáveis e pacientes com leucemia mieloide aguda ao diagnóstico.

Figura 21- Ilustração de células medulares CD45<sup>+/+</sup>, positivas para a proteína CD9 demonstrada nos gráficos da seção I, e para as moléculas moduladoras HLA-G e PD1, demonstradas nos gráficos do bloco II e III, respectivamente.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

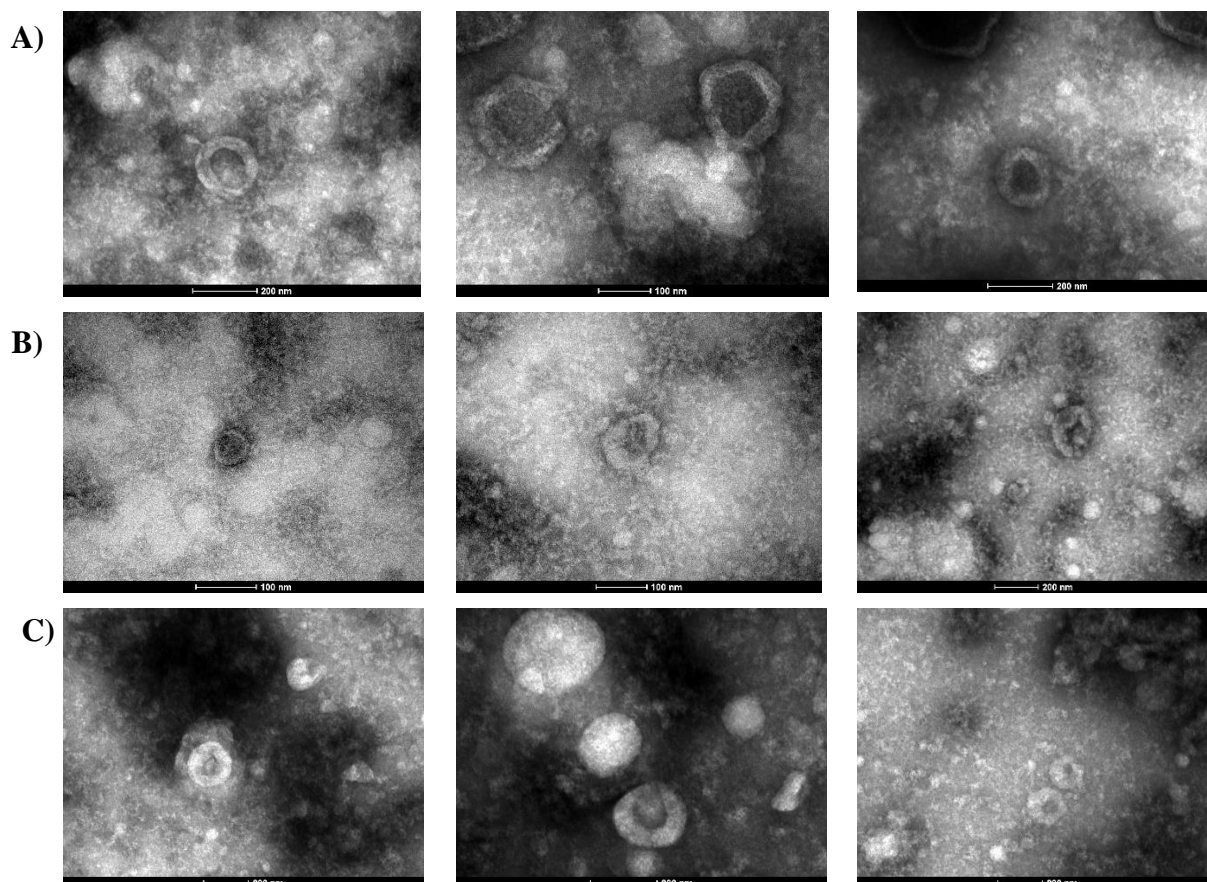


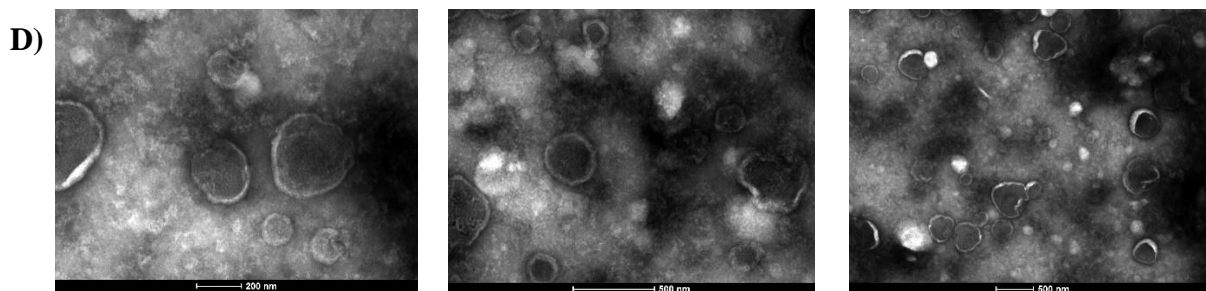
## 5.5 Validação da metodologia de isolamento e caracterização das Vesículas Extracelulares

### A- Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

A MET revelou a presença de um concentrado heterogêneo, com pequenas VEs (<100nm - <200nm) e VEs médios/grandes (>200nm), e aglomerados de lipoproteínas (figura 22). A morfologia apresentada pelas pequenas VEs possui semelhança com bolhas esféricas, sugestivo de origem exossomal/endocítica. Para as vesículas médias/grandes foi possível identificar uma heterogeneidade quanto ao seu tamanho e uma similaridade morfológica, apresentando compatibilidade com VEs derivadas de brotamento da membrana plasmática.

Figura 22- Visualização de vesículas extracelulares através da MET. A partir de um ultracentrifugado derivado do estroma de medula óssea fisiológica, com identificação positiva para pequenas VEs e VEs médio /grandes.





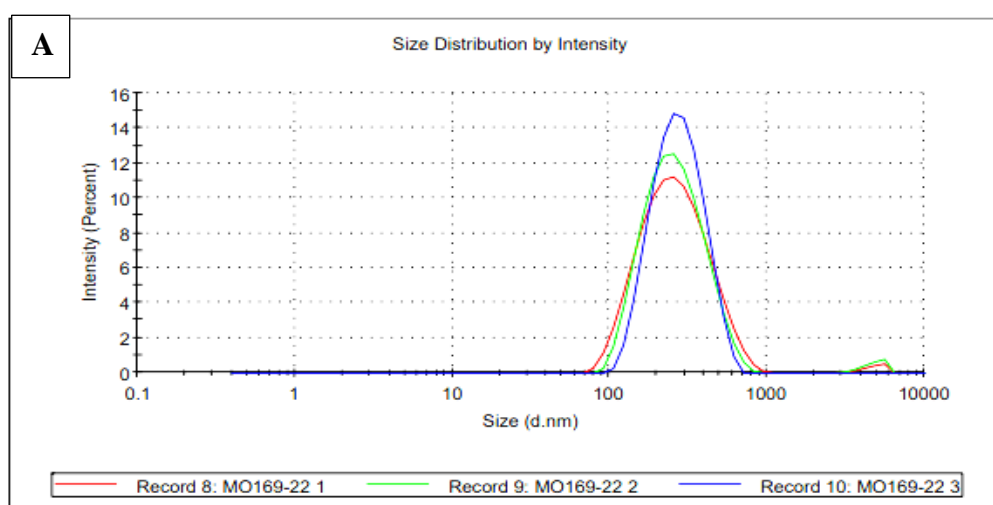
Fonte: A autora, 2023.

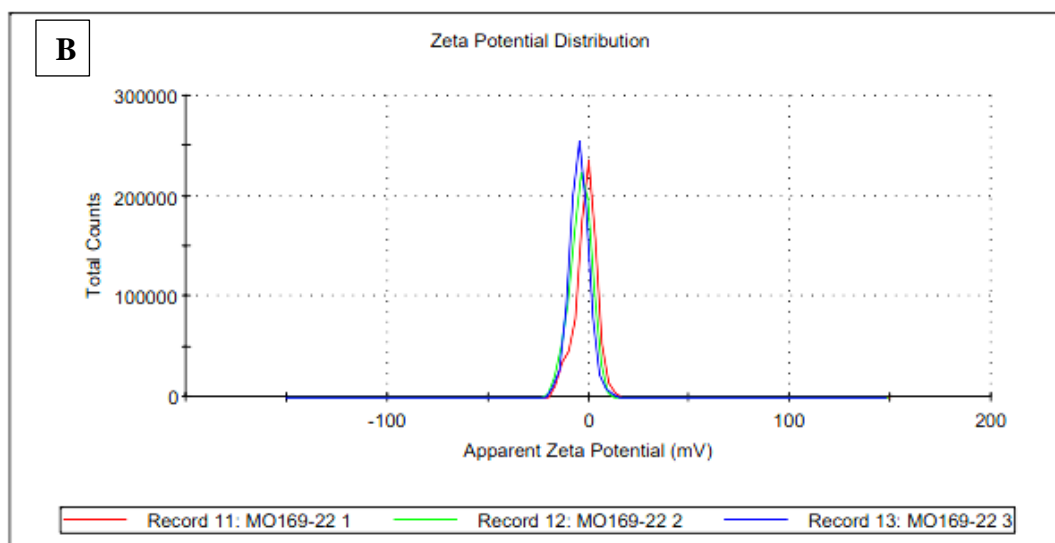
Nota: Nas figuras dos blocos A, B e C é possível identificar as VEs pequenas (<100nm-200nm) com morfologia de “balas soft”. Nas figuras do bloco D visualizamos VEs maiores, com morfologia regular, compatível ao brotamento celular.

## B- Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para confirmar os achados obtidos na MET, utilizamos a DLS para dimensionar o tamanho das nanopartículas do nosso concentrado a partir da nossa metodologia de isolamento e verificar a magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre partículas encontradas. Para os nossos resultados foi possível obter um índice de poli dispersão (PDI) de 0,212 (ref <0,2), que reflete na homogeneidade da amostra analisada e um potencial zeta (PZ) de -4,00, demonstrando que existe uma forte interação eletrostática entre as partículas, o que impede que elas se aproximem e formem aglomerados e assegura a estabilidade do nosso precipitado (figura 23).

Figura 23- Dimensionamento das vesículas extracelulares provenientes de ultracentrifugado do estroma de medula óssea patológica, mensurada em triplicata.



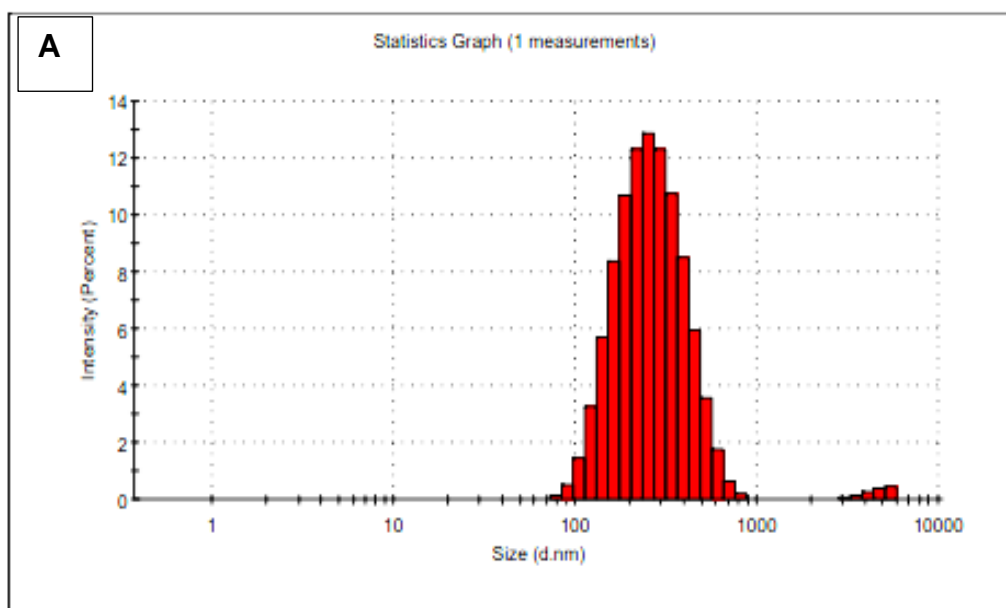


Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A visualizamos o Índice de Polidispersão do nosso concentrado e no gráfico B o Potencial Zeta.

Ao realizar a dissociação no nosso concentrado heterogêneo, encontramos partículas com diâmetros correspondentes aos resultados obtidos pela MET, com um intervalo entre 78nm e 800nm (figura 24). Destes, 30,5% correspondem a pequenas VEs (>200nm), 63% equivalem a vesículas maiores que 200nm e 6,5% retratam partículas maiores que 500nm.

Figura 24- Distribuição relativa do tamanho de vesículas extracelulares (nanopartículas), derivadas do ultracentrifugado do estroma de medula óssea patológica.



B

Tamanho (d.nm)	Intensidade Média (%)	Desvio Padrão (%)	Tamanho (d.nm)	Intensidade Média (%)	Desvio Padrão (%)
78,82	0,1	0,2	295,3	12,3	2,0
91,28	0,5	0,6	342,0	10,7	1,8
105,7	1,5	1,2	396,1	8,5	1,1
122,4	3,3	1,5	458,7	6,0	0,4
141,8	5,7	1,4	531,2	3,6	0,5
164,2	8,4	0,9	615,1	1,7	0,8
190,1	10,7	0,5	712,4	0,6	0,6
220,2	12,3	1,2	825,0	0,2	0,2
255,0	12,8	1,8	955,4	0,0	0,0

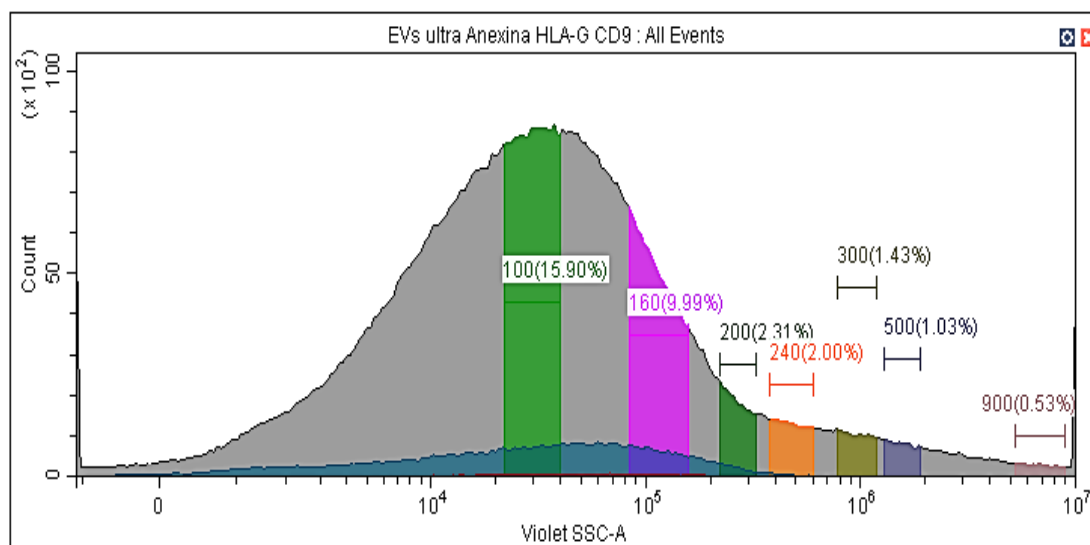
Fonte: A autora, 2023.

Nota: Dados gerados pelo próprio software do ZetasizerNano, a partir da mensuração em triplicata do concentrado.

### C- Nanocitometria de Fluxo

Nossos achados na nanocitometria corroboraram com os resultados obtidos na MET e na DLS. Através do concentrado da medula óssea patológica, observamos novamente um concentrado de partículas heterogêneas. Identificamos 25,89% de VEs menores que 200nm e 6,27% de VEs maiores que 200nm (figura 25).

Figura 25- Histograma referente ao percentual de tamanho de VEs provenientes do ultracentrifugado do estroma de medula óssea patológica.

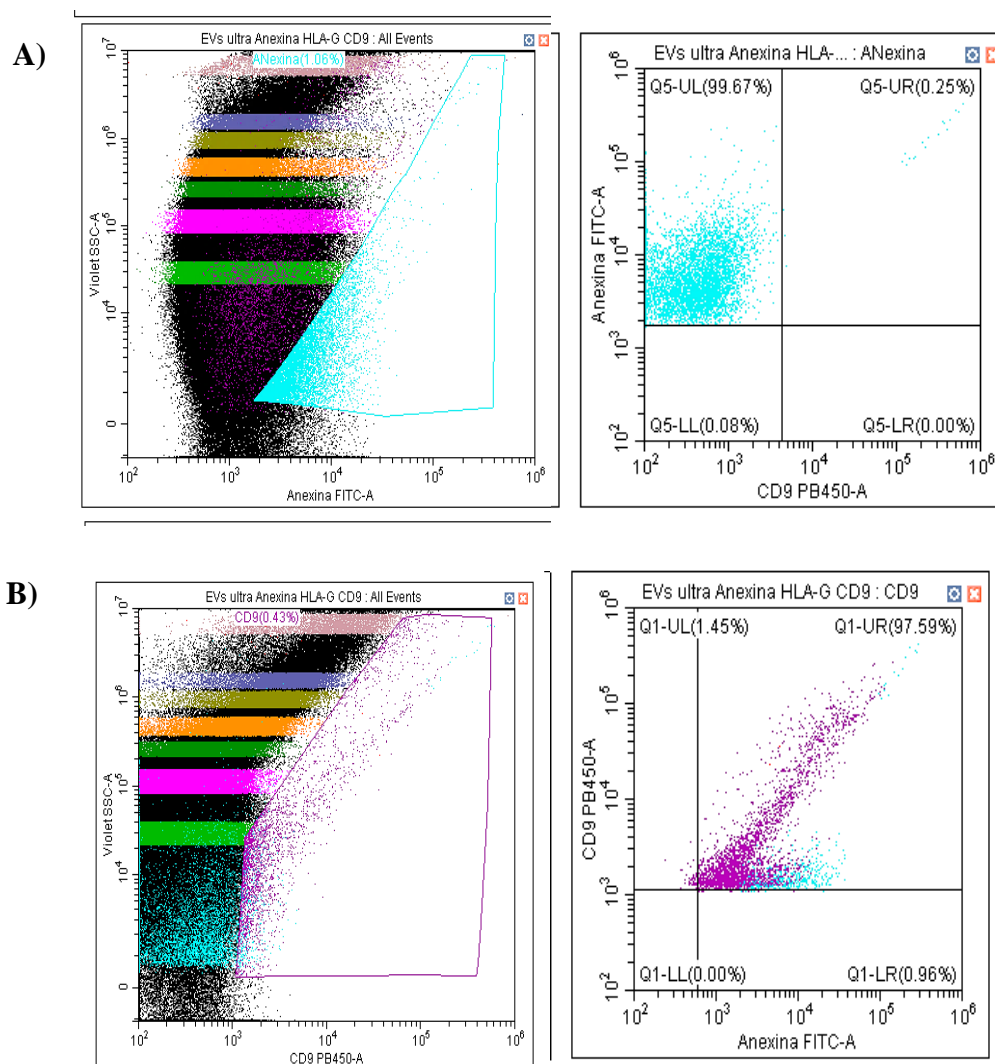


Fonte: A autora, 2023.

Nota: Valores descritos a partir da média percentual de fluorescência, equiparadas ao Gigamix, nosso controle de tamanho referencial.

As VEs apresentaram positividade de 1,06% para anexina, proteína celular presente em membranas fosfolipídicas, e 0,43% para a proteína testraspanina CD9, que é associada a membrana plasmática ou endossomo, como já citado anteriormente. Além disso, foi possível identificar que apenas 0,25% das VEs que apresentaram positividade para a Anexina apresentam coexpressão com o CD9, contudo, 97,59% das VEs que são positivas para o CD9 apresentam coexpressão para anexina (figura 26).

Figura 26- Ilustração da imunomarcação realizada com CD9 e anexina. Ultracentrifugado proveniente do estroma de medula óssea patológica de paciente com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

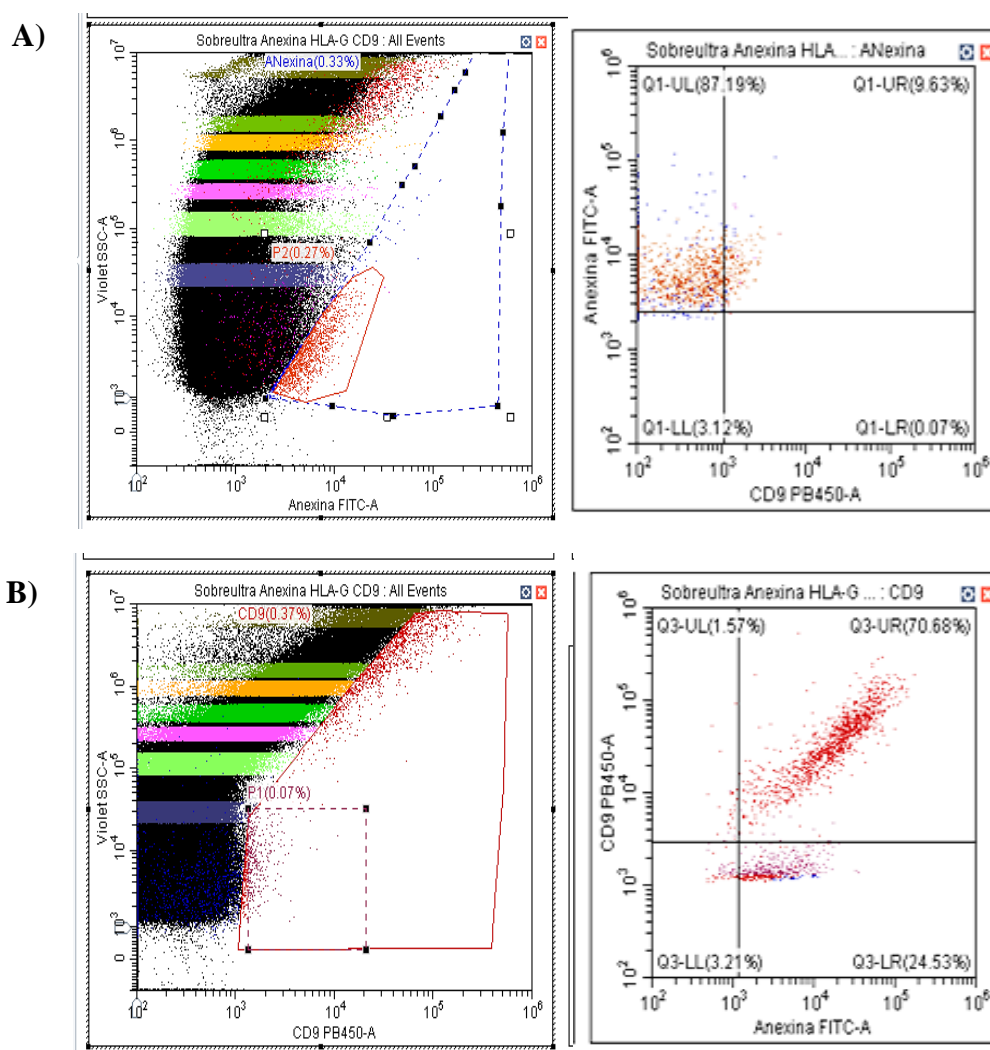


Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos do bloco A é possível identificar VEs que apresentaram positividade para anexina (FITC); nos gráficos do bloco B visualizamos VEs que apresentaram positividade para CD9 (V450) com coexpressão para anexina.

A eficiência do protocolo de isolamento através da ultracentrifugação foi aferida pela análise do sobrenadante do ultracentrifugado, marcado de forma semelhante e em paralelo com as VEs. Foi possível identificar que cerca de 0,33% de partículas são positivas para Anexina e 0,37% são positivas para CD9, porém, apenas 0,27% e 0,07% correspondem a VEs menores (>200nm). Apesar da metodologia utilizada ser considerada pelo MISEV como “recuperação intermediária”, a partir desses resultados verificamos que a perda pós ultracentrifugação ainda ocorre, mas não é significativa (figura 27).

Figura 27: Ilustração da imunomarcação realizada no sobrenadante do ultracentrifugado, proveniente de medula óssea patológica de paciente com leucemia linfóide aguda.

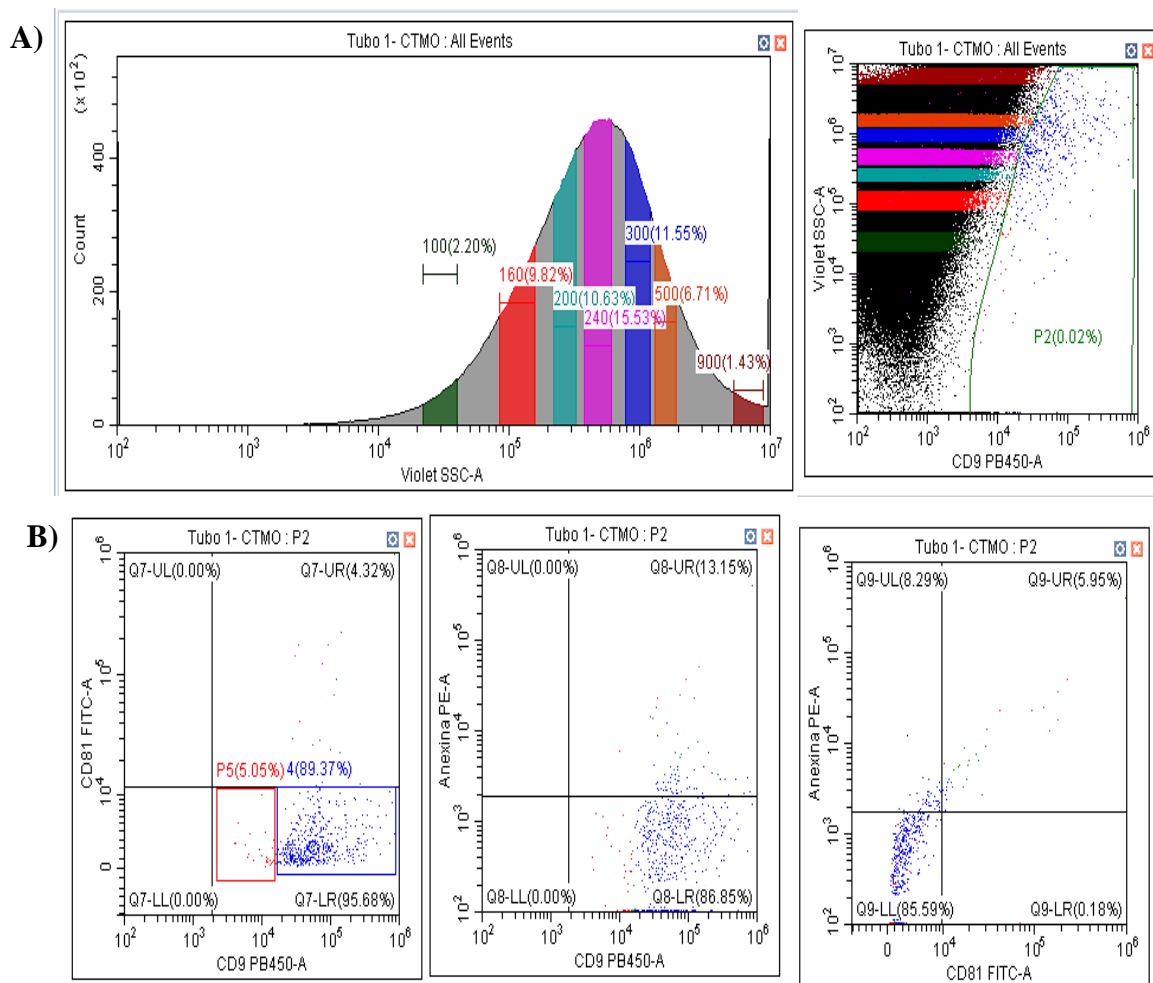


Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos do bloco A é possível identificar VEs que apresentaram positividade para anexina (FITC); nos gráficos do bloco B visualizamos VEs que apresentaram positividade para CD9 (V450).

Para a validação da sensibilidade do CD9, realizamos uma marcação no estroma de medula óssea não patológica, com anexina, CD9 e CD81 (proteína de superfície celular – Tetraspanina 28). A partir dessa marcação, identificamos uma distribuição de VEs também heterogênea, com 22,65% para as VEs <200nm, 33,79% para as VEs >200nm e 1,43% para VEs maiores que 500nm. Com o CD9 obtivemos uma maior porcentagem (89,37%) correspondente as VEs maiores que 200nm, e apenas 5,05% para VEs menores que 200nm. Para esse paciente apenas o CD9 apresentou positividade significativa (figura 28).

Figura 28: Ilustração da imunomarcação de VEs provenientes do ultracentrifugado do estroma de MO saudável, com CD9(+).



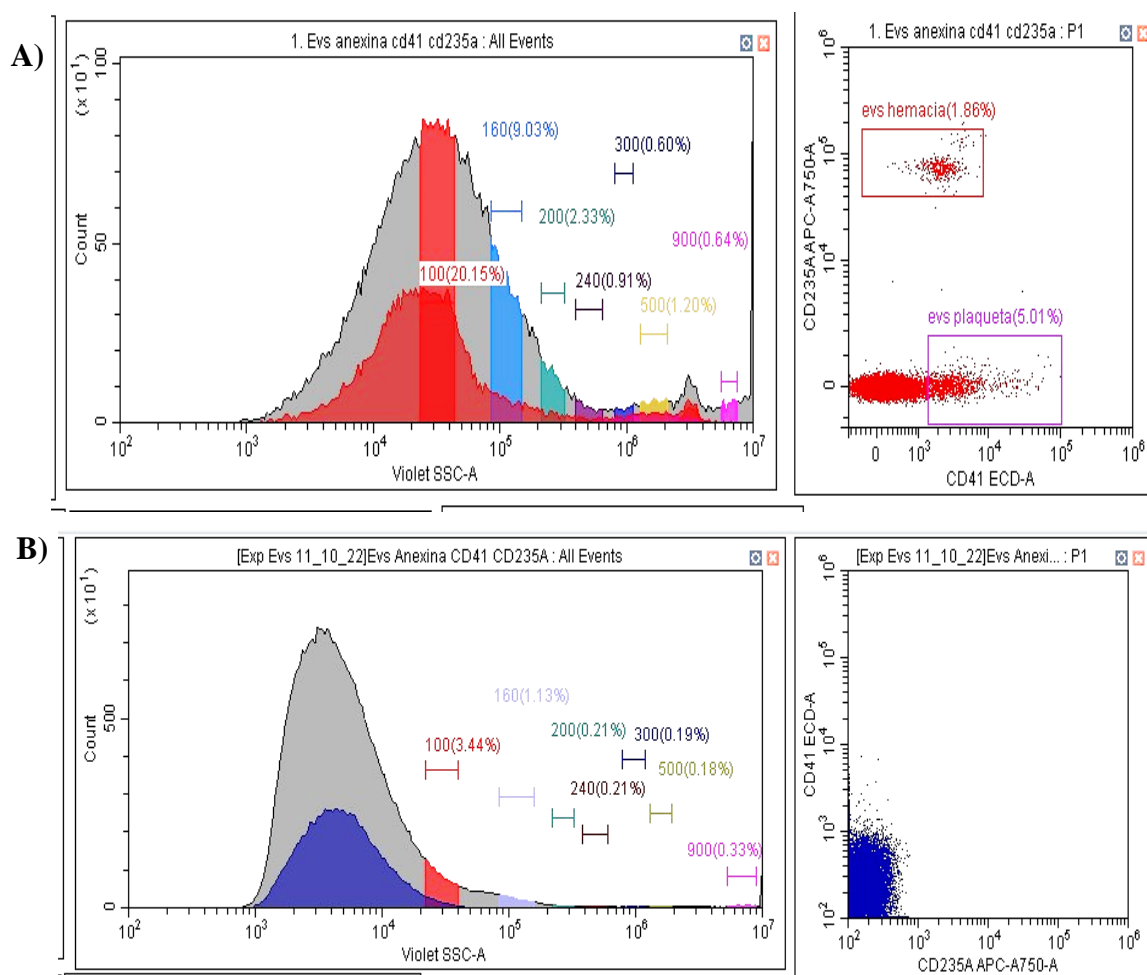
Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos do bloco A é possível identificar o histograma com a distribuição percentual das VEs encontradas no concentrado e o gate positivo para a proteína CD9. Nos gráficos do

bloco B visualizamos a coexpressão entre as proteínas CD9/CD81, CD9/Anexina e Anexina/CD81.

Como mais uma forma de validação do nosso protocolo e controle de especificidade, realizamos o comparativo entre VEs provenientes de plasma do sangue periférico de doador saudável e do estroma de medula óssea patológica de paciente com leucemia linfóide aguda, realizando a marcação com CD41, CD235a, marcadores plaquetários (Figura 29).

Figura 29: Ilustração da imunomarcação de VEs provenientes do plasma de sangue periférico de doador saudável e VEs derivadas do estroma de medula óssea patológica.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: Nos gráficos do bloco A identificamos VEs positivas para os marcadores plaquetários e de hemácias que não estão presentes nas VEs derivadas da medula óssea, como demonstrado nos gráficos do bloco B.



Através desse resultado foi possível identificar que a amostra proveniente do estroma medular é negativa para os marcadores do sangue periférico, o que sugere que o nosso material não sofreu contaminações. Por último, por meio deste controle foi possível verificar que a proteína anexina marca copiosos tipos de VEs, sejam elas provenientes do plasma ou do estroma, o que a torna pouco sensível e específica.

## 5.6 Identificação de HLA-G nas Vesículas Extracelulares

### 5.6.1 Caracterização demográfica da população de estudo.

Para a identificação de moléculas solúveis no estroma medular, avaliamos 20 pacientes, sendo estes o nosso segundo grupo de estudo. Dos pacientes avaliados, 10 tinham LLA-B, 4 LLA-T e 6 LMA. Dentre as características antropométricas da nossa população de estudo (tabela 13), observamos que existe uma maior porcentagem de meninas acometidos para a LLA-B, e uma menor porcentagem para a LLA-T e LMA. Em relação a idade, nossa população se distribui entre crianças com 2 anos até os 16 anos de idade, sendo essa distribuição semelhante entre os grupos.

Tabela 13– Perfil Antropométrico da população de estudo – vesículas extracelulares.

<b>Leucemias=</b>	<b>LLA-B</b>	<b>LLA-T</b>	<b>LMA</b>
N/%=	10	4	6
<b>Características</b>			
<b>Sexo</b>			
Masculino	2 (20%)	4(10%)	4(66%)
Feminino	8 (80%)	0(0%)	2(34%)
<b>Idade (em anos)</b>			
Min – Max	2-14	5-16	1-15
Média (desvio)	5,9 (4,18)	9,75 (4,86)	8,83 (6,4)
Mediana	4	9	11

Fonte: A autora, 2023.

A classificação de risco utilizado no protocolo do IMIP leva em consideração os dados clínicos e laboratoriais do paciente no momento do diagnóstico (Tabela 14). As alterações laboratoriais associadas a leucemia, incluem o aumento da contagem de leucócitos, diminuição da hemoglobina, hematócrito e alterações plaquetárias,

geralmente associadas clinicamente a febre, aumento de frequência cardíaca, tontura, dor óssea e hemorragias. Ademais, o aumento do lactato desidrogenase (DHL) em danos nos tecidos está diretamente ligado à degradação tumoral e doenças agudas.

Tabela 14– Variáveis clínico-laboratoriais – VEs.

<b>Características</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>
<b>LLA-B</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	2.600	62.400	20.870	20945,8	14.250
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	4,7	11	8,31	2,01	8,65
<b>Hematocrito (%)</b>	14,4	40,6	25,85	7,15	26,7
<b>Plaqueta (uL)</b>	5.000	445.000	112.700	136.265	57.000
<b>DHL (U/L)</b>	211	3.254	817,7	1.038,7	318
<b>LLA-T</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	3.300	490.400	144.425	233323,7	42.000
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	7,2	13,2	10,9	2,63	11,75
<b>Hematocrito (%)</b>	19	38,4	31,6	8,62	34,5
<b>Plaqueta (uL)</b>	51.000	568.000	262.500	518068,03	215.000
<b>DHL (U/L)</b>	170	2.326	1003	924,53	758
<b>LMA</b>					
<b>Leucometria (uL)</b>	1.900	59.400	19.083	24105,4	5.700
<b>Hemoglobina(g/dL)</b>	5,9	8	6,98	0,75	6,9
<b>Hematocrito (%)</b>	16,8	25,3	21,11	3,10	21,55
<b>Plaqueta (uL)</b>	8.000	216.000	59833,3	80846,5	20.500
<b>DHL (U/L)</b>	278	2.081	1071,6	703,3	1.011

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Variáveis utilizadas para a classificação de risco de pacientes pediátricos com diagnóstico leucêmico, atendidos no IMIP.

No que diz respeito à classificação morfológica FAB (Tabela 15) através do mielograma, observamos que a média do número de blastos é maior nos pacientes LLA-B (85%) e menor nos pacientes LMA (62,17%), seguidos dos pacientes com LLA-T (67,75%). O percentual médio de granulócitos é menor para a linhagem B em comparação com as demais linhagens, enquanto a porcentagem média de eritroblastos é semelhante entre as linhagens linfoide e superior para a linhagem mieloide.

Tabela 15– Perfil morfológico ao diagnóstico de pacientes pediátricos com leucemia atendidos no IMIP.

<b>Características</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>
<b>LLA-B</b>					
Eritroblastos%	1	10	3,9	3,11	3
Granulócitos%	0	5	1,6	1,65	1
Linfócitos%	1	25	9,5	6,45	8,5
Blastos%	73	97	85	6,5	85,5
Megacariócitos					
Ausente=	6 (60%)				
Presente-normal=	4 (40%)				
<b>LLA-T</b>					
Eritroblastos%	2	8	5,00	2,8	5
Granulócitos%	4	34	13,0	14,17	7
Linfócitos%	7	30	14	10,74	9,5
Blastos%	27	85	67,75	27,29	79,5
Megacariócitos					
Ausente=	3 (75%)				
Presente-baixo=	1 (25%)				
<b>LMA</b>					
Eritroblastos%	2	44	12,17	16,47	4,5
Granulócitos%	1	28	16,00	11,64	20
Linfócitos%	4	18	8,83	5,19	7,5
Blastos%	32	81	62,17	23,71	56
Plasmáticas%	3	3	3,0	-	3
Megacariócitos					
Ausente=	5(83%)				
Presente-baixo=	1 (17%)				

Fonte: A autora, 2023.

Em relação aos achados genéticos para a nossa população de estudo (tabela 16), nos pacientes com LLA-B, 90% dos pacientes apresentaram um prognóstico intermediário, que se refere aos pacientes que não apresentaram positividade para nenhum dos alvos avaliados, seguida de 10% dos pacientes que apresentaram prognóstico favorável, correspondente a translocação (12;21) (p13;q22). Para os pacientes com LLA-T, 75% dos pacientes não possuem alterações gênicas (considerando as alterações testadas) e 25% possuem a translocação 10;14 (*oncogene Hox11*), consideradas com prognósticos intermediários e favoráveis, respectivamente. Para os pacientes com LMA, 83% dos pacientes estudados não possuem alterações gênicas, condizentes ao prognóstico intermediário e 17% com

prognóstico favorável t (8;21).

Tabela 16– Alterações moleculares avaliadas nos pacientes pediátricos com leucemia no IMIP.

<b>Leucemias=</b>	<b>LLA- B</b>	<b>LLA-T</b>	<b>LMA</b>
N (%) =	10	4	6
<b>Características</b>			
<b>Alteração Gênica</b>			
Sem alterações	9 (90%)	3 (75%)	5 (83%)
t (8;21)	-	-	1 (17%)
t (12;21)	1 (10%)	-	-
Hox11	-	1 (25%)	-
<b>Fator de Risco</b>			
Favorável	1 (10%)	1 (25%)	1 (17%)
Intermediário	9 (90%)	3 (75%)	5 (83%)

Fonte: A autora, 2023.

A respeito dos óbitos e recaídas, para os pacientes com LLA-B, apenas um paciente foi a óbito (20%), o mesmo tinha prognóstico intermediário. Para os 4 pacientes com LLA-T, nenhum paciente foi a óbito ou recaiu, até o momento do andamento e finalização desse estudo. Para a linhagem mieloide, apenas um paciente recaiu (17%), o mesmo tinha um prognóstico molecular intermediário. Além disso, desse mesmo grupo, três pacientes (50%) foram a óbito, todos com o prognóstico intermediário e com classificação FAB para LMA-M0.

#### 5.6.2. Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LLA-B

Para os pacientes com LLA-B, identificamos que ao diagnóstico mais VEs são secretadas, contudo, na doença residual ocorre um aumento na média percentual da expressão de praticamente todas as proteínas de superfície analisadas, com exceção apenas para a proteína CD90 que mantém a média percentual semelhante (tabela 17). Vale ressaltar que, mesmo com o aumento na expressão desses marcadores, apenas para o CD34 obtivemos resultados estatisticamente significativos (figura 30).

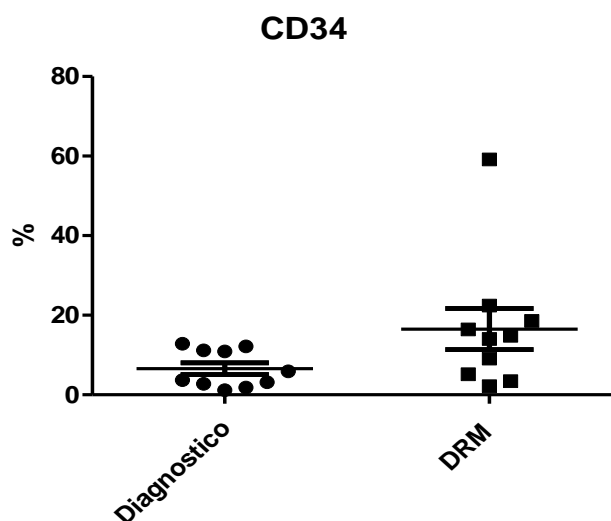
Tabela 17- Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LLA-B.

<b>Característica</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>	<b>P&lt;0,05</b>
<b>VEs Totais%</b>						0,1055
Diagnóstico	2397,00	14435,33	7842,53	3370,64	7627,83	
DRM	3519,00	10014,67	5977,87	1982,09	5361,17	
<b>HLA-G%</b>						0,1055
Diagnóstico	1,6	20,79	7,86	5,74	6,37	
DRM	2,82	22,50	12,67	6,41	14,00	
<b>CD9 %</b>						0,1602
Diagnóstico	6,13	50,82	16,05	13,13	12,18	
DRM	7,82	39,65	20,57	10,46	20,42	
<b>CD19%</b>						0,7695
Diagnóstico	1,21	10,15	5,06	3,13	4,69	
DRM	1,53	16,11	6,24	4,92	4,21	
<b>CD34 %</b>						<b>0,0137</b>
Diagnóstico	1,15	12,86	6,56	4,69	4,81	
DRM	2,17	59,16	16,53	16,43	14,43	
<b>CD33 %</b>						0,4922
Diagnóstico	0,57	14,09	5,19	4,35	4,44	
DRM	2,18	14,23	6,63	4,09	5,13	
<b>CD7 %</b>						0,7987
Diagnóstico	0,72	5,09	2,00	1,23	1,62	
DRM	0,76	4,65	2,06	1,18	1,98	
<b>CD90 %</b>						1,00
Diagnóstico	1,08	12,45	4,55	3,50	3,42	
DRM	1,51	7,80	4,21	2,19	4,34	
<b>CD45%</b>						0,2324
Diagnóstico	5,28	55,76	16,75	14,69	14,16	
DRM	6,29	41,84	18,78	10,50	17,82	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Identificação de proteínas na superfície de vesículas extracelulares secretadas por células de pacientes com leucemia linfóide aguda de células B, ao diagnóstico e no início do tratamento.

Figura 30- Gráfico referente a média percentual da expressão da proteína de superfície CD34 ao diagnóstico e na doença residual mínima de pacientes com LLA-B.



Fonte: A autora, 2023.

### 5.6.3. Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LLA-T

Para os pacientes com LLA-T, identificamos que ao diagnóstico mais VEs são secretadas, contudo, assim como para os pacientes com LLA-B, na doença residual mínima é possível identificar um aumento na média percentual da expressão de praticamente todas as proteínas de superfície analisadas, com exceção apenas para a proteína CD7 que nesse caso é mais expressa ao diagnóstico (tabela 18). Entretanto, nenhum dos marcadores apresentaram resultados estatisticamente significativos.

Tabela 18- Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LLA-T.

Característica	Mínimo	Máximo	Média	Desvio	Mediana	P<0,05
<b>VEs Totais%</b>						0,3750
Diagnóstico	1527,67	33052,00	20726,92	8303,05	17290,00	
DRM	10942,67	25742,67	17844,0	6101,14	17345,33	
<b>HLA-G%</b>						0,6250
Diagnóstico	6,11	18,27	13,07	5,26	13,94	
DRM	5,16	25,16	16,40	8,70	17,64	

<b>CD9 %</b>						0,1250
Diagnóstico	1,01	3,45	2,06	1,05	1,89	
DRM	1,30	38,69	12,11	17,78	4,21	
<b>CD19%</b>						0,2500
Diagnóstico	0,27	0,50	0,41	0,10	0,44	
DRM	0,22	1,17	0,77	0,47	0,84	
<b>CD34 %</b>						0,3750
Diagnóstico	0,29	0,76	0,55	0,20	0,57	
DRM	0,22	1,98	0,92	0,75	0,74	
<b>CD13 %</b>						0,2500
Diagnóstico	0,96	1,92	1,30	0,45	1,16	
DRM	0,77	5,54	2,82	2,11	2,48	
<b>CD7 %</b>						0,2500
Diagnóstico	1,46	3,77	2,8	1,07	2,99	
DRM	1,06	3,81	1,86	1,32	1,28	
<b>CD90 %</b>						0,6250
Diagnóstico	2,22	7,35	3,56	2,53	2,33	
DRM	1,30	24,00	10,05	9,76	7,46	
<b>CD45%</b>						0,6250
Diagnóstico	1,20	3,06	2,26	0,95	2,40	
DRM	0,80	8,45	4,53	3,38	4,44	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Identificação de proteínas na superfície de vesículas extracelulares secretadas por células de pacientes com leucemia linfóide aguda de células T, ao diagnóstico e no início do tratamento.

#### **5.6.4. Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LMA**

Com relação aos pacientes com LMA, verificamos um padrão inverso em comparação as linhagens linfóides, para esse grupo, mais vesículas extracelulares são secretadas na doença residual mínima, contudo, a média percentual de expressão para as proteínas de superfície são superiores no diagnóstico, com exceção apenas para o marcador CD19, onde a média encontrada se assemelha. Assim, como para as outras duas linhagens, apesar da diferença percentual identificada, não obtivemos resultados estatisticamente significativos.

Tabela 19- Identificação de proteínas de superfície em VEs provenientes de pacientes com LMA.

<b>Característica</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>	<b>P&lt;0,05</b>
<b>VEs Totais%</b>						0,4375
Diagnóstico	5437,00	12403,67	9636,33	3299,17	11171,50	
DRM	4620,00	15782,67	11754,17	39,58,44	13106,83	
<b>HLA-G%</b>						0,5625
Diagnóstico	2,16	9,22	5,16	3,03	4,02	
DRM	2,24	11,17	4,56	3,48	3,00	
<b>CD9 %</b>						0,6875
Diagnóstico	5,95	16,51	9,46	4,96	6,54	
DRM	4,36	21,57	8,38	6,61	5,94	
<b>CD19%</b>						1,00
Diagnóstico	1,22	3,33	2,31	0,93	2,41	
DRM	1,06	4,90	2,36	1,53	1,57	
<b>CD34 %</b>						0,6875
Diagnóstico	1,75	11,23	4,63	3,87	2,59	
DRM	1,62	9,03	3,24	2,86	2,25	
<b>CD13 %</b>						0,4375
Diagnóstico	2,79	19,00	7,77	6,24	5,25	
DRM	0,22	17,96	5,40	6,39	3,79	
<b>CD7 %</b>						0,3125
Diagnóstico	3,54	73,34	17,19	27,65	6,01	
DRM	0,94	12,85	4,68	4,29	3,61	
<b>CD90 %</b>						0,5625
Diagnóstico	6,27	30,24	16,33	10,19	12,51	
DRM	6,92	23,56	12,40	6,32	10,78	
<b>CD45%</b>						0,5625
Diagnóstico	3,33	29,95	11,81	10,89	6,18	
DRM	3,76	16,57	7,16	4,71	5,45	

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Identificação de proteínas na superfície de vesículas extracelulares secretadas por células de pacientes com leucemia mieloide aguda, ao diagnóstico e no início do tratamento.

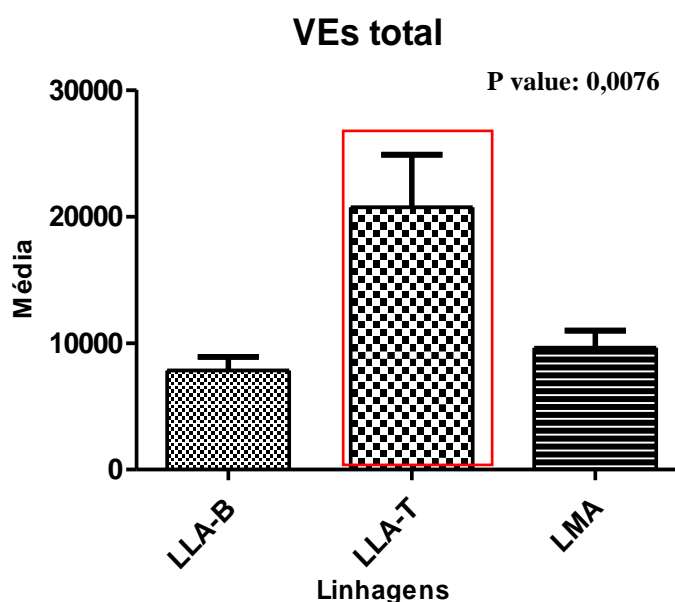
### **5.6.5 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes de pacientes leucêmicos, ao diagnóstico e na doença residual mínima**

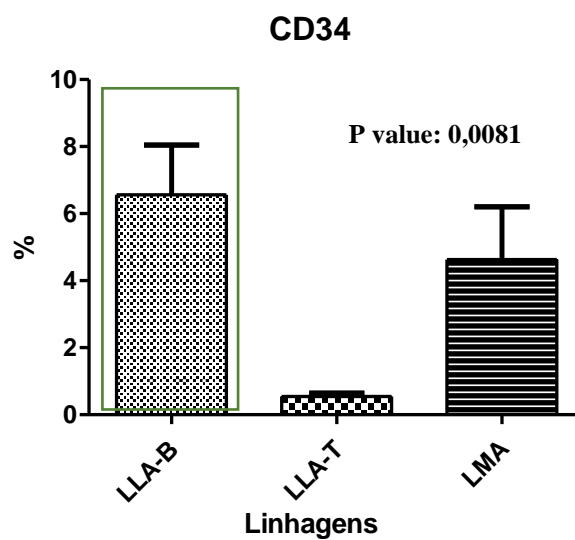
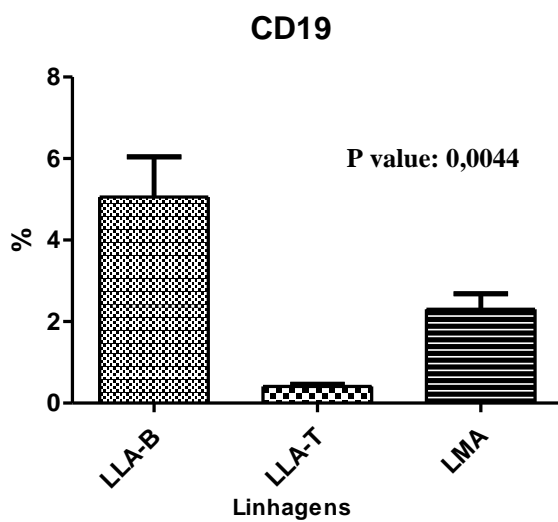
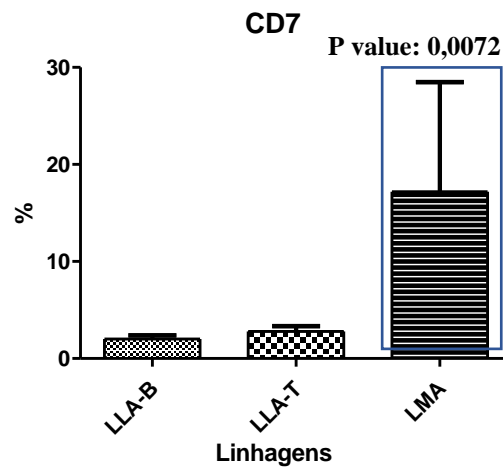
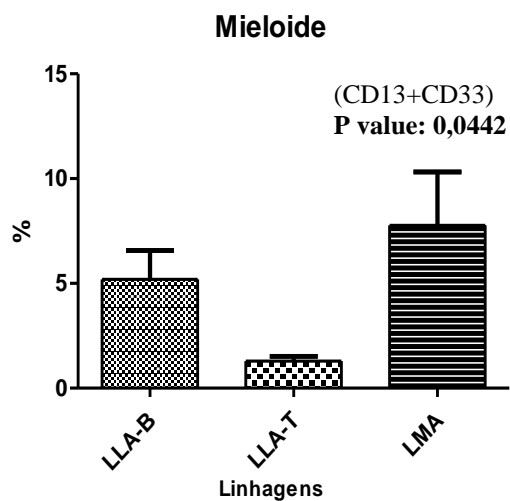
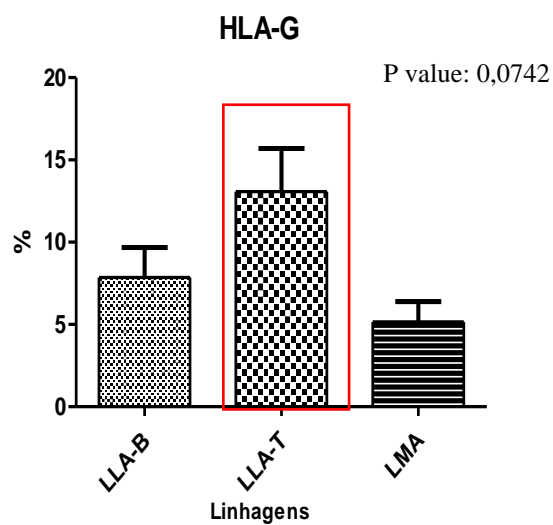
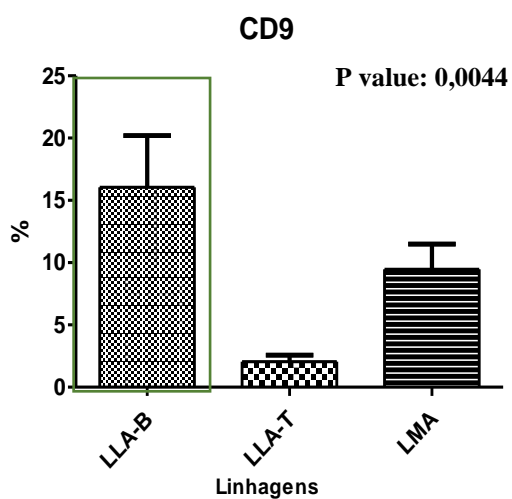


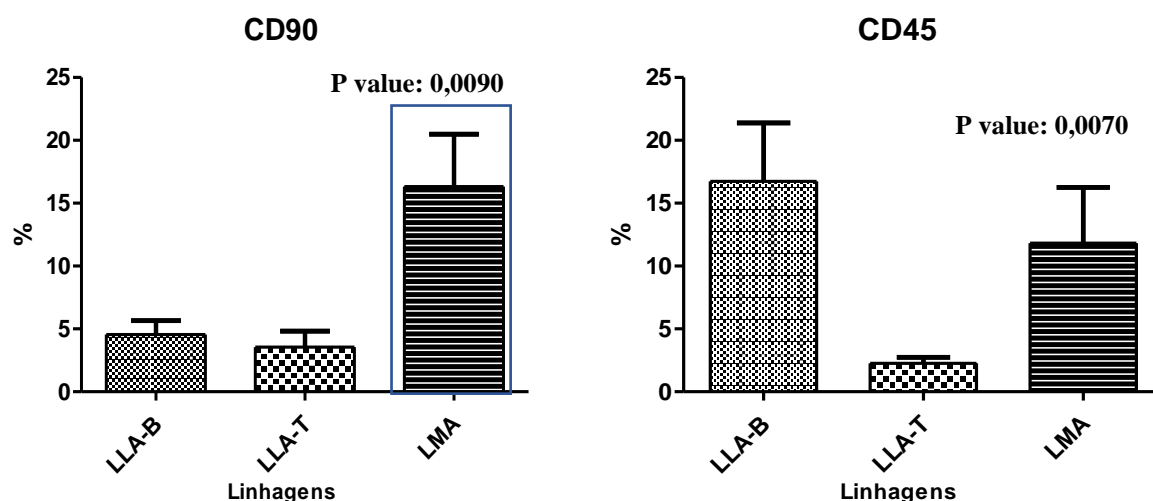
Por fim, realizamos uma análise comparativa através dos percentuais médios das proteínas de superfície entre as linhagens leucêmicas, reagrupando em uma análise ao diagnóstico e na doença residual. Através dessa análise, ao diagnóstico identificamos diferenças estatísticas para praticamente todos os marcadores, com exceção apenas para o HLA-G, devido a semelhança na média percentual entre os grupos linfóides.

Com relação a quantidade de VEs secretadas e a expressão de HLA-G, observamos que o grupo de pacientes com LLA-T se sobrepõe nas demais linhagens, sendo atenuado nos demais marcadores. Para os marcadores CD9, CD19, CD34 e CD45 é possível identificar uma maior expressão no grupo dos pacientes com LLA-B. Para os pacientes com LMA, identificamos um aumento na expressão dos marcadores para a linhagem mieloide (CD13 e CD33), CD7 e CD90.

Figura 31- Gráficos relativos à média percentual da expressão das proteínas de superfície mensuradas ao diagnóstico contraponto entre os pacientes com LLA-B, LLA-T e LMA.



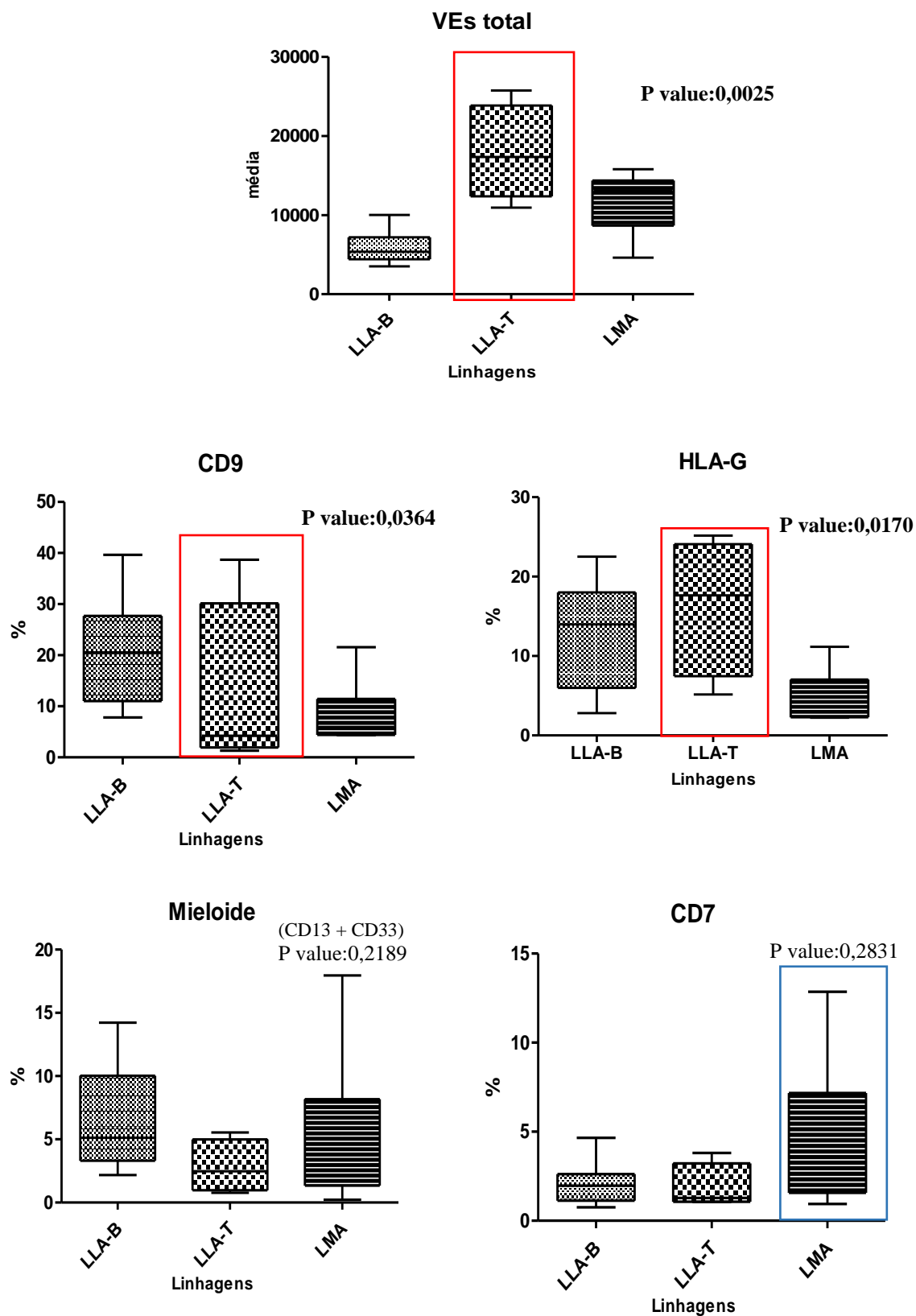


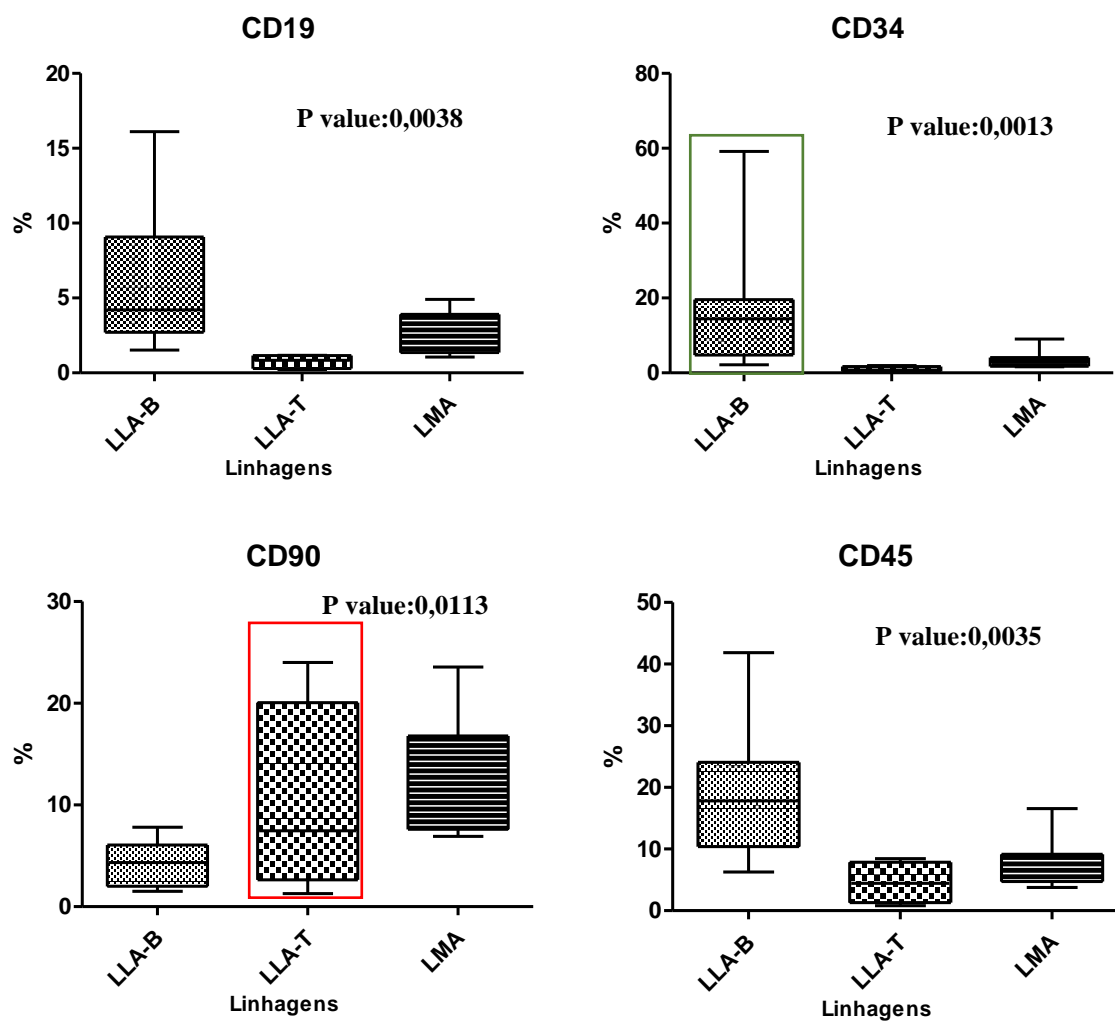


Fonte: A autora, 2023.

No que diz respeito a análise na doença residual mínima, identificamos diferenças estatísticas para praticamente todos os marcadores, com exceção apenas para os marcadores mielóide (CD13 e CD33) e para a proteína CD7. Assim como no diagnóstico a quantidade de VEs secretadas e a expressão de HLA-G é maior nos pacientes com LLA-T, contudo, na doença residual mínima esses pacientes também passaram a expressar mais CD9 e CD90, se mantendo atenuado nos demais marcadores. Para os pacientes com LLA-B, assim como no diagnóstico o grupo se sobressai nos marcadores CD19, CD34 e CD45. Por fim, para os pacientes com LMA, temos um aumento percentual em comparação com os demais grupos apenas para os marcadores mielóides e CD7.

Figura 32- Gráficos relativos à média percentual da expressão das proteínas de superfície mensuradas na doença residual mínima contraponto entre os pacientes com LLA-B, LLA-T e LMA.





Fonte: A autora, 2023.

## **6 DISCUSSÃO**

### **6.1 Descrição demográfica da população estudada para células e VEs**

O primeiro levantamento com as taxas de incidência e mortalidade sobre leucemias agudas na cidade do Recife foi realizado em 2016, foram avaliados dados epidemiológicos com um intervalo entre os anos de 1998 e 2007. Esse estudo avaliou 175 casos e demonstrou que a leucemia linfóide aguda é a mais prevalente (127 casos), a incidência de diagnósticos é maior em crianças com até 04 anos (75 casos), e que a maioria dos acometidos são meninos (90 casos), além disso, no parâmetro geral, a sobrevivência relativa desses pacientes era de 76,5% (LINS et al., 2017).

Em outro estudo também realizado no Recife, 454 pacientes com LLA foram avaliados entre os anos de 2005 e 2015, com uma média de 45 pacientes ao ano, evidenciando a alta incidência da patologia e do subtipo linfóide. Como no estudo anterior, mais pacientes do sexo masculino foram acometidos (n:53) e 101 pacientes apresentaram remissão completa (PEDROSA et al., 2020).

Para a LMA, um estudo realizado no IMIP através de uma coorte retrospectiva dos anos de 2000-2014, avaliou 170 pacientes com LMA geral (subtipos M1, M2, M4, M5, M6 e M7) e 50 pacientes com LMA-M3, sendo a média anual de 12 e 3 pacientes, respectivamente. Para o sexo, temos mais meninos acometidos (n:106) na LMA geral e meninas acometidas no subtipo M3 (n:26). Com relação a remissão, 123 e 39 pacientes atingiram a remissão completa, para LMA geral e M3, respectivamente. Contudo, 108 pacientes dessa coorte vieram a óbito (n:93 LMA, n:15: LMA-M3), uma porcentagem de 49% (LINS et al., 2019).

Esses dados epidemiológicos evidenciam a prevalência da leucemia infantil em Pernambuco, sendo o nosso trabalho uma fração dessa população. Obtivemos, uma prevalência de 55% para o sexo masculino (22 pacientes) e uma taxa relativa de sobrevivência de 90%. Dos 24 pacientes com LLA que integram esse trabalho, 14 são do sexo masculino e 19 pacientes apresentaram remissão completa. Para além, nossos achados foram mais favoráveis para LMA, no qual 14 pacientes atingiram a remissão completa e apenas 3 foram a óbito (18,75%).

### **6.2 Isolamento e inspeção da viabilidade celular**

Após o descongelamento, é indicado que as células passem por verificação

viabilidade como controle de qualidade, sendo o percentual ideal acima de 70%, e que no mínimo  $1 \times 10^5$  de células sejam mensuradas (LIM et al., 2020). Para além, se torna necessário que o método utilizado possua capacidade para distinguir células viáveis, células apoptóticas e células apoptóticas tardias (mortas na imunofenotipagem ou citometria de fluxo). A metodologia escolhida para esse trabalho, foi através da detecção do 7-Aminoactinomicina D (7-AAD) que é um derivado fluorescente da actinomicina D, um corante de DNA, ele pode determinar células apoptóticas com mais sensibilidade do que outros corantes usados para controle de viabilidade (como o azul de tripan), por isso, é amplamente usado para protocolos pré-transplante e/ou quantificação de células tronco, como no protocolo ISHAGE (VARAN et al., 2019; MATOS et al., 2020).

No nosso estudo identificamos uma média de 70,31% para viabilidade geral com todos os subgrupos, contudo, as leucemias LLA-T, LMA e LMA-M3 apresentaram a viabilidade inferior ao que seria padrão. Embora que esse percentual não tenha sido o ideal, nenhuma amostra foi retirada desse estudo, as células que sofreram apoptose foram retiradas no momento da análise e todos os percentuais foram dados a partir das células viáveis.

### **6.3 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia Linfóide**

Realizamos a detecção das células mesenquimais e endoteliais diferenciadas (CD44<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> - MSCs e CD31<sup>+</sup> - endotelial) nos pacientes com LLA, contudo, não encontramos desigualdades no percentual médio da expressão dos marcadores mesenquimais, com relação ao marcador endotelial temos uma diminuição na expressão do CD31, entretanto, sem resultados estatísticos. Embora no nosso estudo ainda não tenhamos resultados relevantes, na literatura podemos constatar que as células estromais contribuem para a resistência terapêutica na LLA, através de interações diretas e secreção de fatores solúveis e as células leucêmicas promovem uma modulação, alterando a capacidade de diferenciação das células estromais (PARK et al., 2023; HUGHES et al., 2023). Para os marcadores de imaturidade dessas células (CD90 e CD133) não encontramos positividade, tornando-se necessário um cultivo celular para promover a expansão dessas células.

Para a molécula de adesão CD44, avaliamos sua expressão nos dois gates do CD45. Para o CD45<sup>-</sup> identificamos um aumento significativo em 7 vezes para a LLA-

B e em 16 vezes para os pacientes com LLA-T, sendo essa expressão possivelmente derivada das células estromais ou do clone leucêmico. Para o CD45<sup>low</sup> encontramos uma diminuição na expressão da molécula, principalmente para a LLA-B. Correlacionando com o prognóstico, para os pacientes com LLA-B, dois pacientes com maior percentagem (58,62% e 45,65%) são de prognóstico intermediário e desfavorável, e os dois pacientes com menor percentagem (0,1% e 2,34%) são de prognóstico favorável, no qual um desses pacientes recaiu. Para os pacientes com LLA-T, o paciente com maior expressão (34,09%) possui prognóstico intermediário, e dois pacientes com percentagens mais baixas (7,96% e 18,87%) possuem prognóstico favorável e intermediário, respectivamente, e os dois pacientes recaíram. Na literatura, estudos indicam que o aumento da expressão de CD44 pode caracterizar os pacientes com LLA como um subgrupo de alto risco, associado diretamente a um mau prognóstico, em razão da sua capacidade de fazer as células blásticas se aderirem ao nicho medular para resistirem aos medicamentos quimioterápicos (OMRAN et al., 2015; SPERTINI et al., 2019). Contrapondo essa hipótese, os nossos achados mostram que os pacientes com LLA e com baixa expressão de CD44 recaem e não respondem ao tratamento.

Para o CD34<sup>+</sup>, sua expressão é frequentemente associada aos precursores hematopoiéticos e aos precursores do clone leucêmico, entretanto, a caracterização dessa distinção é insuficiente. Nas leucemias, a expressão de CD34 é associada a proteína CD38, sendo o conjunto CD34<sup>+</sup> e CD38<sup>-</sup>, caracterizado pela resistência quimioterápica, devido a adesão celular e alteração na transdução de sinais (TAMIRO et al., 2021; MIZIA-MALARZ et al., 2023). No nosso estudo, para as células leucêmicas, tivemos um aumento na média percentual do precursor I (CD34<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>) e uma diminuição no precursor II (CD34<sup>+</sup> e CD105<sup>-</sup>). Correlacionando com o prognóstico, identificamos que entre o subgrupo da LLA-T, os três pacientes que recaíram possuem expressões mais baixas dessa população, (0,01% - 19,47%) e para o subgrupo da LLA-B, o único paciente que recaiu apresentou 0,13% da população e tinha prognóstico favorável.

Para a proteína tretraspanina CD9, uma coorte realizada com pacientes pediátricos identificou que, pacientes CD9<sup>+</sup> podem ter uma sobrevida livre de doença menor que os pacientes CD9<sup>-</sup>, além do mais, em estudos pré-clínicos com animais, o uso de anticorpos inibidores anti-CD9 promoveu uma melhor sobrevida livre de doença, através de uma menor carga leucêmica (LEUNG et al., 2020). Contudo, a



negatividade do CD9<sup>-</sup> também pode promover uma resistência a glicocorticoides, utilizados no tratamento quimioterápico, acarretando assim em uma falha na resposta terapêutica e células cancerígenas resistentes (LI, JMH et al., 2019). No nosso estudo, identificamos positividade para o CD9 no gate do CD45<sup>-</sup>, com um aumento na média percentual em 2 vezes para a LLA-T e em 10 vezes para a LLA-B, possivelmente relacionado com as células estromais ou blastos. Para a LLA-B, apenas 1 paciente recaiu e nenhum foi a óbito.

Para a proteína CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>low</sup>, identificamos uma diminuição na média percentual da sua expressão, em comparação com o grupo controle. Na literatura, a identificação da proteína CD90 e seu impacto no prognóstico dos pacientes foi amplamente abordado para as leucemias mieloides agudas e crônicas, visando identificar o papel da proteína na heterogeneidade da mesma (PINHEIRO et al., 2020). Os estudos indicam a presença do marcador em células pré-leucêmicas/precursor do clone leucêmico, inclusive sendo expresso em síndromes que antecedem a leucemia, como a SMD (HERRMANN et al., 2020). Dessa forma, o estudo sobre os efeitos dessa proteína em pacientes com LLA requer estudos adicionais.

Dentre as moléculas moduladoras avaliadas, apenas o PD1 apresentou resultados significativos para as LLAs, exibindo 50 vezes mais expressão que o grupo controle, e com médias percentuais similares entre os dois tipos de linhagens. Para os pacientes com LLA-B, identificamos uma recaída e um percentual de 91% para o PD1. Para os pacientes com LLA-T, os três pacientes que recaíram tinham expressão acima de 30% para a molécula. Na literatura identificamos que a presença do PD1 em células leucêmicas está diretamente ligada a recidivas e ao bloqueio da apoptose nas células alteradas. Para mais, o uso de inibidores para essa via tem se tornado um importante aliado para o tratamento e sobrevida desses pacientes (WUNDERLICH et al., 2021; XU, Xi et al., 2023).

#### **6.4 Avaliação das moléculas presentes no microambiente medular de pacientes com leucemia Mieloide**

Para as células mesenquimais e endoteliais na leucemia mieloide, estudos indicam que essas células precursoras sustentam e auxiliam na proliferação das células leucêmicas. Além disso, a LMA promove modificação dessas células para favorecer o processo inflamatório alterando o microambiente do nicho medular

(BORELLA et al., 2021). Para o nosso estudo, identificamos células *H stem cell*, mesenquimais (CD90<sup>-</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>) e endoteliais que já passaram por um processo de diferenciação não apresentaram diferenças de expressão entre os grupos analisados. Para as células mesenquimais precursoras (CD90<sup>+</sup>), e endotelial precursora (CD133<sup>+</sup>), se torna necessário um cultivo primário, assim como na LLA.

Além dessa remodelação, as células estromais estão diretamente ligadas a fixação do clone leucêmico que é diretamente dependente de CD44, um marcador importante expresso pelas células estromais. No nosso estudo, encontramos uma expressão 5 vezes maior para a LMA geral e 8 vezes maior para LMA-M3, em comparação com o grupo controle (Pvalue: 0,0207). Com relação ao prognóstico molecular, para a LMA geral, o nível de expressão não parece ter correlação considerando que os pacientes com maior expressão possuem prognóstico favorável e intermediário e os que possuem menor expressão também possuem prognóstico intermediário. Para a LMA-M3, mesmo que todos os pacientes tenham o prognóstico favorável, um paciente apresentou uma maior percentagem no CD45<sup>-</sup> e no CD45<sup>low</sup> e teve uma recaída. Esses achados são reforçados pela literatura, onde estudos indicam que a alta expressão do CD44<sup>+</sup> aumenta a ligação com o ácido hialurônico facilitando a integração das células alteradas no nicho medular e a sua sobrevivência (GUTJAHR et al., 2021).

Para os precursores hematopoiéticos, ao contrário do que identificamos nas LLAs, com o precursor I (CD34<sup>+</sup> e CD105<sup>+</sup>) identificamos um aumento na expressão para o subgrupo das LMAs (pvalue: 0,0209),

na literatura os nossos achados são confirmados, pois é possível identificar que as células leucêmicas ao reprogramarem o nicho medular, fazem com que as células precursoras fiquem mais tempo nesse nicho sem maturação e possam ser remodeladas para células resistentes (BORELLA et al., 2021).

Para a proteína CD31<sup>+</sup>, altamente expressa em células endoteliais (PECAM-1), ainda não temos muitos estudos sobre a sua influência no nicho medular das leucemias mieloides agudas, contudo, neste trabalho identificamos um aumento significativo na sua expressão para a LMA geral (Pvalue: 0,0185), que não se aplica para o grupo M3. O paciente com LMA geral que apresentou positividade de 90% para esse marcador, foi classificado como M1, com risco intermediário, não possui alteração genética, e apresentou remissão no D24, contudo, ao diagnóstico esse paciente apresentou altos índices para leucometria (36.200uL) e para as plaquetas

(163uL). Na literatura, a proteína CD31 é amplamente estudada com o CD38 nas leucemias linfocíticas crônicas, onde são associadas a angiogênese, progressão do câncer e imunossupressão (FARBER et al., 2021; DWIVEDI et al., 2021).

Para a proteína CD9, os estudos a indicam como um marcador de mau prognóstico relacionado ao clone leucêmico fixado no nicho do ambiente medular, associada a resistência quimioterápica e assim a recaída, além disso, em camundongos as células que apresentaram CD9<sup>+</sup> conseguiram reestabelecer a LMA e promover o crescimento e progressão da leucemia (LIU et al., 2021). Contudo, outros estudos também apontam que o CD9 suprime a proliferação celular e auxilia na regulação dos macrófagos, para além, os pacientes CD9<sup>-</sup> a taxa de sobrevida livre de doença pode ser muito menor, comparando com os pacientes que apresentam CD9<sup>+</sup> (XU et al., 2021). No nosso estudo, em comparação com o controle e com a LMA geral, a média percentual de CD9<sup>+</sup> foi maior para os pacientes com LMA-M3, destes, apenas um paciente recaiu e nenhum foi a óbito.

Para a molécula moduladora HLA-G, avaliamos sua expressão no gate do CD45<sup>-</sup> e no CD45<sup>low</sup>, para as duas ocorrências identificamos que nas células leucêmicas temos um aumento na expressão dessa molécula (Pvalue: 0,0073 e Pvalue:0,0343). Esse resultado é atestado em estudos disponíveis na literatura onde o HLA-G é altamente expresso em pacientes leucêmicos, ao diagnóstico e após transplante halogênico, sendo associado a recaídas (KAYA et al., 2022), além disso, achados também indicam que células estromais promovem a proliferação de células supressoras derivadas de células mieloides e que secretam o HLA-G (YANG et al., 2020). Com isso, o aumento da expressão dessa molécula identificada no nosso estudo pode estar relacionado a células leucêmicas ou células estromais/hematopoiéticas que passaram por remodelação no nicho medular.

Assim como no HLA-G, identificamos um aumento na expressão da molécula moduladora PD1 nos gates do CD45<sup>-</sup> e CD45<sup>low</sup> (Pvalue: 0,0131 e Pvalue: 0,0052). Como descrito anteriormente nesse estudo, o bloqueio do ponto de controle imunológico por inibidores da via PD1/PD-L1 apresentou bons resultados clínicos em tumores sólidos, contudo, essa via ainda é pouco explorada para LMA e principalmente em crianças. Todavia, na literatura já temos dados que correlacionam a expressão de PD1 com outras moléculas, associadas com mau prognóstico e com capacidade para biomarcadores imunológicos (CHEN et al., 2021). Não obtivemos resultados significativos para o seu ligante PD-L1, contudo o único paciente que recaiu

para LMA-M3 apresentou positividade de 25% para o ligante, resultado que destoa dos demais pacientes do grupo, considerando que todos apresentaram positividade abaixo de 2%.

## **6.5 Validação da metodologia de isolamento e caracterização das Vesículas Extracelulares**

Desde a descoberta de que partículas secretadas por células podem modular um ambiente através do carreamento de moléculas moduladoras, proteínas de adesão ou microRNAs, um grande salto nos estudos focados nessas VEs ganhou o mercado científico. Porém, muitas das metodologias empregadas para o isolamento e caracterização se tornaram irreprodutíveis e alguns achados que poderiam apresentar significados clínicos, foram invalidados. Mediante a isso, a padronização metodológica se tornou necessário para aumentar a reprodutibilidade dos achados, como vemos nas publicações dos periódicos do MISEV 2014, 2018 e 2021. Por isso, a partir da metodologia de isolamento, utilizamos mais de uma técnica com sensibilidade nanométrica, para validar e caracterizar as VEs (TIWARI et al., 2021).

A MET é uma técnica amplamente utilizada para determinar forma, tamanho e estrutura dos componentes com resolução nanométrica. Nos nossos achados, identificamos um padrão heterogêneo de VEs, com VEs pequenas – grandes, com morfologias diferentes e a presença de lipoproteínas (SZATANEK et al., 2017). Esses achados heterogêneos são compatíveis com a origem do nosso material, como o estroma é formado por várias células, temos VEs diferentes sendo secretadas. O protocolo de identificação e a morfologia dos nossos achados foram confirmadas com estudos disponíveis na literatura (CIZMAR et al., 2017; RIKKERT et al., 2019; CARNINO et al., 2019; QIAO, Zhi et al., 2019; NIKISHIN et al., 2021). Dessa forma, o uso da MET nos proporcionou a identificação visual dos componentes do nosso concentrado e que os possíveis contaminantes não distorceram os nossos achados clínicos.

A DLS, é uma técnica que usa um laser para determinar o tamanho e a distribuição de nanopartículas de uma solução. É uma técnica sensível, capaz de distinguir partículas de 10nm – 1.000nm. Sua funcionalidade é baseada no fato de que as partículas mais leves se fundem primeiro e que a velocidade de movimentação depende do tamanho das partículas presentes no concentrado. Apesar disso, a DLS

é considerada pouco específica, por só oferecer resultados referentes ao tamanho, distribuição e potencial zeta, não mostrando a origem das partículas ou características bioquímicas. Além disso, para concentrados heterogêneos, seu padrão de estabilidade é abreviado (CARNINO et al., 2019). Contudo, para o nosso estudo, mesmo com um concentrado heterogêneo, a DLS conseguiu mensurar as VEs, tendo resultado similar ao que encontramos na MET. Na literatura, estudos realizados com a leucemia mieloide também demonstram um concentrado heterogêneo, com partículas de 30nm – 1.000nm (KARGAR-SICHANI et al., 2023).

A nanocitometria de fluxo mede os sinais de fluorescência e a dispersão de luz em partículas únicas presentes em um fluxo. Sua alta sensibilidade permite caracterizar partículas, determinar a concentração, diâmetro e fenótipo, permitindo assim a identificação de sua origem (WELSH et al., 2020; VAN DER POL et al., 2020). Estudos indicam que as vesículas mais liberadas pelas células possuem diâmetro inferior a 200nm, com uma distribuição não homogênea, podendo apresentar um percentual maior em determinado tamanho (CHOI et al., 2019), resultado esse que corrobora com o que encontramos na nossa nanocitometria e na DLS. Nosso concentrado se mostrou positivo para anexina, presente nas membranas celulares e para CD9, sugestivo para endossomos, na literatura, o CD9 é amplamente caracterizado como um marcador de VEs, sendo relacionado com células endoteliais, células cancerígenas e um mau prognóstico para os pacientes (BRZOZOWSKI et al., 2018; NIGRI et al., 2022).

## **6.6 Identificação de HLA-G nas Vesículas Extracelulares**

### *6.6.1 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LLA-B*

Como descrevemos anteriormente, a sobrevida de pacientes com LLA-B foi potencializada nos últimos anos, isso se deve principalmente ao amplo conhecimento sobre a patologia, ao rápido diagnóstico e seu tratamento direcionado para o fator de risco. Contudo, ainda temos pacientes que não respondem ao tratamento e sofrem com recaídas, ou que possuem uma doença secundária com infiltração para o sistema nervoso central. Alguns estudos atribuem isso a VEs e sua capacidade de levar fatores metabolitos ou moduladores para outros sítios, propiciando a invasão dessas células cancerígenas (ERB, Ulrike et al., 2020).

No nosso estudo, identificamos que após o tratamento de indução os pacientes com LLA-B secretam menos VEs, mas proporcionalmente essas VEs expressam mais marcadores (como o HLA-G) quando comparadas com o diagnóstico. Além disso, as VEs liberadas pelas células leucêmicas podem modificar o nicho medular dos precursores hematopoiéticos (CD34<sup>+</sup>) favorecendo os precursores leucêmicos (GEORGIEVSKI et al., 2022). Neste trabalho identificamos que na doença residual mensurável, temos duas vezes mais a expressão de CD34<sup>+</sup> (Pvalue: 0,0137) amplamente associado a leucemia de células B, e a resistência quimioterápica. Ilustrando como as VEs podem atingir e comprometer um sistema hematopoiético saudável durante o desenvolvimento da leucemia.

#### 6.6.2 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LLA-T

Para a leucemia de células T, os efeitos moduladores das VEs foram caracterizados em estudos *in vitro*, sendo postulado como um proliferador das células alteradas e modulador do microambiente tumoral. Para os estudos *in vivo*, as VEs se mostraram prejudiciais a resposta imune antitumoral, suprimindo ou induzindo a apoptose as células TCD4<sup>+</sup> e as células TCD8<sup>+</sup> (ABU et al., 2022; GARGIULO et al., 2023). Para esse estudo, não obtivemos resultados estatisticamente significativos, contudo, assim como para a LLA-B, identificamos uma diminuição no número de VEs secretadas e um aumento na expressão de moléculas de superfície, principalmente para o CD9 e para o CD90, que em células T está relacionado a progressão do câncer e na ineficácia do tratamento quimioterápico (ZHANG et al., 2019).

#### 6.6.3 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes dos pacientes com LMA

Para a LMA sabemos que as VEs podem estar diretamente relacionadas com as alterações fisiológicas e patológicas no nicho medular, com o crescimento das células leucêmicas e com a fixação do clone leucêmico e conseqüentemente a recaída dos pacientes. Um estudo realizado *in vivo* demonstrou que as VEs liberadas pelas células leucêmicas mimetizam suas funções assim como as próprias células leucêmicas e são capazes de modular a hematopoiese (HUANG et al., 2021). Para além, assim como as VEs liberadas pelas células T, elas também podem suprimir a resposta antitumoral produzida pelas células TCD8<sup>+</sup> (PENG et al., 2021). Para este

trabalho não obtivemos resultados estatísticos significantes, contudo, é possível identificar que ao contrário das leucemias linfoides, na LMA nós temos um aumento no número de VES secretadas e uma diminuição na expressão dos marcadores utilizados.

#### *6.6.4 Identificação de HLA-G nas VEs provenientes de pacientes com leucemia aguda, ao diagnóstico e na doença residual mínima*

Embora nesse estudo não tenha sido possível identificar a assimetria entre a expressão das moléculas de superfície ao diagnóstico e na doença residual mensurável, entre as leucemias é possível constatar padrões de expressões diferentes, o que nos leva a supor que as VEs secretadas e avaliadas nesse estudo estão diretamente ligadas as células leucêmicas ou a células estromais que passaram por remodelações no nicho medular, devido a patologia.

É possível distinguir que os pacientes com LLA-T em comparação com as outras linhagens, secretam mais VEs ao diagnóstico e na DRM, que expressam mais HLA-G ao diagnóstico e na DRM e que na DRM esses pacientes super expressam os marcadores CD9 e CD90, resultado similar ao que encontramos nas células de outros pacientes. Para os pacientes com LLA-B nós temos um aumento de CD9, CD34 e CD45 ao diagnóstico, que se mantém na DRM, resultado também análogo ao perfil celular anteriormente avaliado. No que se refere aos pacientes com LMA, observamos que ao contrário do que encontramos nas células, não temos uma alta expressão do HLA-G, contudo, é possível constatar um aumento na expressão dos marcadores CD7 e CD90 ao diagnóstico e que se mantem na DRM.

## 7 CONCLUSÕES

Os desfechos parciais encontrados por esse trabalho piloto demonstram ser promissores para o estudo do microambiente medular e para a identificação de moléculas moduladoras, em células e em vesículas.).

Através do estudo com painéis, constatamos que para as células precursoras (CD45<sup>+</sup>) mesenquimais, endoteliais e *H stem cell*, não identificamos uma distinção entre a medula saudável e patológica. Para as moléculas de adesão CD44 e CD9 constatamos que elas podem auxiliar na fixação e na exacerbação do precursor do clone leucêmico no nicho medular. Para as moléculas HLA-G e PD1 observamos um aumento na expressão dessas moléculas, que pode ser sugestivo para uma participação na modulação na medula óssea e no escape do sistema imune, principalmente para as células mieloide.

Comparando os resultados obtidos entre as células e as vesículas, averiguamos que marcadores importantes como o CD9 e o HLA-G possuem expressões diferentes entre as células e as VEs, contudo, apesar do mesmo subtipo leucêmico, utilizamos pacientes diferentes em cada subgrupo. De forma geral, os resultados obtidos com as VEs nos mostram que existe uma assimetria nas vesículas e nos seus marcadores que podem estar diretamente ligadas as células leucêmicas e as VEs que elas secretam.

Deste modo, como perspectivas futuras, para a continuidade deste projeto, torna-se necessário a utilização de células frescas ao diagnóstico para padronizar e aumentar a viabilidade das células analisadas, realizar expansão do painel de marcação para 10 cores, adicionando mais anticorpos específicos para cada linhagem, possibilitando sua melhor distinção. E para as células precursoras que são raras, como mesenquimais e endoteliais, sugerimos a realização de uma cultura primária para aumentar o percentual delas, bem como aumentar o número de células marcadas e adquiridas.

Para as vesículas, faz-se necessário que na continuidade deste projeto utilizemos os mesmos pacientes para os painéis de células e de VEs, aumentando a rastreabilidade das moléculas e a compreensão de qual tipo celular ela está sendo secretada. Além de que, é imprescindível a utilização da nanocitometria para a distinção do tamanho da VEs e se essa característica interfere no prognóstico dos pacientes.



## REFERÊNCIAS

ABU, Nadiah; BAKARURRAINI, Nurul Ainaa Adilah Rus. The interweaving relationship between extracellular vesicles and T cells in cancer. **Cancer letters**, v. 530, p. 1-7, 2022.

AGUILAR-CAZARES, Dolores et al. Contribution of angiogenesis to inflammation and cancer. **Frontiers in oncology**, v. 9, p. 1399, 2019.

ALMEIDA, Renata et al. Cytokines and soluble HLA-G levels in bone marrow stroma and their association with the survival rate of patients exhibiting childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cytokine**, v. 102, p. 94-101, 2018.

ALSAAB, Hashem O. et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: mechanism, combinations, and clinical outcome. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 561, 2017.

ARANTES, Diego Antonio Costa et al. Evaluation of HLA-G, HLA-E, and PD-L1 proteins in oral osteosarcomas. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 123, n. 6, p. e188-e196, 2017.

ATTIA, Jiji VD et al. The molecular and functional characteristics of HLA-G and the interaction with its receptors: where to intervene for cancer immunotherapy?. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8678, 2020.

BARACHINI, Serena; GHELARDONI, Sandra; MADONNA, Rosalinda. Vascular Progenitor Cells: From Cancer to Tissue Repair. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 6, p. 2399, 2023.

BORELLA, Giulia et al. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 138, n. 7, p. 557-570, 2021.

BRAS, Anne E. et al. Quality Assessment of a Large Multi-Center Flow Cytometric Dataset of Acute Myeloid Leukemia Patients—A EuroFlow Study. **Cancers**, v. 14, n. 8, p. 2011, 2022.

BRZOZOWSKI, Joshua S. et al. Extracellular vesicles with altered tetraspanin CD9 and CD151 levels confer increased prostate cell motility and invasion. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 8822, 2018.

CANU, Giovanni; RUHRBERG, Christiana. First blood: the endothelial origins of hematopoietic progenitors. **Angiogenesis**, v. 24, n. 2, p. 199-211, 2021.

CARNINO, Jonathan M.; LEE, Heedoo; JIN, Yang. Isolation and characterization of extracellular vesicles from Broncho-alveolar lavage fluid: a review and comparison of different methods. **Respiratory research**, v. 20, p. 1-11, 2019.

CHEN, Cunte et al. Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2020.

CHENG, Hui; ZHENG, Zhaofeng; CHENG, Tao. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. **Protein & cell**, v. 11, n. 1, p. 34-44, 2020.

CHOI, Dongsic et al. Mapping subpopulations of cancer cell-derived extracellular vesicles and particles by nano-flow cytometry. **ACS nano**, v. 13, n. 9, p. 10499-10511, 2019.

CICIARELLO, Marilena et al. Emerging bone marrow microenvironment-driven mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia: tangle or chance?. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5319, 2021.

CIZMAR, Petr; YUANA, Yuana. Detection and characterization of extracellular vesicles by transmission and cryo-transmission electron microscopy. **Extracellular vesicles: methods and protocols**, p. 221-232, 2017.

CONTINI, P. et al. HLA-G expressing immune cells in immune mediated diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 1613, 2020.

COMAZZETTO, Stefano; SHEN, Bo; MORRISON, Sean J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. **Developmental cell**, v. 56, n. 13, p. 1848-1860, 2021.

COSSÍO, Itziar; LUCAS, Daniel; HIDALGO, Andrés. Neutrophils as regulators of the hematopoietic niche. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 20, p. 2140-2148, 2019.

DANDER, Erica et al. The bone marrow niche in b-cell acute lymphoblastic leukemia: The role of microenvironment from pre-leukemia to overt leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4426, 2021.

DA SILVA, IsteFani L. et al. New insights into the role of Qa-2 and HLA-G non-classical MHC-I complexes in malignancy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2894, 2018.

DEMIRCI, Selami; LEONARD, Alexis; TISDALE, John F. Hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells: Clinical potential, challenges, and future perspectives. **Stem cells translational medicine**, v. 9, n. 12, p. 1549-1557, 2020.

DENG, Wei et al. The regulatory role of exosomes in leukemia and their clinical significance. **Journal of International Medical Research**, v. 48, n. 8, p. 0300060520950135, 2020.

DE KRUIJF, Evert-Jan FM; FIBBE, Willem E.; VAN PEL, Melissa. Cytokine-induced hematopoietic stem and progenitor cell mobilization: unraveling interactions between stem cells and their niche. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1466, n. 1, p. 24-38, 2020.

DEVILLE, Sarah et al. Comparison of extracellular vesicle isolation and storage methods using high-sensitivity flow cytometry. **PLoS One**, v. 16, n. 2, p. e0245835, 2021.

DWIVEDI, Sanyog et al. CD38 and regulation of the immune response cells in cancer. **Journal of Oncology**, v. 2021, 2021.

ERB, Ulrike et al. The impact of small extracellular vesicles on lymphoblast trafficking across the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5491, 2020.

FARBER, Meike et al. Targeting CD38 in acute myeloid leukemia interferes with leukemia trafficking and induces phagocytosis. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 22062, 2021.

FILIPPONE, A. et al. PD1/PD-L1 immune checkpoint as a potential target for preventing brain tumor progression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 71, n. 9, p. 2067-2075, 2022.

FORCE, Lisa M. et al. The global burden of childhood and adolescent cancer in 2017: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 9, p. 1211-1225, 2019.

GARGIULO, Ernesto et al. Extracellular vesicle secretion by leukemia cells in vivo promotes CLL progression by hampering antitumor T-cell responses. **Blood cancer discovery**, v. 4, n. 1, p. 54-77, 2023.

GEORGIEVSKI, Aleksandra et al. Acute lymphoblastic leukemia-derived extracellular vesicles affect quiescence of hematopoietic stem and progenitor cells. **Cell Death & Disease**, v. 13, n. 4, p. 337, 2022.

GOMES, Ana Cordeiro; SARAIVA, Margarida; GOMES, Maria Salomé. The bone marrow hematopoietic niche and its adaptation to infection. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2021. p. 37-48.

GROS, Frédéric et al. Soluble HLA-G Molecules Are Increased during Acute Leukemia, Especially in Subtypes Affecting Monocytic and Lymphoid Lineages'. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 223-230, 2006.

GORDON, Jonathan AR et al. Identification of molecularly unique tumor-associated mesenchymal stromal cells in breast cancer patients. **Plos one**, v. 18, n. 3, p. e0282473, 2023.

GUTJAHR, Julia C. et al. CD44 engagement enhances acute myeloid leukemia cell adhesion to the bone marrow microenvironment by increasing VLA-4 avidity. **haematologica**, v. 106, n. 8, p. 2102, 2021.

HAN, Yanyan; LIU, Dandan; LI, Lianhong. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. **American journal of cancer research**, v. 10, n. 3, p. 727, 2020.

HERRMANN, Harald et al. Delineation of target expression profiles in CD34+/CD38- and CD34+/CD38+ stem and progenitor cells in AML and CML. **Blood advances**, v. 4, n. 20, p. 5118-5132, 2020.

HOUSHMAND, Mohammad et al. Bone marrow microenvironment: The guardian of leukemia stem cells. **World journal of stem cells**, v. 11, n. 8, p. 476, 2019.

HUANG, Dan et al. ANGPTL2-containing small extracellular vesicles from vascular endothelial cells accelerate leukemia progression. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, 2021.

HUGHES, Anastasia M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells in pre-B acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 11, p. 1005494, 2023.

HOSSAIN, Zakir et al. Development of the immune system in the human embryo. **Pediatric Research**, v. 92, n. 4, p. 951-955, 2022.

IANG, Yongshuai et al. PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 15, n. 5, p. 1111-1122, 2019.

IOANNOU, Nikolaos et al. Triggering interferon signaling in T cells with avadomide sensitizes CLL to anti-PD-L1/PD-1 immunotherapy. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 137, n. 2, p. 216-231, 2021.

JIMBU, Laura et al. Is there a place for PD-1-PD-L blockade in acute myeloid leukemia?. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 4, p. 288, 2021.

JUÁREZ-AVENDAÑO, Gerardo et al. Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. **Boletín médico del Hospital Infantil de México**, v. 78, n. 3, p. 159-170, 2021.

KARGAR-SICHANI, Yasaman et al. Effect of Acute Myeloid Leukemia-derived Extracellular Vesicles on Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells: Expression of Poor Prognosis Genes. **Archives of medical research**, v. 54, n. 2, p. 95-104, 2023.

KAYA, Zühre et al. Prognostic role of serum cytokines and soluble HLA-G levels in children with leukemia who undergo allogeneic stem cell transplantation. **Cytokine**, v. 153, p. 155869, 2022.

KIHIRA, Kentaro et al. Close interaction with bone marrow mesenchymal stromal cells induces the development of cancer stem cell-like immunophenotype in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells. **International Journal of Hematology**, v. 112, p. 795-806, 2020.

KIM, Sehui et al. High tumoral PD-L1 expression and low PD-1+ or CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of a poor prognosis in primary diffuse large B-cell lymphoma of the central nervous system. **Oncoimmunology**, v. 8, n. 9, p. e1626653, 2019.

KRIJGSMAN, Daniëlle et al. HLA-G: a new immune checkpoint in cancer?. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 12, p. 4528, 2020.

KUMAR, Atul et al. Multiple roles of CD90 in cancer. **Tumor Biology**, v. 37, n. 9, p. 11611-11622, 2016.

LAI, Peilong et al. Novel insights into MSC-EVs therapy for immune diseases. **Biomarker research**, v. 7, p. 1-10, 2019.

LEPUCKI, Arkadiusz et al. The role of extracellular matrix proteins in breast cancer. **Journal of Clinical Medicine**, v. 11, n. 5, p. 1250, 2022.

LEUNG, Susan, Wai Sum; SHI, Yi. The glycolytic process in endothelial cells and its implications. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 43, n. 2, p. 251-259, 2022.

LI, Huilin et al. Arterial endothelium creates a permissive niche for expansion of human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2020.

LIM, Bora; LIN, Yiyun; NAVIN, Nicholas. Advancing cancer research and medicine with single-cell genomics. **Cancer cell**, v. 37, n. 4, p. 456-470, 2020.

LIN, Aifen; YAN, Wei-Hua. HLA-G/ILTs Targeted Solid Cancer Immunotherapy: Opportunities and Challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 2568, 2021

LINS, Mecneide Mendes et al. Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. **Pediatric blood & cancer**, v. 64, n. 8, p. e26391, 2017.

LINS, Mecneide Mendes et al. Survival and risk factors for mortality in pediatric patients with acute myeloid leukemia in a single reference center in low–middle-income country. **Annals of Hematology**, v. 98, p. 1403-1411, 2019.

LIU, Yongliang et al. CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia. **Stem cell research & therapy**, v. 12, p. 1-13, 2021.

LORICO, Aurelio et al. CD9, a tetraspanin target for cancer therapy?. **Experimental biology and medicine**, v. 246, n. 9, p. 1121-1138, 2021.

LÖTVALL, Jan et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 3, n. 1, p. 26913, 2014.

LU, R.-Q. et al. PF166 Rasd1 inhibits the proliferation of leukemia cells and correlates with leukemia relapse in adults with philadelphia chromosome-negative B-cell acute lymphoblastic leukemia. **HemaSphere**, v. 3, n. S1, p. 35, 2019.

MANNINO, Giuliana et al. Adult stem cell niches for tissue homeostasis. **Journal of Cellular Physiology**, v. 237, n. 1, p. 239-257, 2022.

MAYANI, Hector et al. Cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. **Archives of Medical Research**, 2022.

MESQUITA JÚNIOR, Danilo et al. Immune system-part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, p. 552-580, 2010.

MIAO, Runfeng et al. Hematopoietic stem cell niches and signals controlling immune cell development and maintenance of immunological memory. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 600127, 2020.

MIZIA-MALARZ, Agnieszka et al. Can CD34+ CD38-lymphoblasts, as likely leukemia stem cells, be a prognostic factor in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in children?. **Frontiers in Pediatrics**, v. 11, p. 1213009.

MUDGAPALLI, Nithya et al. The role of exosomes and MYC in therapy resistance of acute myeloid leukemia: challenges and opportunities. **Molecular aspects of medicine**, v. 70, p. 21-32, 2019.

NG, Chun-Yi; CHEUNG, Christine. Origins and functional differences of blood endothelial cells. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2023.

NIAZI, Vahid et al. Communication between stromal and hematopoietic stem cell by exosomes in normal and malignant bone marrow niche. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 132, p. 110854, 2020.

NIGRI, Jérémy et al. CD9 mediates the uptake of extracellular vesicles from cancer-associated fibroblasts that promote pancreatic cancer cell aggressiveness. **Science Signaling**, v. 15, n. 745, p. eabg8191, 2022.

NIEUWLAND, Rienk et al. Reproducibility of extracellular vesicle research. **European journal of cell biology**, v. 101, n. 3, p. 151226, 2022.

NIKISHIN, Igor et al. ScanEV—a neural network-based tool for the automated detection of extracellular vesicles in tem images. **Micron**, v. 145, p. 103044, 2021.

OLEJARZ, Wioletta et al. Exosomes in angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5840, 2020.

OMAR, Abdallah A. et al. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, v. 34, n. 1, p. 25, 2022.

OMRAN, A. A. et al. CD44 and CD44 Variant 6 in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Cancer Sci Ther**, v. 7, p. 375-378, 2015.

ONDRUŠŠEK, Róbert et al. Prognostic value and multifaceted roles of tetraspanin CD9 in cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p. 1140738, 2023.

PARK, Chun Shik et al. Stromal-induced epithelial-mesenchymal transition induces targetable drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. **Cell reports**, v. 42, n. 7, 2023.

PATSOUKIS, Nikolaos et al. Revisiting the PD-1 pathway. **Science advances**, v. 6, n. 38, p. eabd2712, 2020.

PEDROSA, Francisco et al. Reduced-dose intensity therapy for pediatric lymphoblastic leukemia: long-term results of the Recife RELLA05 pilot study. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 135, n. 17, p. 1458-1466, 2020.

PENG, Meixi et al. Tumour-derived small extracellular vesicles suppress CD8+ T cell immune function by inhibiting SLC6A8-mediated creatine import in NPM1-mutated acute myeloid leukaemia. **Journal of extracellular vesicles**, v. 10, n. 13, p. e12168, 2021.

PINHEIRO, Lucio Henrique Sousa et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia and its relationship with prognosis and survival: a systematic review and meta-analysis. **International journal of hematology-oncology and stem cell research**, v. 14, n. 4, p. 274, 2020.

POUPARDIN, Rodolphe; WOLF, Martin; STRUNK, Dirk. Adherence to minimal experimental requirements for defining extracellular vesicles and their functions. **Advanced drug delivery reviews**, v. 176, p. 113872, 2021.

QIAO, Zhi et al. Cancer Cell Derived Small Extracellular Vesicles Contribute to Recipient Cell Metastasis Through Promoting HGF/c-Met Pathway\*[S]. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 18, n. 8, p. 1619-1629, 2019.

RAVALET, Noémie et al. Modulation of bone marrow and peripheral blood cytokine levels by age and clonal hematopoiesis in healthy individuals. **Clinical Immunology**, p. 109730, 2023.

RIBEIRO-FILHO, Antonio Carlos et al. Traditional and advanced cell cultures in hematopoietic stem cell studies. **Cells**, v. 8, n. 12, p. 1628, 2019.

RIKKERT, Linda Gerritdina et al. Quality of extracellular vesicle images by transmission electron microscopy is operator and protocol dependent. **Journal of extracellular vesicles**, v. 8, n. 1, p. 1555419, 2019.

ROSSI, Elisa et al. Human endothelial colony forming cells express intracellular CD133 that modulates their vasculogenic properties. **Stem cell reviews and reports**, v. 15, p. 590-600, 2019.

SAUZAY, Chloé et al. CD90/Thy-1, a cancer-associated cell surface signaling molecule. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 7, p. 66, 2019.

SCHWICH, Esther et al. Soluble HLA-G and HLA-G bearing extracellular vesicles affect ILT-2 positive and ILT-2 negative CD8 T cells complementary. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 2046, 2020.

SENDKER, Stephanie; WAACK, Katharina; REINHARDT, Dirk. Far from health: The bone marrow microenvironment in aml, a leukemia supportive shelter. **Children**, v. 8, n. 5, p. 371, 2021.

SHAIKH, Muhammad Vaseem; KALA, Manika; NIVSARKAR, Manish. CD90 a potential cancer stem cell marker and a therapeutic target. **Cancer Biomarkers**, v. 16, n. 3, p. 301-307, 2016.

SIMEONE, Pasquale et al. Extracellular vesicles as signaling mediators and disease biomarkers across biological barriers. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 7, p. 2514, 2020.

SPERTINI, Caroline et al. Acute myeloid and lymphoblastic leukemia cell interactions with endothelial selectins: critical role of PSGL-1, CD44 and CD43. **Cancers**, v. 11, n. 9, p. 1253, 2019.

SWETS, Marloes et al. HLA-G protein expression in colorectal cancer evaluated by immunohistochemistry and western blot analysis: Its expression characteristics remain enigmatic. **Clinical Immunology**, v. 194, p. 80-86, 2018.

SZATANEK, Rafał et al. The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1153, 2017.

TAMIRO, Francesco; WENG, Andrew P.; GIAMBRA, Vincenzo. Targeting leukemia-initiating cells in acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Research**, v. 81, n. 16, p. 4165-4173, 2021.

THÉRY, Clotilde et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018.

TIWARI, Swasti et al. Preparation and characterization of extracellular vesicles. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 85, n. 2, p. e13367, 2021.

VAN DER POL, Edwin; WELSH, Joshua A.; NIEUWLAND, Rienk. Minimum information to report about a flow cytometry experiment on extracellular vesicles: Communication from the ISTH SSC subcommittee on vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 20, n. 1, p. 245-251, 2022.

VAN DONGEN, J. J. M.; ORFAO, Alberto. EuroFlow: resetting leukemia and lymphoma immunophenotyping. Basis for companion diagnostics and personalized medicine. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1899-1907, 2012.

VASAN, Neil; BASELGA, José; HYMAN, David M. A view on drug resistance in cancer. **Nature**, v. 575, n. 7782, p. 299-309, 2019.

VERBEKE, D. et al. PF165 The xpoi inhibitor KPT-8602 works synergistic with dexamethasone to inhibit acute lymphoblastic leucemia cells. **HemaSphere**, v. 3, n. S1, p. 34-35, 2019.



WEIDLE, Ulrich H. et al. The multiple roles of exosomes in metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 2017.

WELSH, Joshua A. et al. MIFlowCyt-EV: A framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. **Journal of extracellular vesicles**, v. 9, n. 1, p. 1713526, 2020.

WITWER, Kenneth W. et al. Updating MISEV: Evolving the minimal requirements for studies of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 10, n. 14, p. e12182, 2021.

WUNDERLICH, Mark et al. PD-1 inhibition enhances blinatumomab response in a UCB/PDX model of relapsed pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 642466, 2021.

XU, Xi et al. PD-1 signalling defines and protects leukaemic stem cells from T cell receptor-induced cell death in T cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nature cell biology**, v. 25, n. 1, p. 170-182, 2023.

YANG, Shuo et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells promote myeloid-derived suppressor cell proliferation by secreting HLA-G to reduce acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. **Cytotherapy**, v. 22, n. 12, p. 718-733, 2020.

YAN, Wei et al. Extracellular vesicles carrying miRNA-181b-5p affects the malignant progression of acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2021.

YANG, Yuxi et al. Role of stem cell derivatives in inflammatory diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1153901, 2023.

YAO, Yiyi et al. Leukemia stem cell-bone marrow microenvironment interplay in acute myeloid leukemia development. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2021.

YI, Ming et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions. **Molecular cancer**, v. 21, n. 1, p. 28, 2022.

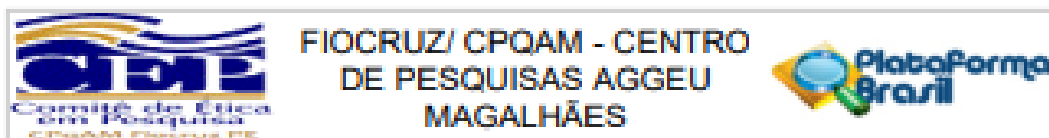
ZAKRZEWSKI, Wojciech et al. Stem cells: past, present, and future. **Stem cell research & therapy**, v. 10, n. 1, p. 1-22, 2019.

ZENG, Yang et al. CD90<sup>low</sup> MSCs modulate intratumoral immunity to confer antitumor activity in a mouse model of ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 10, n. 43, p. 4479, 2019.

ZHUANG, Baimei; SHANG, Jin; YAO, Yuanqing. HLA-G: An important mediator of maternal-fetal immune-tolerance. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 744324, 2021.

ZHU, Xinxin; LANG, Jinghe. Soluble PD-1 and PD-L1: predictive and prognostic significance in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 57, p. 97671, 2017.

## ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância.

**Pesquisador:** Norma Lucena Cavalcanti Lício da Silva

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 83186017.6.0000.5190

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.531.340

## Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto já avaliado e aprovado pelo CEP/CPQAM em 21 de março de 2011 com número de CAAE 0073.0.095.000-10. O referido projeto apresentou nesta ocasião a proposta: Esperamos, portanto, contribuir com o

conhecimento científico acerca da biologia desse câncer, através (1) da análise de polimorfismo no gene HLA-G e sua relação com a expressão de

HLA-G, da ocorrência da doença, e na resposta ao tratamento; (2) da determinação do nível de expressão das isoformas de HLA-G antes e após a

fase de indução da quimioterapia, com o objetivo de avaliar o potencial da molécula em identificar doença residual mínima e como marcador de

prognóstico, (3) da definição de possível dissociação entre a transcrição do gene HLA-G em mRNA e a tradução em proteína, importante mecanismo de controle da expressão a nível pós-transcricional; (4) da

análise do perfil de resposta imune estabelecido em função da expressão de HLA-G e a relação com o desfecho da doença.

## Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar o papel do polimorfismo genético e expressão do HLA-G nas doenças hematológicas da infância.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.531.340

#### Objetivo Secundário:

1 - Determinar o polimorfismo da seqüência genética do HLA-G em pacientes com leucemia e linfoma; Meta 1.1 – Sequenciar a região 3'UTR do gene HLA-G; Meta 1.2 – Determinar as freqüências alélicas dos sítios polimórficos; Meta 1.3 – Comparar as freqüências encontradas dos alelos com grupo controle de indivíduos saudios (já existente no laboratório) definindo a razão de odds de cada polimorfismo para leucemia/linfoma.

2 - Analisar o nível de expressão do mRNA de HLA-G nos casos de leucemia; Meta 2.1 – Determinar o nível de expressão relativa do mRNA das isoformas de HLA-G através de qPCR na amostra da medula óssea ao diagnóstico e após a etapa de indução do tratamento na crianças portadoras de leucemia linfoblástica aguda; Meta 2.2 – Comparar os níveis de expressão das isoformas de HLA-G antes e após a indução e relacionar os níveis de expressão e/ ou a diferença dos níveis nos dois momentos com variáveis clínicas e laboratoriais e o desfecho da leucemia; Meta 2.3 – Determinar o nível de expressão relativa do mRNA das isoformas de HLA-G através de qPCR na amostra de medula óssea ao diagnóstico de leucemia mielóide.

3 - Avaliar a expressão da proteína HLA-G em leucemias; Meta 3.1 – Avaliar a expressão da proteína HLA-G na superfície de células precursoras hematopoiéticas na medula óssea antes e após a indução através da citometria de fluxo; Meta 3.2 – Avaliar a expressão da proteína HLA-G secretada na medula óssea do paciente antes e após a indução através do Western blot ou ELISA; Meta 3.3 – Comparar a produção de proteína HLA-G secretada na medula óssea do paciente antes e após a indução, e relacionar os níveis de expressão com variáveis clínicas e laboratoriais e o desfecho da leucemia.

4 - Investigar a regulação da expressão do gene HLA-G; Meta 4.1 - Avaliar o perfil de citocinas (IL-10, IL-17 dentre outras) secretadas na medula óssea do paciente antes e após a indução, e relacionar com a expressão de HLA-G e dados clínicos e laboratoriais e de desfecho da leucemia.

#### Metodologia Proposta:

apresentaram níveis de expressão mais alto (72,9 +- 39,6ng/mL) em relação aos de LLA-B (49,6

<b>Endereço:</b> Av. Prof. Moraes Rego, s/nº	<b>CEP:</b> 50.670-420
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)2101-2639	<b>Fax:</b> (81)2101-2639
	<b>E-mail:</b> comiteetica@cpqam.fiocruz.br



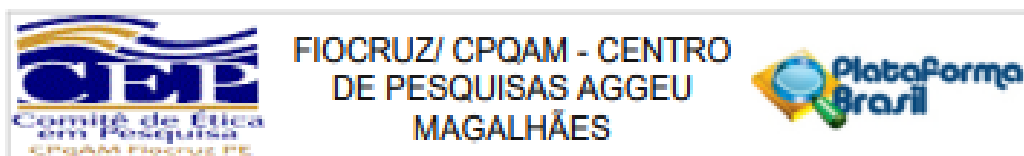
FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.531.343

+/- 24,6 ng/mL). Nesse estudo, os níveis elevados de sHLA-G mostrou-se relacionados a leucitose ( $p=0,01$ ) (Gros et al., 2006). Contudo, a presença da expressão de HLA-G nem sempre tem sido observada nas leucemias, como no relato de Yan et al (2008) que não encontrou expressão nas LLA-B, mas achou expressão entre 18 a 20% das LMA, leucemias mielóides crônicas (LMC) e Síndrome Mielodisplásica (SMD). Nesse estudo, a proporção de células produtoras de HLA-G em LMA (3,47-99,69%) foi superior aquela encontrada nas LMC (3,8-70%) e essa superior aquela vista nas SMD (8,8-13,8%). As LMA produtoras de HLA-G mostraram-se associadas a um aumento na percentagem de blastos (83,1 +/- 14,7%;  $p=0,01$ ) e a diminuição do total de linfócitos T (47,1 +/- 22,5%;  $p<0,05$ ) quando comparadas com as LMA não-produtoras de HLA-G (66,3 +/- 17,9% e 65 +/- 18%, respectivamente). A inibição exercida pelo HLA-G sob a lise celular foi confirmada por ensaios de citotoxicidade e restaurada com o uso de anticorpos anti-HLA-G de uma forma dose dependente quando comparadas com células não produtoras de HLA-G ( $p<0,01$ ) (Yan et al., 2008). O nível de expressão de HLA-G tem mostrado ser variável também na leucemia linfóide crônica da linhagem B em adultos. Pacientes com mais de 23% das células produtoras de HLA-G de superfície mostraram além do nível de expressão de sHLA-G no plasma ( $p=0,043$ ), a presença de imunossupressão humoral e celular, medida pelo nível de IgG sérico ( $p=0,042$ ), número total de células T ( $p=0,005$ ) e células CD4+ ( $p=0,016$ ) em relação aos pacientes portadores de células com baixa expressão de HLA-G. Em relação ao prognóstico, a sobrevida geral foi maior para os pacientes que apresentaram menor percentagem de células produtoras de HLA-G do que aquelas com expressão em mais de 23% das células (120 x 23 meses,  $p=0,001$ ) (Nuckel et al., 2009). Relatos sobre o papel do HLA-G em outras doenças infoproliferativas são mais escassos. Contudo, em um estudo foi mostrado um aumento de sHLA-G em 65% dos linfomas não-Hodgkin de células B (LNH-B, 50,26 +/- 34,66 ng/mL), e em 58% dos de células T (LNH-T, 54,92 +/- 52,16 ng/mL) em relação ao controle mais dois desvio padrão (28,6 ng/mL). Nesse estudo também foi investigado o nível de expressão de IL-6 e IL-10 que estavam elevados em

<b>Endereço:</b> Av. Prof. Moraes Rego, s/nº			
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária		<b>CEP:</b> 50.670-420	
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE		
<b>Telefone:</b> (81)2101-2639	<b>Fax:</b> (81)2101-2639	<b>E-mail:</b> comiteetica@cpqam.fiocruz.br	



Continuação do Parecer: 2.531.340

ambos LNH-B e LNH-T em relação ao controle ( $p < 0,0005$ ), sendo o aumento mais pronunciado no LNH-T. É sabido que HLA-G estimula a produção de IL-10 e outras citocinas típicas da resposta Th2, criando um microambiente inibitório nos casos de tumores sólidos. Contudo, não foi possível demonstrar uma correlação entre o aumento de sHLA-G com prognóstico (Sebtí et al., 2007). Um outro aspecto importante a considerar na regulação da expressão de HLA-G em pacientes em tratamento para leucemia é o uso de drogas demetiladoras de DNA, como inibidores da metiltransferase (5-aza-2'-deoxycytidine (AdC), nome comercial Decitabine). O mecanismo de ação desse tipo de droga é o silenciamento de genes envolvidos no ciclo celular, o que pode, por outro lado, aumentar a expressão de HLA-G, e, em consequência, favorecer as células tumorais a escapar do sistema imune. Uma das evidências a respeito foi o aumento de 10x na expressão de mRNA HLA-G encontrado na linhagem celular linfoblástica humana MT1 após tratamento com AdC em relação a expressão obtida com a linhagem parental TK5 (Polakova et al., 2008). De forma que, o monitoramento da expressão de HLA-G em pacientes sob tratamento com AdC pode identificar pacientes com menor risco para esse tratamento, permitindo o ajuste de protocolo quimioterápico. Da mesma forma, o monitoramento do nível de expressão de HLA-G nos pacientes submetidos a transplantes serve como ferramenta para avaliação da possível rejeição do enxerto, onde a melhor aceitação do enxerto guarda relação com expressão de HLA-G no enxerto e /ou no plasma (Ristich et al., 2006). Níveis de expressão podem distinguir pacientes transplantados que precisam de ajuste de dose do imunossupressor, mas também aqueles com HLA-G negativos que estão sob maior risco para rejeição e podem se beneficiar do uso de HLA-G como terapia suplementar.

4. Cenário da leucemia da criança em Recife O Serviço de Oncologia Pediátrica do hospital do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) atendeu nos últimos 5 anos 315 crianças entre 0 e 18 anos com diagnóstico de leucemia, sendo 75% LLA, 25% LMA, 6% LMC, e <1% bifenotípica ou não diferenciada. Das leucemias linfóides, 84% foram de células B, das quais 65% foram pré-pré-B e 32% pré-B. O tratamento quimioterápico das crianças no serviço do IMIP é direcionado a

Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/nº  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
 UF: PE Município: RECIFE  
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.531.343

classificação de risco baixo, intermediário e alto relacionados a probabilidade de recaída, que considera a idade ao diagnóstico, contagem de leucócitos em sangue periférico, a linhagem celular dos blastos, o tipo de translocação cromossômica, índice de DNA, presença de doença extramedular, acometimento do sistema nervoso central, resposta precoce ao tratamento e presença de doença residual mínima na medula óssea após indução da quimioterapia. As estatísticas do serviço com o protocolo RE-LLA adotado nos últimos 5 anos, onde a terapia é dirigida ao risco, mostra que a remissão completa ocorreu em 93% das leucemias; a taxa de recaída geral foi de 8,7%, sendo a de LLA-B (6,9%) menor que a de LLA-T (18,1%); na sua maioria a recaída ocorreu apenas na medula óssea (61%) ou no CNS (22%). A mortalidade ocorreu em 14% dos casos, sendo a infecção a principal causa de morte (76%). A sobrevida geral ficou em torno de 78% e comparáveis a países desenvolvidos, sendo as maiores taxas para o grupo de baixo risco (100%), seguidos pelo intermediário (89%) e alto risco (64%). Diante dos resultados animadores do protocolo RE-LLA, propomos ao diretor clínico do Serviço de Oncologia Pediátrica do hospital IMIP, estudar o papel do HLA-G em relação ao desfecho de leucemia nos pacientes atendidos no protocolo RELL, para isso iremos inicialmente avaliar a associação de polimorfismo no gene HLA-G na ocorrência e desfecho da leucemia; depois iremos quantificar a expressão de moléculas HLA-G e de citocinas na medula óssea (microambiente tumoral) em diferentes subtipos de leucemia pediátrica ao diagnóstico e após a indução da quimioterapia, quando é esperada a remissão completa dos blastos na medula – o que caracteriza a resposta precoce ao tratamento; desta forma esperamos avaliar se a expressão de HLA-G serve como marcador de resposta a tratamento e prognóstico.

Data de Submissão do Projeto: 19/12/2017 Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1047856.pdf Versão do Projeto: 1  
Página 4 de 7

Tamanho da Amostra no Brasil: 600

1 - Determinação do polimorfismo do gene HLA-G a partir de PCR seguida de sequenciamento de DNA; 2 - Quantificação da expressão de mRNA de

<b>Endereço:</b> Av. Prof. Moraes Rago, s/nº	<b>CEP:</b> 50.670-420
<b>Bairro:</b> Cidade Universitária	
<b>UF:</b> PE	<b>Município:</b> RECIFE
<b>Telefone:</b> (81)2101-2639	<b>Fax:</b> (81)2101-2639
<b>E-mail:</b> comiteetica@cpqam.fiocruz.br	



**FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES**



Continuação do Parecer: 2.531.340

HLA-G por PCR em tempo real;3 - Detecção da proteína HLA-G de superfície por citometria de fluxo;4 - Detecção da proteína HLA-G por western blot;5 - Detecção da proteína solúvel HLA-G (sHLA-G) por ELISA;6 - Detecção do perfil das citocinas por citometria de fluxo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não havia esse requisito obrigatório em 2011, no entanto a análise do método não identificou riscos aos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de grande relevância científica.

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

Termos apresentados.

**Recomendações:**

Deverá apresentar relatórios de continuidade ou de conclusão do referido projeto na forma de notificações.

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

A referida pesquisa foi aprovada na ocasião em que foi apresentada ao CEP/CPQAM. Por interesse da pesquisadora responsável, o mesmo está sendo inserido na Plataforma Brasil por se tratar de uma pesquisa ainda de grande repercussão e com desdobramentos atuais.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1047856.pdf	19/12/2017 14:37:18		Aceito
Outros	Norma_termo_de_responsabilidade.pdf	19/12/2017 14:35:58	Norma Lucena Cavalcanti Lício da Silva	Aceito

**Endereço:** Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

**Bairro:** Cidade Universitária

**CEP:** 50.670-420

**UF:** PE

**Município:** RECIFE

**Telefone:** (81)2101-2639

**Fax:** (81)2101-2639

**E-mail:** comiteetica@cpqam.fiocruz.br



FIOCRUZ/ CPQAM - CENTRO  
DE PESQUISAS AGGEU  
MAGALHÃES



Continuação do Parecer: 2.531.340

Outros	Norma_declaracao_de_relatorio.pdf	19/12/2017 14:35:00	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Valeria.pdf	19/12/2017 14:33:33	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Renan.pdf	19/12/2017 14:32:49	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Rafael.jpg	19/12/2017 14:32:21	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Pedrosa.pdf	19/12/2017 14:31:23	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Ester.pdf	19/12/2017 14:30:54	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Donadi.jpg	19/12/2017 14:30:32	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Participacao_Alessandra.pdf	19/12/2017 14:30:06	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Anuencia_USP_RP.jpg	19/12/2017 14:28:32	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Outros	Anuencia_IMIP.pdf	19/12/2017 14:28:04	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia_CPqAM.pdf	19/12/2017 14:27:42	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Proj_Leucemia_completo2011.doc	19/12/2017 14:26:53	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fev2011_aprovado_cep.doc	19/12/2017 14:24:06	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_consubstanciado_21_03_2011. pdf	19/12/2017 14:23:13	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_CEP_10.pdf	19/12/2017 14:22:11	Norma Lucena Cavalcanti Licio da Silva	Aceito

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

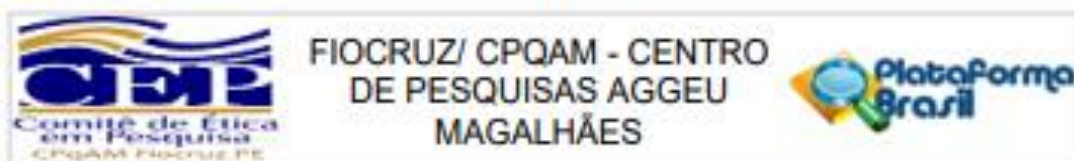
Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br





Continuação do Parecer: 2.531.340

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 07 de Março de 2018

---

**Assinado por:**  
Janaina Campos de Miranda  
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº  
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420  
UF: PE Município: RECIFE  
Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br

## ANEXO B- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Ministério da Saúde

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadora responsável: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde. Endereço: Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420. Tel: 21012618, 99623975.

Nós gostaríamos de convidar o Sr(a) ..... a participar da pesquisa intitulada "**Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância**" na condição de responsável legal pelo menor .....

Essa pesquisa tem por objetivo estudar a variação da resposta do organismo do paciente a leucemia na infância, estudando moléculas de defesa encontrada no nosso corpo.

A participação do menor consistirá em autorizar o uso das informações sobre a doença e condições de vida do paciente contidas no prontuário e banco de dados do hospital, além do uso de amostras de sangue da medula já coletados nos exames de rotina do Serviço de Oncologia Pediátrica do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira. Gostaria de informar que para esse estudo não será necessária nenhuma outra coleta de amostra.

Esclarecemos que os resultados desse estudo poderão não beneficiá-lo diretamente, mas certamente contribuirão para o entendimento de doença e melhoria de tratamento futuro; e que os resultados desse estudo serão divulgados com a garantia de sigilo sobre a identidade dos participantes.

O senhor (a) estará livre para interromper a autorização de participação do menor nesse estudo a qualquer momento sem que haja nenhum constrangimento ou prejuízo do tratamento dele.

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz do Ministério da Saúde, e qualquer dúvida poderei contactar o pesquisador responsável pelo telefone acima.

Sendo assim, autorizo, como responsável legal do menor, a participação do mesmo como voluntário não remunerado estando ciente dos riscos e benefícios conforme esclarecimento acima; e desta forma assino o presente termo em duas vias ficando uma sob a minha guarda e a outra com o pesquisador responsável.

Recife, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Responsável legal do menor

\_\_\_\_\_  
1º testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

## APÊNDICE A – ARTIGO A SER SUBMETIDO

### Padrão de expressão de moléculas imunomoduladoras em pacientes pediátricos com leucemias agudas

NASCIMENTO, IDSd; SANTOS, RSN; LUCENA-SILVA, N.

#### RESUMO:

As leucemias são um grupo de neoplasias hematológicas, caracterizadas pela expansão clonal de células progenitoras hematopoiéticas na medula óssea. A expansão dessas células disfuncionais pode ser impelida por diversos fatores como moléculas, citocinas e vesículas, que vão propiciar um ambiente favorável para o escape imune. Contudo, a correlação da expressão dessas moléculas com seus possíveis efeitos e com a continuidade da leucemia ainda não estão bem elucidados. Neste estudo, avaliamos 20 pacientes pediátricos com diagnóstico de leucemias agudas. Identificamos uma maior expressão do PD1 em pacientes com leucemias linfóides -LLA- (Pvalue:0,0089), com maior percentagem para os pacientes com LLA-B, além disso, encontramos uma maior expressão de PD-L1 em pacientes com LLA-T (Pvalue:0,0506). Não encontramos resultados relevantes do HLA-G para os pacientes com LLA. Para os pacientes com LMA, em comparação com o grupo controle foi possível constatar um aumento na expressão do HLA-G, PD1 e PD-L1 para os dois subgrupos, LMA geral e LMA-M3 e nos dois gates do CD45. Entretanto, apesar do aumento na expressão do PD-L1, não obtivemos resultados estatísticos.

#### INTRODUÇÃO:

As leucemias originam-se de lesões genéticas ou epigenéticas em células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e células progenitoras linfóides/mielóides, resultando em expansão clonal e acúmulo desordenado de células indiferenciadas e disfuncionais na medula óssea e no sangue periférico (LINS et al., 2017). Acredita-se que, assim como a maturação hematopoiética, essa fixação clonal leucêmica seja regulada por fatores extrínsecos e intrínsecos, como fatores de crescimento, moléculas de adesão, citocinas, VEs e moléculas imunomoduladoras (FORCE et al., 2019).

As moléculas imunomoduladoras recebem essa classificação com base na sua capacidade de atuar nos mecanismos imunológicos para estimular ou inibir respostas naturais e/ou específicas. As vias de ligação PD1/PD-L1 (receptor e ligante de morte programada) e o HLA-G e enquadram-se nesta categoria, uma vez que atuam no checkpoint imunológico, participando da quebra da homeostasia, promovendo assim o crescimento tumoral e o escape das células cancerígenas do sistema imunológico saudável (SWETS et al., 2018; ATTIA et al., 2020).

As células tumorais podem evidenciar múltiplas estratégias imunorreguladoras que lhes permitem escapar ou resistir às respostas imunes antitumorais, o que pode impactar negativamente o prognóstico e a sobrevivência do paciente. Porém, ainda não é possível elucidar todas as questões sobre as moléculas reguladoras, como a origem da sua expressão, as funções dos diferentes sítios e a correlação de sua expressão com os efeitos no sistema imunológico e na continuidade da malignidade, portanto, enfatizando esta rede de interações a investigação é crucial.

## MÉTODOS:

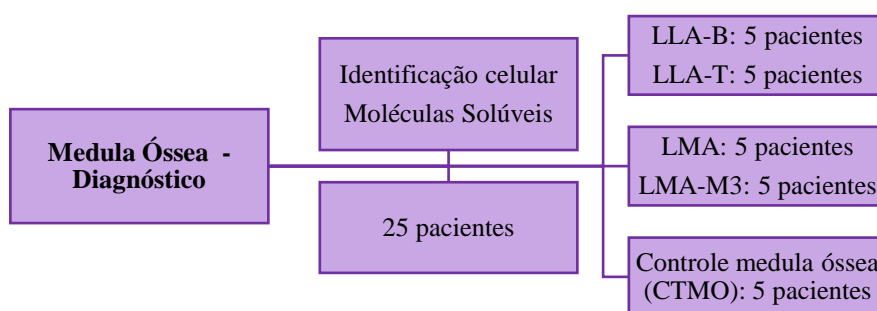
### Considerações éticas

Esse trabalho é integrante de um projeto maior em andamento no grupo, intitulado: “Atividade regulatória da molécula HLA-G nas leucemias da infância” (CAAE:83186017.6.0000.5190) que visa esclarecer a diferença nos níveis de HLA-G entre as leucemias mieloides e linfoides.

### Desenho e população de estudo

Este estudo é experimental e descritivo, sendo a nossa população de estudo composta por 25 pacientes menores de 22 anos atendidas em um hospital de referência em Recife, Pernambuco. As amostras foram obtidas a partir da rotina clínica diagnóstica.

Fluxograma 1 - Desenho da nossa população de estudo.



Fonte: A autora, 2023.

### Isolamento das células do microambiente medular

As células foram obtidas após a separação dos componentes da medula óssea por centrifugação, através do gradiente de densidade estabelecido pelo Ficoll-

Hystopaque e centrifugado mais uma vez a 1,500xg por 10min a 4°C. Posteriormente, realizamos a contagem e congelamento de  $5 \times 10^6$  das células, com 70% de meio RPMI, 20% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido), sendo armazenamos no freezer -80°C.

Após descongeladas essas células foram submetidas verificação da viabilidade com marcação com 7AAD (7-Aminoactinomicina D), um composto químico fluorescente com afinidade para o DNA. Para o controle da nossa viabilidade e padronização do gate, definimos que as células mortas (positivas para o 7AAD) se encontram após a marca de  $10^4$ , possibilitando a retirada na análise.

### **Citometria de Fluxo para avaliação das moléculas solúveis no microambiente medular**

O perfil da expressão das moléculas moduladoras (HLA-G, PD1, PD-L1) nas células foi avaliado através da utilização de um painel de anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, EUA -BD e Beckman Coulter Life Sciences -BC), estabelecido pelo grupo com o objetivo de identificar antígenos de diferenciação específicos nas linhagens celulares na medula fisiológica e patológica (quadro 1).

Quadro 1- Painel de mapeamento para as moléculas moduladoras.

Painéis	Marcadores							
	FITC	PE	Percp5.5	PEcy7	APC	APC-H7	V450	V500
<b>Tubo 2</b>	CD90	HLA-G	PD1	CD13	PD-L1	CD19	CD9	CD45
<b>Clone</b>	(5E10)	(MEMG/9)	(PD1.3)	(L138)	(PD-L1)	(J3-119)	(M-L13)	(2D1)

A fluorescência foi mensurada no citometro FACSCanto II (Becton Dickson, San Jose, EUA), sendo realizada a aquisição de  $1-5 \times 10^5$  de eventos para cada tubo. Os dados foram analisados utilizando o software Kaluza, Beckman Coulter Life Sciences.

### **Fluxograma de Análise**

Estabelecemos os gates inicialmente através do CD45, definidos em CD45high/alta, CD45low/baixa expressão e CD45negativo. Para este trabalho as nossas análises consideram apenas o CD45low/baixa expressão e o CD45negativo, porque o CD45high é característico de linfócitos maduros normais e a sua inclusão representaria um viés na análise com a inserção de falsos positivos.

Posteriormente, os resultados foram descritos em valor percentual de células positivas ou negativas para determinado anticorpo. Sendo a sua intensidade de expressão determinado pelos valores medianos das fluorescências. Todas as análises compararam os resultados entre os grupos controle/linfoide e controle/mieloide. Dessa forma, os resultados estão dispostos de maneira que se torna possível identificar as modulações exercidas pelas moléculas em cada linhagem.

### **Análise estatística**

Os dados foram descritos utilizando média ou mediana para variáveis contínuas e percentagens para as categóricas. Os valores médios das medianas de fluorescência para cada marcador em cada população isolada foram comparadas nas amostras ao diagnóstico e controle. Os valores de expressão das moléculas solúveis foram correlacionados ao resultado da primeira DRM pela citometria de fluxo, e ao desfecho clínico (óbito, recaída, remissão completa, resistência ao tratamento e ocorrência de segunda neoplasia). Os resultados de expressão de moléculas alvos foram analisados com o software GraphPad Prism V5.0, considerando  $P < 0,05$  como significativo. Foi usado teste Kruskal-Wallis para 2 ou mais grupos.

## **RESULTADOS:**

### **Descrição demográfica da população estudada**

Participaram deste estudo 25 pacientes, divididos em 5 pacientes controles e 20 pacientes com diagnóstico de Leucemia Aguda. Dentre as características antropométricas da nossa população de estudo (tabela 1), encontramos maior proporção de meninos acometidos para os pacientes da linhagem linfoide e de meninas acometidas para a linhagem mieloide. Por idade, a população distribuiu-se entre crianças com 1 ano até os 22 anos, sendo esse paciente com maior idade uma recaída atendida no setor pediátrico.

Os fatores de risco são determinados por achados genéticos. Entre os pacientes com LLA-B, 40% tiveram bom prognóstico (t12; 21), 40% tiveram mau prognóstico (t1; 19 e t9; 22) e apenas 20% tiveram prognóstico intermediário. Não há alterações genéticas. Nos pacientes com LLA-T, 80% dos pacientes não apresentam alterações genéticas (considerando as alterações testadas) e 20% apresentam t10;14

(oncogene Hox11), cada um deles associado a um prognóstico moderadamente favorável. Nos pacientes com LMA, 60% dos pacientes estudados não apresentavam alterações genéticas, correspondentes a um prognóstico intermediário e 40% tinham um bom prognóstico (inv16 e t8;21). No subgrupo M3, os pacientes t15;17 estão associados a um bom prognóstico.

Tabela 1– Perfil antropométrico e molecular da população de estudo.

<b>Leucemias=</b>	<b>LLA-B</b>	<b>LLA-T</b>	<b>LMA</b>	<b>LMA-M3</b>
N/=	5	5	5	5
<b>Características</b>				
<b>Sexo</b>				
Masculino	3 (60%)	5(100%)	2(40%)	2(40%)
Feminino	2 (40%)	0(0%)	3(60%)	3(60%)
<b>Idade (em anos)</b>				
Min – Max	1-6	7-22	6-17	10-17
Média (desvio)	3,20 (1,92)	14,0 (5,79)	12,4 (4,04)	13,6(2,88)
Mediana	3	15	13	13
<b>Alteração Gênica</b>				
Sem alterações	1(20%)	4(80%)	3(60%)	-
t(1;19)	1(20%)	-	-	-
t(8;21)	-	-	1(20%)	-
t(9;22)	1(20%)	-	-	-
t(12;21)	2(40%)	-	-	-
t(15;17)	-	-	-	5(100%)
Hox11	-	1(20%)	-	-
Inv16	-	-	1(20%)	-
<b>Fator de Risco</b>				
Favorável	2(40%)	1(20%)	2(40%)	5(100%)
Intermediário	1(20%)	4(80%)	3(60%)	-
Desfavorável	2(40%)	-	-	-

Fonte: A autora, 2023.

As alterações laboratoriais incluem aumento da contagem de leucócitos, diminuição da hemoglobina e do hematócrito e alterações plaquetárias. Além disso, o aumento da lactato desidrogenase (DHL) em danos teciduais está diretamente ligado ao colapso do tumor e à doença aguda. Considerando a classificação morfológica da FAB pelo mielograma (Tabela 2), a contagem média de blastos foi maior nos pacientes com LLA-B (84,4%) e menor nos pacientes com LMA (49,4%), sendo semelhante entre os pacientes com LLA-T e LMA-M3. A média do percentual de granulócitos é menor para a linhagem LLA-B em comparação com as demais linhagens, sendo a

média do percentual de eritroblastos semelhantes entre as linhagens LLA-B, LLA-T e LMA-M3 e maior para LMA.

Tabela 2– Variáveis clínico-laboratoriais e perfil morfológico.

<b>Características</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b>	<b>Mediana</b>
<b>Variáveis Clínicas</b>					
<b>LLA-B</b>					
Leucometria (uL)	9.000	47.100	21.520	15.459,85	18.400
Hemoglobina(g/dL)	8,00	10	8,82	0,57	9
Hematocrito (%)	25,70	29	27,34	1,11	28
Plaqueta (uL)	11.000	54.000	26.500	20.108,04	20.500
DHL (U/L)	340	2.457	982,6	854,84	767
<b>LLA-T</b>					
Leucometria (uL)	6.900	507.000	125.760	213.985,24	41.700
Hemoglobina(g/dL)	5,6	15	9,62	3,78	10
Hematocrito (%)	17,5	46	29,16	11,18	30
Plaqueta (uL)	13.000	266.000	143.000	103.109,17	174.000
DHL (U/L)	254	2.271	873,40	837,73	536
<b>LMA</b>					
Leucometria (uL)	3.600	36.200	14.420	12.369,3	9.800
Hemoglobina(g/dL)	6,8	10	8,62	1,47	9
Hematocrito (%)	21	31	25,88	4,17	26
Plaqueta (uL)	18.000	163.000	67.000	57.000	42.000
DHL (U/L)	160	2.460	794,8	944,42	473
<b>LMA-M3</b>					
Leucometria (uL)	2.100	14.100	5.880	4.999,20	3.600
Hemoglobina(g/dL)	5	11	8,4	2,21	9
Hematocrito (%)	15,5	32	25,34	6,16	28
Plaqueta (uL)	10.000	56.000	23.600	18.528,36	16.000
DHL (U/L)	170	584	316,8	136,66	268
<b>Variáveis Morfológicas</b>					
<b>LLA-B</b>					
Eritroblastos%	0	13	3,4	5,41	1
Granulócitos%	0	6	1,6	2,51	1
Linfócitos%	4	22	10,6	7,67	6
Blastos%	75	93	84,4	8,76	85
Megacariócitos					
Ausente=	3 (60%)				
Presente-normal=	2 (40%)				
<b>LLA-T</b>					
Eritroblastos%	1	6	3,0	2,12	3
Granulócitos%	0	47	15,6	20,84	4



Linfócitos%	2	29	11,2	10,38	8
Blastos%	18	91	70,2	30,24	85
Megacariócitos					
Ausente=	3(60%)				
Presente-baixo=	2(40%)				

**LMA**

Eritroblastos%	3	24	11,6	7,8	9
Granulócitos%	4	43	23,0	16,45	25
Linfócitos%	6	21	10,8	6,14	8
Blastos%	35	81	49,4	19,17	40
Plasmáticas%	1	2	1,33	0,58	1
Megacariócitos					
Ausente=	1(20%)				
Presente-baixo=	4(80%)				

**LMA-M3**

Eritroblastos%	1	9	4,75	3,5	5
Granulócitos%	6	19	10,25	5,97	8
Linfócitos%	3	9	6,25	2,75	7
Blastos%	52	87	72,2	13,54	70
Megacariócitos					
Presente-alto=	2(40%)				
Presente-baixo=	3(60%)				

---

Fonte: A autora, 2023.

Nota: Variáveis utilizadas para a classificação de risco de pacientes pediátricos com diagnóstico leucêmico, atendidos no IMIP.

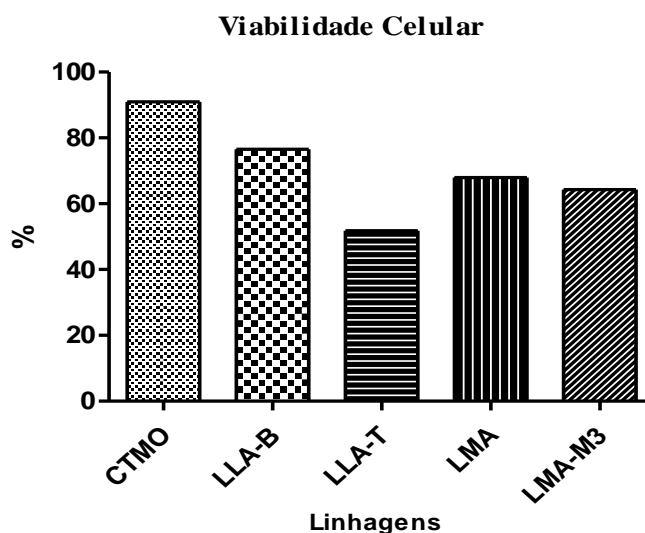
Em relação à recidiva, em pacientes com LLA-B, apenas 1 paciente (20%) apresentou recidiva e teve bom prognóstico. Entre os 5 pacientes com LLA-T, 3 (60%) recidivaram, dos quais 2 (40%) tiveram prognóstico intermediário e 1 (20%) teve bom prognóstico. Para a linhagem mieloide, apenas 1 paciente (20%) foi subtipo M3 recaiu. No decorrer e até o término deste trabalho, nenhum paciente veio a óbito.

**Isolamento e inspeção da viabilidade celular**

Após descongeladas e submetidas a marcação com o 7AAD, identificamos que todos os grupos apresentaram viabilidade acima de 50% (figura 1), sendo a melhor viabilidade apresentada pelo grupo controle com média de 90,96%, seguidos da LLA-B com 76,53%, LMA com 67,92%, LMA-M3 com 64,32% e por último pela LLA-T com 51,82%.

Figura 1: Viabilidade celular dos grupos analisados.

	CTMO	LLA-B	LLA-T	LMA	LMA-M3
Min-Max	82,93 - 95	43,93 – 88	15,77 - 93	17,71 – 92	18,3 – 93
Média	90,96	76,53	51,82	67,92	64,32
Desvio	4,61	18,73	33,99	30,13	28,43
Mediana	92	85	49	81	69



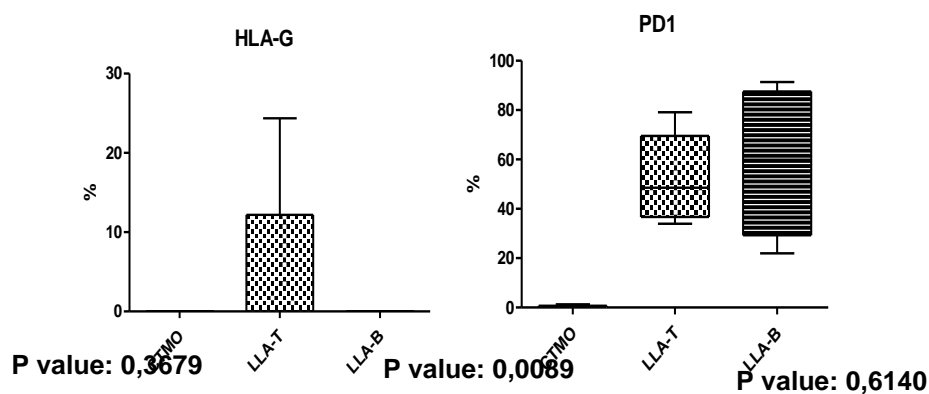
Fonte: A autora, 2023.

### **Avaliação das moléculas imunomoduladoras em pacientes com leucemia Linfoide**

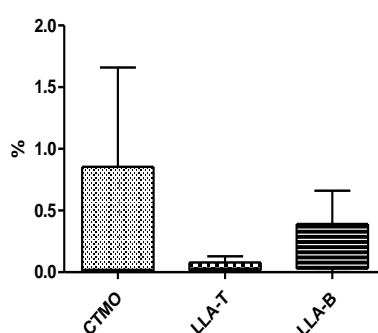
Para as moléculas moduladoras avaliadas (HLA-G, PD1 e PD-L1), constatamos um aumento na expressão do HLA-G para os pacientes com LLA-T, e uma diminuição na expressão do ligante PD-L1 nos pacientes leucêmicos. Contudo, apenas o marcador de morte programada, PD1, apresentou resultados estatisticamente promissores para ambas as leucemias linfoides (figura 2), sendo mais expresso nos pacientes com LLA-B.

Figura 2- LLA: Identificação de moléculas moduladoras a partir da análise do CD45<sup>+</sup>. No bloco I podemos visualizar os gráficos referentes as moléculas HLA-G, PD1 e PD-L1. No bloco II identificamos os gráficos referentes ao PD1.

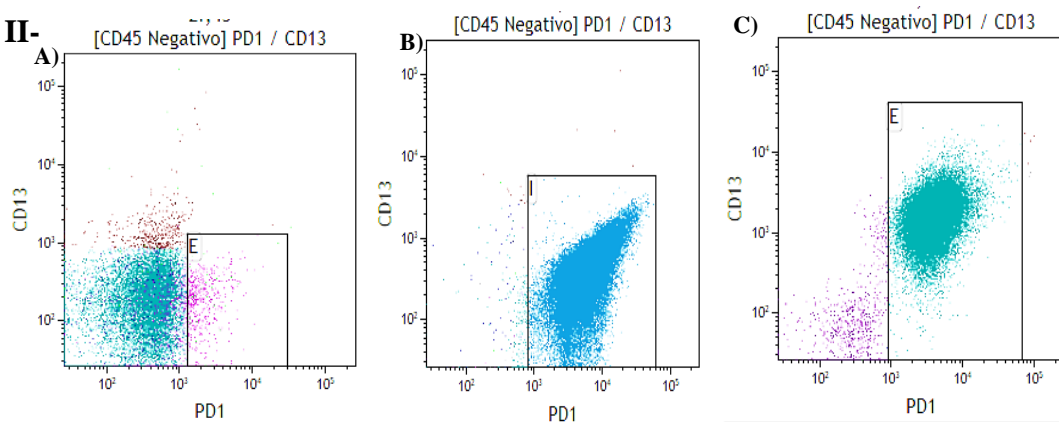
I-



PD-L1



II-

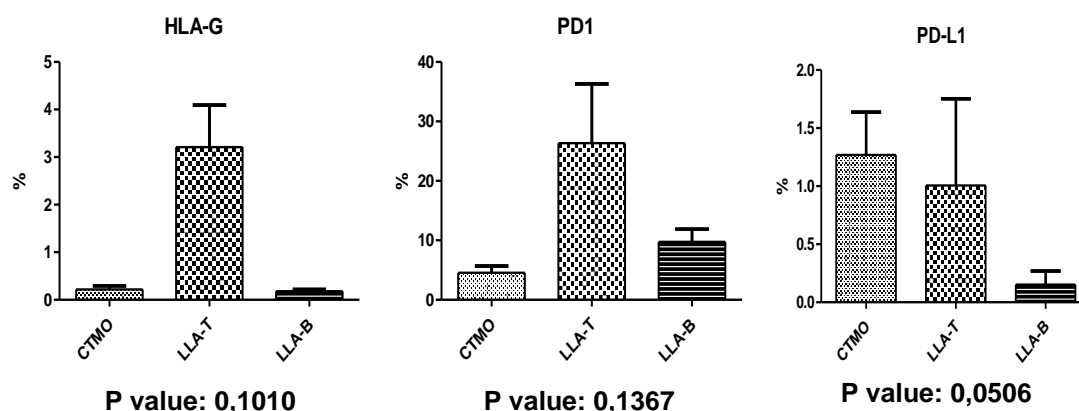


Fonte: A autora, 2023.

Nota: Expressão mensurada na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico. No bloco II, nos gráficos A verificamos células residentes da medula normal de crianças saudáveis; nos gráficos B são da leucemia de células B e nos gráficos C de leucemia de células T.

Para a análise a partir do CD45<sup>low</sup>, identificamos um aumento na média percentual para as moléculas HLA-G e PD1 nos pacientes com a leucemia de células T, e uma diminuição na média percentual para os pacientes com leucemia de células B, com enfoque também para o ligante PD-L1. Contudo, para ambos os casos, não obtivemos resultados estatisticamente relevantes.

Figura 3- LLA: Identificação de moléculas moduladoras a partir da análise do CD45<sup>-/+</sup>.



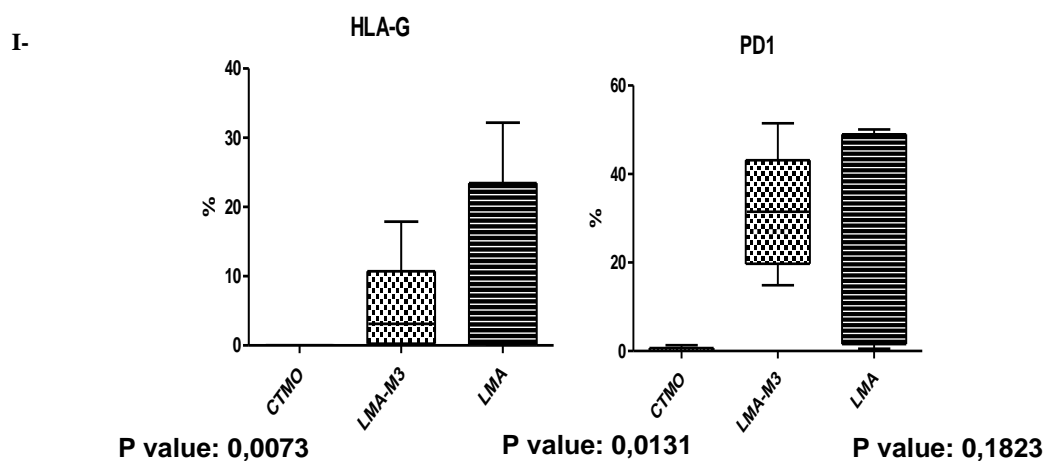
Fonte: A autora, 2023.

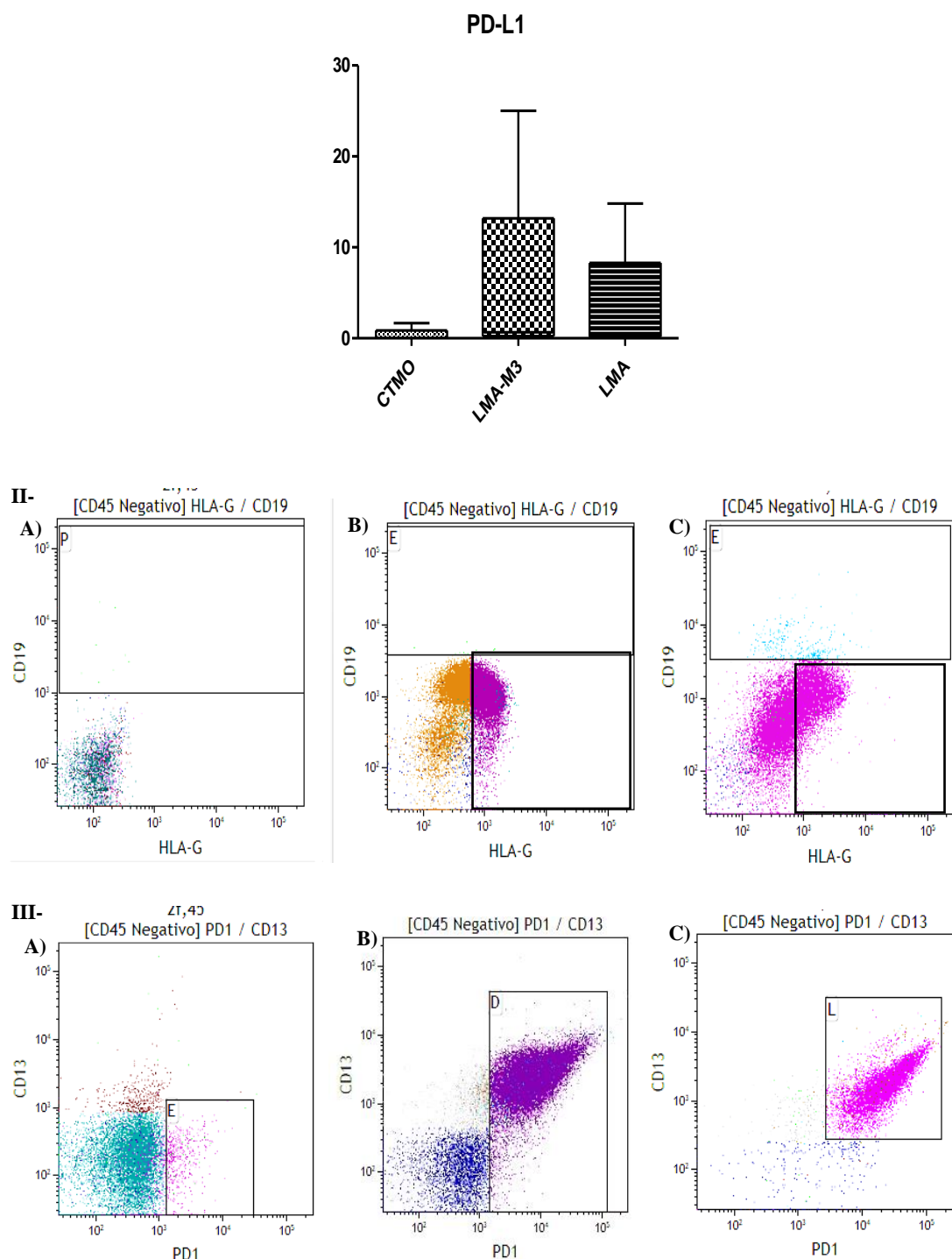
Nota: Expressão mensurada na medula saudável e patológica de pacientes com leucemia linfóide aguda ao diagnóstico.

### Avaliação das moléculas imunomoduladoras em pacientes com leucemia Mieloide

Para os pacientes com leucemia mieloide, obtivemos resultados promissores com o HLA-G e com o PD1, exibindo um aumento percentual significativo para ambas as leucemias (LMA geral e LMA-M3) em comparação com o grupo controle (figura 4). Para o PD-L1, identificamos um aumento na média percentual, mas esse achado não demonstrou resultados estatísticos.

Figura 4- LMA: Ilustração de células medulares CD45<sup>-</sup>, positivas para a molécula moduladora HLAG, demonstrada nos gráficos da seção II, e para a molécula moduladora PD1, demonstrada nos gráficos do bloco III.



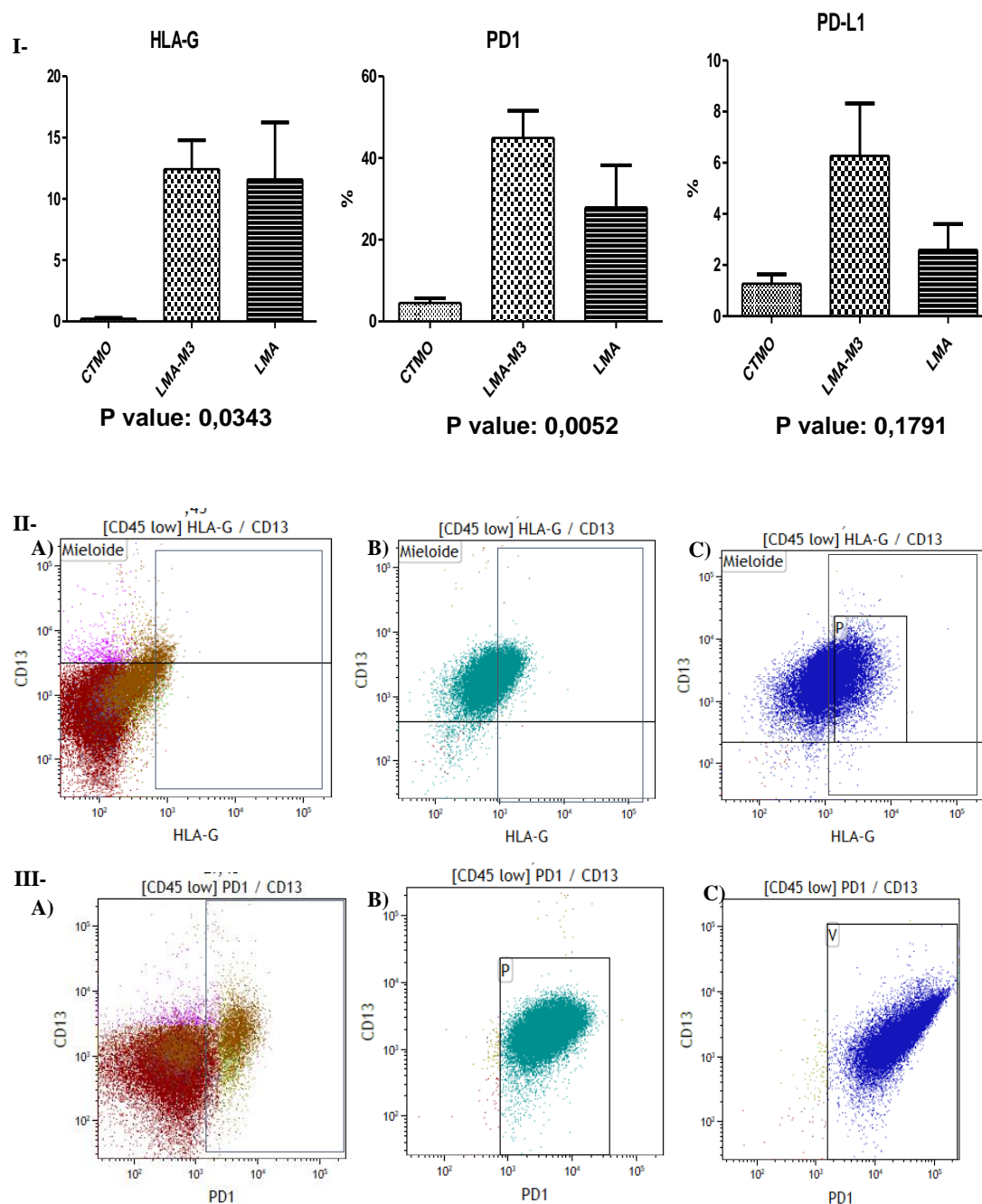


Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

Para o gate do CD45<sup>low</sup>, observamos taxas médias de expressão aumentadas dos três marcadores em ambos os grupos de leucemia em comparação aos controles, com foco na LMA-M3 em ambos os casos apresentando maior expressão (figura 5). No entanto, não foram obtidos resultados significativos para PD-L1 porque a expressão média de todo o grupo de LMA foi próxima.

Figura 5- LMA: Ilustração de células medulares CD45<sup>+/+</sup>, positivas para as moléculas moduladoras HLA-G e PD1, demonstradas nos gráficos do bloco II e III, respectivamente.



Fonte: A autora, 2023.

Nota: No gráfico A verificamos as células residentes na medula normal de crianças saudáveis, no gráfico B são de pacientes com LMA e no gráfico C, pacientes com LMA-M3.

## DISCUSSÃO:

Um levantamento com as taxas de incidência e mortalidade sobre leucemias agudas na cidade do Recife realizado em 2016, avaliou dados epidemiológicos com um intervalo entre os anos de 1998 e 2007. Esse estudo obteve 175 casos e demonstrou que a leucemia linfóide aguda é a mais prevalente, com sobrevivência relativa de 76,5% (LINS et al., 2017). Em outro estudo também realizado no Recife, 454 pacientes com LLA foram avaliados entre os anos de 2005 e 2015, com uma média de 45 pacientes ao ano, no qual 101 pacientes apresentaram remissão completa (PEDROSA et al., 2020). Para a LMA, um levantamento realizado no mesmo centro de referência através de uma coorte retrospectiva dos anos de 2000-2014, avaliou 170 pacientes com LMA geral e 50 com LMA-M3, sendo a média anual de 12 e 3 pacientes, respectivamente. Com relação a remissão, 123 e 39 pacientes atingiram a remissão completa, para LMA geral e M3, respectivamente. Contudo, 108 pacientes dessa coorte vieram a óbito (n:93 LMA, n:15: LMA-M3), uma percentagem de 49% (LINS et al., 2019). Esses dados epidemiológicos evidenciam a prevalência da leucemia infantil em Pernambuco, sendo o nosso trabalho uma fração dessa população.

Dentre as moléculas moduladoras avaliadas, apenas o PD1 apresentou resultados significativos para as LLAs, exibindo 50 vezes mais expressão que o grupo controle, e com médias percentuais similares entre os dois tipos de linhagens. Para o subgrupo LLA-B, identificamos que no paciente que recaiu, o percentual de expressão para o PD1 foi de 91%. Para os pacientes com LLA-T, os três pacientes que recaíram tinham expressão acima de 30% para a molécula. Na literatura identificamos que a presença do PD1 em células leucêmicas está diretamente ligada a recidivas e ao bloqueio da apoptose nas células alteradas. Para mais, o uso de inibidores para essa via tem se tornado um importante aliado para o tratamento e sobrevida desses pacientes (WUNDERLICH et al., 2021; XU, Xi et al., 2023).

Com relação aos pacientes com LMA, para molécula moduladora HLA-G, avaliamos sua expressão no gate do CD45<sup>-</sup> e no CD45<sup>low</sup>, para as duas ocorrências identificamos que nas células leucêmicas temos um aumento na expressão dessa molécula (Pvalue: 0,0073 e Pvalue:0,0343). Correlacionando com o prognóstico, apenas um paciente com LMA-M3 recaiu, e entre as expressões avaliadas, ele

apresentou menor positividade entre o grupo (9,11% e 9,23%). Na literatura, o HLA-G é altamente expresso em pacientes leucêmicos, ao diagnóstico e após transplante halogênico, sendo associado a recaídas (KAYA et al., 2022), além disso, achados também indicam que células estromais promovem a proliferação de células supressoras derivadas de células mieloides e que secretam o HLA-G (YANG et al., 2020). Com isso, o aumento da expressão dessa molécula identificada no nosso estudo pode estar sendo expresso pelas células leucêmicas ou células estromais/hematopoiéticas que passaram por remodelação no nicho medular.

Assim como no HLA-G, identificamos um aumento na expressão da molécula moduladora PD1 nos gates do CD45<sup>-</sup> e CD45<sup>low</sup> (Pvalue: 0,0131 e Pvalue: 0,0052) para os pacientes com LMA. Para o paciente que recaiu, constatamos uma expressão de 24,57% para o CD45<sup>-</sup> e de 54% para o CD45<sup>low</sup>. Na literatura, o bloqueio do ponto de controle imunológico por inibidores da via PD1/PD-L1 apresentou bons resultados clínicos em tumores sólidos, contudo, essa via ainda é pouco explorada para LMA, principalmente em crianças. Todavia, já temos dados que correlacionam a expressão de PD1 com outras moléculas, associadas com mau prognóstico e com capacidade para biomarcadores imunológicos (CHEN et al., 2020). Não obtivemos resultados significativos para o seu ligante PD-L1, entretanto, o único paciente que recaiu para LMA-M3 apresentou positividade de 25% para o PD-L1, resultado que destoa dos demais pacientes do grupo, que apresentaram positividade abaixo de 2%.

## **CONCLUSÃO:**

Descobertas parciais deste estudo piloto, mostram-se promissoras para estudos imunomoduladoras nas células leucêmicas. Em relação às moléculas HLA-G, observamos expressão aumentada em pacientes com LLA-T e pacientes com LMA. Para PD1, o aumento da positividade foi associado a pacientes com LLA-B e LMA. E para o ligante PD-L1 foi possível detectar uma maior expressão deste marcador na LMA-M3, embora não tenham sido alcançados resultados estatísticos. Estes resultados podem indicar um papel na regulação imunológica por estas moléculas e destacar a necessidade de mais estudos com amostras maiores e painéis expandidos para identificar não apenas a expressão destas moléculas, mas também a sua localização entre células precursoras.



**REFERÊNCIAS:**

ATTIA, Jiji VD et al. The molecular and functional characteristics of HLA-G and the interaction with its receptors: where to intervene for cancer immunotherapy?. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 22, p. 8678, 2020.

CHEN, Cunte et al. Expression patterns of immune checkpoints in acute myeloid leukemia. **Journal of hematology & oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2020.

FORCE, Lisa M. et al. The global burden of childhood and adolescent cancer in 2017: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 9, p. 1211-1225, 2019.

KAYA, Zühre et al. Prognostic role of serum cytokines and soluble HLA-G levels in children with leukemia who undergo allogeneic stem cell transplantation. **Cytokine**, v. 153, p. 155869, 2022.

LINS, Mecneide Mendes et al. Incidence and survival of childhood leukemia in Recife, Brazil: A population-based analysis. **Pediatric blood & cancer**, v. 64, n. 8, p. e26391, 2017.

PEDROSA, Francisco et al. Reduced-dose intensity therapy for pediatric lymphoblastic leukemia: long-term results of the Recife RELLA05 pilot study. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 135, n. 17, p. 1458-1466, 2020.

SWETS, Marloes et al. HLA-G protein expression in colorectal cancer evaluated by immunohistochemistry and western blot analysis: Its expression characteristics remain enigmatic. **Clinical Immunology**, v. 194, p. 80-86, 2018.

WUNDERLICH, Mark et al. PD-1 inhibition enhances blinatumomab response in a UCB/PDX model of relapsed pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in oncology**, v. 11, p. 642466, 2021.

XU, Xi et al. PD-1 signalling defines and protects leukaemic stem cells from T cell receptor-induced cell death in T cell acute lymphoblastic leukaemia. **Nature cell biology**, v. 25, n. 1, p. 170-182, 2023.

YANG, Shuo et al. Umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells promote myeloid-derived suppressor cell proliferation by secreting HLA-G to reduce acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. **Cytotherapy**, v. 22, n. 12, p. 718-733, 2020.