



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAMELA REGINA BRIZOLA DA SILVA

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS SISTÊMICO E
MEDULAR DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA B DURANTE A FASE DE INDUÇÃO
DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Londrina
2019

PAMELA REGINA BRIZOLA DA SILVA

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS SISTÊMICO E
MEDULAR DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA B DURANTE A FASE DE INDUÇÃO
DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

SI586 Silva, Pamela .
Estudo do perfil de citocinas sistêmico e medular de pacientes pediátricos com leucemia linfocítica aguda b durante a fase de indução do tratamento quimioterápico / Pamela Silva. - Londrina, 2019.
61 f. : il.

Orientador: Carolina Panis.
Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Leucemia linfocítica aguda do tipo B - Tese. 2. leucemia linfocítica aguda infantil - Tese. 3. Citocinas - Tese. 4. Fase de indução - Tese. I. Panis, Carolina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 616-092

PAMELA REGINA BRIZOLA DA SILVA

**ESTUDO DO PERFIL DE CITOCINAS SISTÊMICO E
MEDULAR DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA B DURANTE A FASE DE INDUÇÃO
DO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Prof. Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Vanessa Jacob Victorino
Instituto Federal do Rio de Janeiro
Campus Engenheiro Paulo de Frontin

Prof. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 28 de novembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar por ter alcançado mais uma etapa. Sou grata a Ele, pois foi uma caminhada de resistência, perseverança e muita expectativa. A fé e a esperança foi algo que me moveu até aqui. Ao meu Deus toda a minha gratidão!

À minha família que me deu todo suporte para que esse sonho fosse concretizado.

Aos meus irmãos Paulo Henrique e Pedro Henrique, que em inúmeras vezes dizia a frase mais marcante “Deixa ela quieta, ela precisa estudar. Ela precisa de silêncio”. Obrigada meninos pelo cuidado comigo.

Em especial a minha mãe, Edilene, minha maior incentivadora. Mãe, você sabe que amo e tenho muito orgulho da mulher que você é. Sei o quanto você prioriza os estudos, e sei o quanto batalhou para que eu pudesse viver o que estou vivendo hoje. Sem você, nada disso seria possível. Ao meu pai que não está mais presente. Alguém que me amava muito e que sempre torceu pelo meu melhor. Paizinho, estou cumprindo o que prometi!

A minha orientadora, Dra. Carolina Panis, alguém que me falta palavras para agradecer. Uma pessoa que me constrangeu inúmeras vezes com tamanha dedicação, cuidado, inteligência, zelo e paciência. Sou muito grata a Deus por ter tido o privilégio de ter sido orientada por alguém assim. Nada do que está escrito nesta dissertação seria possível se não fosse por você e seus alunos do laboratório. Antes eu apenas ouvia falar muito bem a seu respeito, mais hoje posso dizer que vi, provei e ousou ainda acrescentar que você é muito melhor do que dizem. Sou sua fã!

A Prof. Dra. Vanessa Jacob Victorino e Prof. Dra. Danielle Venturini, que prontamente aceitaram o convite de participarem da banca contribuindo para meu crescimento e melhorias deste trabalho.

Aos meus diversos professores, colegas e pessoas que me incentivaram direta e indiretamente com palavra de encorajamento.

E aos melhores amigos do mundo, os meus. Sem vocês me apoiando, me aconselhando, enxugando minhas lágrimas, me dizendo que estava acabando, me dizendo que iria conseguir. Enfim, vocês são as melhores pessoas deste mundo, presenciaram todo meu processo e acreditaram em mim e de que tudo valeria a pena. Amo vocês.

Ao Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, que contribuiu de maneira imensurável para minha vida pessoal e profissional.

Sou muito grata a todos, pois essa dissertação tem muito valor para mim, e sozinha não iria conseguir nunca, precisei da ajuda de cada um. Cada pessoa que passou pela minha vida foi importante para o resultado final.

OBRIGADA!

*“Melhor é o fim das coisas do que o principio
delas ”*

Eclesiastes 7:8

SILVA, Pamela Regina Brizola. **Estudo do perfil de citocinas sistêmico e medular de pacientes pediátricos com leucemia linfocítica aguda B durante a fase de indução do tratamento quimioterápico.** 2019. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a leucemia mais comum na infância, correspondendo a cerca de 30% dos distúrbios malignos que acometem crianças entre 2 a 5 anos de idade. A LLA pode ocorrer nas células B ou T, sendo a LLA-B a mais incidente. Até o momento, não se sabe ao certo quais alterações estão envolvidas na gênese e progressão da LLA-B, ou se existe alguma correlação entre as substâncias produzidas no microambiente tumoral e a resposta ao tratamento. Neste contexto, esta dissertação teve como proposta avaliar o perfil comparativo das citocinas TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ no microambiente tumoral (medula óssea) e na circulação sistêmica (sangue periférico) em pacientes portadores de LLA-B na infância durante a fase de indução. Foram incluídos neste estudo pacientes portadores de LLA-B, atendidos no período de Janeiro de 2015 a Janeiro de 2017, no ambulatório de oncohematologia pediátrica do Instituto do Câncer de Londrina-Paraná. Cada amostra foi coletada segundo o protocolo nos dias D0, D8, D15 e D28 da fase de indução da quimioterapia. A análise de citocinas foi realizada nas amostras por ensaio imunoenzimático (ELISA) em plasma de aspirado de medula óssea e sangue periférico e correlacionados com os aspectos clinicopatológicos. A análise dos dados foi realizada através dos testes de ANOVA complementado pelo teste de Tukey, Kruskal-Wallis, T-Student ou Mann-Whitney para comparação entre 2 ou mais dias de tratamento. Considerou-se $p < 0,05$ como significativo. No total, 10 crianças foram voluntariadas, com idade entre 3 e 12 anos. Não houve diferença estatística em relação aos níveis de IFN- γ , TGF- β 1 e TNF- α na medula óssea e sangue periférico nos diferentes dias de tratamento. Porém a análise qualitativa dos níveis de TGF- β 1 sugerem uma potencial migração da medula para o sangue, pois observou-se redução desta citocina na medula em D28 com concomitante aumento no sangue periférico e a análise comparativa dos níveis circulantes de citocinas de acordo com o perfil de sobrevivência dos pacientes revelou elevados níveis de TGF- β 1 naqueles que permaneceram vivos em comparação aos que foram a óbito sem variação significativa nas demais citocinas. Os resultados sugerem que o perfil diferencial de citocinas no sangue e medula de pacientes com LLA apresenta um padrão qualitativo de comportamento influenciado pelas drogas utilizadas ao longo da fase de indução da quimioterapia, e apontou o TGF- β 1 como possível mecanismo de atuação da quimioterapia relacionado à sobrevivência dos pacientes, bem como um possível mediador a ser investigado nas demais fases do estudo.

Palavra-chave: Leucemia linfocítica aguda. Leucemia linfocítica aguda B. Citocinas. Indução.

SILVA, Pamela Regina Brizola. **Study of the systemic and medullary cytokine profile of pediatric patients with acute B lymphocytic leukemia during the induction phase of chemotherapy.** 2019. 59 p. Dissertation (Master's in Clinical and Laboratory Pathophysiology) - State University of Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is the most common childhood leukemia, corresponding to about 30% of malignant disorders affecting children aged 2-5 years. LLA can occur in B or T cells, with LLA-B being the most common. So far, it is not known for sure what changes are involved in the genesis and progression of LLA-B, or if there is any correlation between the substances produced in the tumor microenvironment and the response to treatment. In this context, this dissertation aimed to evaluate the comparative profile of TGF- β 1, TNF- α and IFN- γ cytokines in the tumor microenvironment (bone marrow) and in the systemic circulation (peripheral blood) in patients with LLA-B in childhood during the induction phase. Patients with LLA-B, seen from January 2015 to January 2017 at the pediatric oncohematology clinic of the Londrina-Paraná Cancer Institute were included in this study. Each sample was collected according to the protocol on days D0, D8, D15 and D28 of the chemotherapy induction phase. Cytokine analysis was performed on the samples by enzyme immunoassay (ELISA) in bone marrow and peripheral blood aspiration plasma and correlated with the clinicopathological aspects. Data analysis was performed using ANOVA tests complemented by the Tukey, Kruskal-Wallis, T-Student or Mann-Whitney test for comparison between 2 or more days of treatment. $P < 0.05$ was considered significant. In total, 10 children were volunteered, aged between 3 and 12 years. There was no statistical difference in IFN- γ , TGF- β 1, and TNF- α levels in bone marrow and peripheral blood on different days of treatment. However, qualitative analysis of TGF-COPY16 levels suggests a potential migration from marrow to blood, since a reduction of this cytokine in the marrow at D28 was observed with a concomitant increase in peripheral blood, and comparative analysis of circulating levels of cytokines according to the survival profile of patients revealed high levels of TGF-COPY16 in those who remained alive compared to those who died without significant variation in other cytokines. The results suggest that the differential profile of cytokines in blood and marrow of patients with LLA presents a qualitative pattern of behavior influenced by the drugs used throughout the induction phase of chemotherapy, and pointed out the TGF- β 1 as a possible mechanism of action of chemotherapy related to patient survival, as well as a possible mediator to be investigated in the other phases of the study.

Keywords: Acute lymphocytic leukemia. Acute lymphocytic leukemia B. Cytokines. Induction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária14
- Figura 2** - Classificação morfológica da leucemia linfóide aguda de acordo com critérios FAB18
- Figura 3** - Fase de indução, protocolo utilizado em todos os grupos de risco21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRM	Doença Residual Mínima
FAB	French-American-British
FNT	Fatores de necrose tumoral
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia infantil
IL	Interleucinas (sequencialmente numerada de IL-1 a IL-35)
IFN	Interferons
LAMs	Macrófagos associados à leucemia
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LLA-B	Leucemia Linfóide Aguda tipo B
LLC	Leucemia Linfóide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
MO	Medula óssea
M2	Meroblástica madura
M3	Promielocítica
M4	Mielomonocítica
M5	Monocítica
M6	Eritroleucemia
M7	Megacariocítica
NK	Células natural killer
Ph	Cromossomo Filadélfia
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
Tregs	Células T reguladoras
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF- α	Fator de crescimento do endotélio vascular alfa
TGF- β 1	Fator de crescimento transformador beta 1
Tregs	Células T reguladoras
tmTNF- α	Células T reguladoras na forma transmembranar
sTNF- α	Células T reguladoras na forma secretora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)	14
2.2	LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA (LLC)	15
2.3	LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)	16
2.4	LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA)	17
2.5	LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO T (LLA-T)	19
2.6	LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO B (LLA-B)	19
2.7	TRATAMENTO DA LLA-B	20
2.8	PAPEL CONTRADITÓRIO DOS MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DAS LEUCEMIAS	23
2.9	CITOCINAS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA	25
2.10	O MICROAMBIENTE TUMORAL E A INFLAMAÇÃO CRÔNICA	27
3	OBJETIVOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	DESENHO DO ESTUDO	31
4.2	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	31
4.3	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	31
4.4	COLETA DE AMOSTRAS	32
4.5	DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO PERIFÉRICO E MEDULAR	32
4.6	DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINAS	32
4.7	CORRELAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA	32
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5	RESULTADOS	34
6	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	58
	ANEXO: Parecer de aceite do comitê de ética	59

1. introdução

A leucemia é uma doença de caráter maligno e insidioso caracterizado pela proliferação exacerbada de células imaturas clonais de um precursor linfóide ou mielóide na medula óssea, podendo ser subdividida nas formas aguda e crônica. Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2018), a leucemia é considerada um problema de saúde pública de alta complexidade para o SUS (Sistema Único de Saúde), classificando-se como a segunda maior causa de morte de crianças e adolescentes na faixa etária de 1 a 15 anos, sendo a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) a mais frequente. A LLA ocorre devido a um bloqueio de diferenciação e proliferação clonal de linfoblastos da linhagem B (85% dos casos) ou linhagem T (15% dos casos) (FERREIRA *et al.*, 2012).

Para entender o processo inflamatório crônico no câncer, uma das hipóteses é de que a inflamação crônica leva ao aumento da proliferação celular, propiciando o desenvolvimento de tumores onde ocorre uma alteração da homeostasia tecidual normal e as células normais passam a funcionar de acordo com a nova dinâmica do microambiente formado pelas células neoplásicas. Além dessa dinâmica das células do microambiente tumoral há estudos que relatam a presença de células do sistema imune e seus produtos no processo neoplásico (ONUCHIC, 2010). As células leucêmicas, como outros cânceres, apresentam capacidade de sobreviver e proliferar para outros tecidos do sistema hematolinfóide. A relação entre células, citocinas e microambiente tumoral medular vem sendo extensamente estudada, visando entender de que forma estes componentes contribuem com a resposta terapêutica contra a Leucemia Linfóide Aguda do tipo B (LLA-B) que é a leucemia que mais acomete crianças (FIGUEIREDO, 2019).

As citocinas agem potencializando a resposta inflamatória para que haja cicatrização e reparo celular (OLIVEIRA *et al.*, 2011) atuando em diferentes tipos de células produzindo efeitos multifuncionais e estão presentes na regulação imunológica dos linfócitos B, linfócitos T e células natural Killer

(NK), além de promoverem a linfopoiese. Segundo estudos quando se tem uma ativação anormal dos receptores ou expressão inadequada das citocinas, esses fatores contribuem para que haja expansão clonal de células precursoras linfáticas alteradas nas neoplasias hematológicas. Foi observado os níveis de expressão de citocinas (interleucinas (IL) 6, IL10 e fator de crescimento endotelial vascular [VEGF]) em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) e os valores obtidos mostraram-se relevantes como fatores prognósticos e como marcadores para monitorar a eficácia terapêutica (FAYAD *et al.*, 2001).

Os mecanismos biológicos e a determinação dos fatores de prognósticos na LLA-B ainda não estão bem elucidados. As citocinas tem um papel importante tanto na hematopoese normal quanto no processo neoplásico, e sabe-se que a expressão inadequada de citocinas ou a ativação anormal dos seus receptores pode levar a aberrações genéticas na leucemogênese promovendo a sobrevivência e proliferação das células malignas. Sabendo que as células leucêmicas apresentam variação genética na leucemogênese, tem sido âmbito de pesquisa saber qual a relação das citocinas no processo leucemogênico, se elas podem atuar como um fator de diagnóstico ou prognóstico para pacientes com leucemias e se existe alguma correlação das substâncias produzida no microambiente tumoral a resposta ao tratamento da LLA-B (SHULING *et al.*, 2005).

Com isso, este estudo teve como proposta avaliar o perfil comparativo das citocinas TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ no microambiente tumoral (medula óssea) e circulação sistêmica (sangue periférico) de pacientes portadores de LLA-B na infância durante a fase de indução e sua correlação com a sobrevivência dos pacientes com LLA-B.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O câncer infantil é considerado um problema de saúde pública de alta complexidade para o SUS (Sistema Único de Saúde). As leucemias são as neoplasias hematológicas mais comuns da infância, e acometem principalmente pacientes menores de 15 anos de idade, classificando-se como a segunda maior causa de morte de crianças e adolescentes (FERREIRA *et al.*, 2012). As leucemias são doenças de caráter maligno e insidioso, que afetam os leucócitos causando proliferação exacerbada de uma célula progenitora transformada, levando ao acúmulo de células imaturas malignas clonais na medula óssea (INCA, 2018).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que no Brasil tenham 5.940 casos novos de leucemia para o sexo masculino e 4.860 para sexo feminino no biênio 2018/2019 como demonstrado na Tabela 1 (INCA, 2017). Estes dados correspondem a um risco de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,56 casos novos para cada 100 mil mulheres. Desconsiderando os tumores não melanoma, a ocorrência de leucemias em homens é considerada a quinta mais frequente na Região Norte do Brasil (4,17/100mil), ocupando a oitava posição a Região Nordeste (4,90/100mil), a décima posição as Regiões Sudeste (5,79/ 100mil) e Sul (8,67/100mil), e a 11ª posição na Região Centro-Oeste (4,88/100mil). Já nas mulheres, a Região Norte é considerada a sexta mais frequente (3,29/100mil), Região Sul é a nona (6,50/100mil), Região Nordeste é a décima posição (3,66/100mil), e a 11ª posição para as Regiões Sudeste (4,86/100mil) e Centro-Oeste (3,93/100mil). (INCA, 2017).

Figura 1. Estimativas para o ano de 2018 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajust.	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajust.	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajust.	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajust.
Próstata	68.220	66,12	66,82	15.720	70,76	66,31	-	-	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	-	-	59.700	56,33	51,29	19.920	80,33	63,98
Colo do Útero	-	-	-	-	-	-	16.370	15,43	17,11	4.620	18,66	17,58
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	18,16	16,97	4.520	20,33	21,05	12.530	11,81	9,22	3.710	15,06	11,44
Cólon e Reto	17.380	16,83	20,03	5.630	25,34	25,16	18.980	17,90	18,40	6.820	27,49	20,84
Estômago	13.540	13,11	14,98	3.240	14,55	10,95	7.750	7,32	5,96	2.210	8,92	5,34
Cavidade Oral	11.200	10,86	11,22	2.770	12,38	12,03	3.500	3,28	2,86	1.010	3,89	2,80
Laringe	6.390	6,17	6,31	1.540	6,86	8,44	1.280	1,20	0,96	420	1,30	0,92
Bexiga	6.690	6,43	7,79	1.920	8,59	9,20	2.790	2,63	2,21	890	3,42	2,61
Esôfago	8.240	7,99	6,73	1.450	6,46	7,04	2.550	2,38	1,67	540	1,85	1,38
Ovário	-	-	-	-	-	-	6.150	5,79	4,80	2.140	8,46	6,54
Linfoma de Hodgkin	1.480	1,43	1,14	550	2,19	1,93	1.050	0,96	0,92	400	1,33	1,19
Linfoma não Hodgkin	5.370	5,19	5,42	1.480	6,59	6,81	4.810	4,55	4,19	1.520	6,10	5,44
Glândula Tíreoide	1.570	1,49	1,50	500	1,87	1,76	8.040	7,57	5,88	2.490	10,01	7,02
Sistema Nervoso Central	5.810	5,62	5,49	1.340	6,10	6,55	5.510	5,17	5,17	1.400	5,63	4,70
Leucemias	5.940	5,75	5,51	1.480	6,69	6,58	4.860	4,56	4,29	1.190	4,72	4,59
Corpo do Útero	-	-	-	-	-	-	6.600	6,22	5,44	2.370	9,46	7,46
Pele Melanoma	2.920	2,82	2,69	800	3,34	3,31	3.340	3,16	2,15	880	3,42	2,74
Outras Localizações	41.480	40,17	35,26	9.470	42,62	43,45	36.230	34,17	29,04	8.920	36,00	28,39
Todas as Neoplasias, exceto Pele não Melanoma	214.970	208,32	217,27	52.410	235,91	226,91	202.040	190,61	191,78	61.450	247,95	199,05
Pele não Melanoma	85.170	82,53	-	17.020	76,60	-	80.410	75,84	-	17.230	69,60	-
Todas as Neoplasias Malignas	300.140	290,86	-	69.430	312,52	-	282.450	266,47	-	78.680	317,47	-
Todas as Neoplasias Malignas Corrigidas para Sub-Registro	324.580	314,55	-	-	-	-	310.300	292,74	-	-	-	-

*População padrão mundial (1960). **Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2017.

2.1 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA (LMC)

A LMC é uma neoplasia hematológica definida como uma doença mieloproliferativa crônica clonal, com presença de anormalidades genéticas adquiridas e leucocitose com desvio à esquerda. Também pode ocorrer a presença do cromossomo Ph (Philadelphia), que consiste em uma translocação de fragmentos dos cromossomos 9 e 22, que por um processo de fusão origina o híbrido BCR-ABL, codificador de uma proteína quimérica com atividade tirosina quinase elevada (ABREU, 2009; ARANHA, 2009). O gene BCR-ABL é determinante na transformação da célula hematopoiética normal em uma célula leucêmica, que apresenta mecanismos de resistência e vantagens de proliferação (BERGANTINI *et al.*, 2005).

A LMC representa 15% a 20% das leucemias, com incidência de 1 a 2 casos para cada 100 mil indivíduos/ano. A maior frequência ocorre em

adultos com idade entre 40 e 60 anos. Com uma sintomatologia insidiosa, a LMC pode ser representada de acordo com as seguintes fases: crônica, acelerada e blástica (SOSSELA *et al.*, 2017). O diagnóstico pode ocorrer na casualidade, em exames clínicos, exames laboratoriais ou em check-up. Os pacientes podem apresentar sudorese, cansaço e desconforto do lado esquerdo do abdômen devido ao aumento do tamanho do baço, além de palidez e perda de peso. Um dos fatores de risco está relacionado à exposição à radiação (BORTOLHEIRO, 2008).

O diagnóstico pode ser feito através de exames laboratoriais e exames clínicos analisando a presença de esplenomegalia, avaliação do hemograma, realização de mielograma e biópsia da medula óssea, e reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificar o BCR-ABL. A presença de leucocitose e de granulócitos imaturos no sangue, além dos exames citogenéticos e moleculares, são de extrema importância não só para diagnosticar a LMC, mas também para monitorar o paciente durante o período de tratamento (BARBOSA *et al.*, 2000).

2.2 LEUCEMIA LINFOIDE CRÔNICA (LLC)

A LLC se manifesta frequentemente em indivíduos com idade entre 64 a 70 anos, e é rara em indivíduos com menos de 30 anos de idade. Os pacientes com LLC apresentam uma alteração no DNA que leva à produção descontrolada de células precursoras linfocitárias na medula óssea, e que conseqüentemente, leva ao aumento de linfócitos no sangue periférico e em tecidos linfóides (YAMAMOTO, 2005). Este é um tipo de leucemia que apresenta maior frequência em países ocidentais, com porcentual de 22% a 30% em comparação com outros tipos de leucemias em adultos. É rara em países orientais (CHAUFFALLE, 2004).

Com uma etiologia desconhecida, a LLC associa-se com hereditariedade genética. Como muitos pacientes não apresentam sintomas, não há necessidade de internação, e o tratamento pode ser realizado ambulatoriamente (OLIVEIRA, 2017). O diagnóstico é realizado conciliando as

informações clínicas, hemograma e a imunofenotipagem (por citometria de fluxo) e confirmado quando o paciente com LLC apresenta uma leucocitose acima de 10×10^9 e linfócitos acima de 40% no mielograma (METZE, 2005).

2.3 LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA)

Com maior prevalência em adultos (80% dos casos), a LMA é caracterizada pelo crescimento descontrolado e exacerbado de blastos, que são células precursoras indiferenciadas de origem mielóide, e que pode ocorrer em qualquer fase da hematopoese (BITTENCOURT *et al.*, 2003) devido a eventos moleculares e celulares nas células tronco-precursoras, como dano ao DNA aumento da proliferação celular, instabilidade genética e falha na apoptose, resultando em substituição do tecido normal na medula óssea por células neoplásicas (SILVA *et al.* 2006).

Clinicamente, pode haver sinais de cansaço, dispneia após atividade física, palidez, sinais de sangramentos, febre, infecções e dores ósseas, dentre outros sintomas menos comuns. Os fatores de risco, embora pouco conhecidos, parecem estar associados a distúrbios genéticos como Anemia de Fanconi, Síndrome de Down, e distúrbios adquiridos bem como exposição a altas doses de irradiação, agentes químicos e quimioterapia prolongada com agentes alquilantes utilizados no tratamento de outros cânceres (LIMA *et al.*, 2006).

De acordo com a apresentação celular e características citoquímicas a LMA é classificada de acordo com o grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) (INCA,2002) em:

- M0: leucemia indiferenciada (identificação realizada através de anticorpos monoclonais);
- M1: leucemia mielóide aguda sem diferenciação;
- M2: leucemia mielóide aguda com diferenciação;
- M3: leucemia promielocítica;
- M4: leucemia mielomonocítica;
- M5: leucemia monocítica;

- M5a: leucemia monocítica sem diferenciação;
- M5b: leucemia monocítica com diferenciação;
- M6: eritroleucemia;
- M7: leucemia megacariocítica.

A subclassificação auxilia na determinação do prognóstico e diferenciação da LMA de outras leucemias agudas como LLA, além de nortear o tratamento adequado da doença. O prognóstico pode sofrer alteração dependendo da contagem inicial dos leucócitos anormais e da presença de anormalidades cromossômicas (BAIN, 2005).

Assim, o diagnóstico confirmatório é realizado através de parâmetros como idade, exames clínicos, dados citogenéticos e de imunofenotipagem. A análise da morfologia celular e das condições cromossômicas é útil para indicar o tipo de tratamento e predizer o prognóstico de cada paciente. Com os avanços na terapêutica nas últimas décadas, o tratamento da LMA tem sido satisfatório no que se refere ao desaparecimento das células blásticas e reestabelecimento das células normais, mas não se descarta a possibilidade de transplante da medula óssea quando o prognóstico é desfavorável (LIMA *et al.*, 2016).

2.4 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA)

A LLA corresponde cerca de 30% dos distúrbios malignos que acometem crianças entre 2 a 5 anos de idade, e 80% das leucemias que acometem crianças até 15 anos e ocorre devido a alterações cromossômicas e fatores ambientais (GANAZZA, 2014).

A LLA ocorre devido à proliferação clonal desordenada de células precursoras de origem linfóide na medula óssea e passam a circular no sangue na forma imatura. O acúmulo de linfoblastos na medula óssea leva um quadro clínico de anemia normocítica, normocrômica, trombocitopenia e neutropenia devido ao bloqueio da produção normal de hemácias, plaquetas e leucócitos. É possível encontrar números aumentados de leucócitos, mas

frequentemente pode estar normal ou diminuída. Em pacientes leucopênicos (valor abaixo de 4.000/mm³), os blastos são raros ou ausentes, e quando há leucocitose ultrapassam a 100.000/mm³. O diagnóstico é confirmado quando há mais de 25% avaliado na contagem total de linfoblastos na medula óssea (FARIAS, 2004).

O grupo FAB classificou a LLA de acordo com critérios morfológicos: (DANTAS, 2015; CAVALCANTE, 2017)

- L1: células pequenas com contorno nuclear irregular, pouco citoplasma e ausência de nucléolos e basófila;
- L2: células com diferença de tamanho, o citoplasma varia de tamanho e basófila, podendo apresentar nucléolos e irregularidade no contorno;
- L3: células grandes com nucléolos, basófila e vacúolos. Este subtipo é considerado a forma leucêmica do linfócito de Burkitt por apresentar imunofenótipo B.

Figura 1. Classificação morfológica da leucemia linfóide aguda de acordo com os critérios FAB.

Aspecto morfológico	L1	L2	L3
Diâmetro celular	Predominância de células pequenas, homogêneas	Grandes, heterogêneas	Grandes, homogêneas
Cromatina nuclear	Fina ou aglomerada	Fina	Fina
Forma do núcleo	Regular, pode apresentar fenda ou indentação	Irregular, podendo apresentar fenda ou indentação	Regular, redondo ou oval
Nucléolos	Indistintos ou não-visíveis	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes	Um ou mais por célula, grandes, proeminentes
Quantidade de citoplasma	Escassa	Moderadamente abundante	Moderadamente abundante
Basofilia citoplasmática	Ligeira	Ligeira	Evidente
Vacúolos citoplasmáticos	Variáveis	Variáveis	Evidente

L1 = Leucemia linfóide aguda tipo L1; L2 = leucemia linfóide aguda tipo L2; L3 = leucemia linfóide aguda tipo L3.

Fonte: Farias, 2004.

A LLA pode ocorrer nas células B (em 85% dos casos), ou em células T(em 15% dos casos). É preciso diferenciar o subtipo da doença e considerar outros fatores como a idade do paciente, exame de imunofenotipagem, citogenética, contagem inicial dos leucócitos, e condições

clínicas como envolvimento do sistema nervoso central, testículos e gânglios. Os pacientes são classificados de acordo com o protocolo de tratamento em baixo risco e alto risco de recaída, de forma que o mesmo seja ajustado (ALVES, 2012).

2.5 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO T (LLA-T)

A LLA de linhagem T ocorre através de um precursor linfóide sendo o linfócito T o progenitor. É classificada como sendo uma doença menos frequente, porém apresenta um prognóstico ruim por ser considerada mais agressiva que a LLA-B. Apresenta leucometria elevada, doença extramedular além de comprometer o sistema nervoso central e é classificada em subtipos como: pré-T, T-intermediário e T-maduro, e essa classificação ocorre de acordo com o estágio de maturação das células no timo. Para os exames laboratoriais essas informações são de extrema relevância, pois permite identificar qual leucemia o paciente tem e qual subtipo expressa para que o protocolo de tratamento utilizado possa ser eficaz (CAVALCANTE, 2017; GANAZZA, 2014).

2.6 LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO B (LLA-B)

A LLA de linhagem B tem como progenitor o linfócito B e ocorre devido a um estacionamento na maturação do desenvolvimento normal da célula tronco hematopoiética que pode ocorrer em diferentes estágios de diferenciação. As células neoplásicas formadas apresentam capacidade ilimitada de proliferação e/ou resistência ao processo de apoptose. A LLA-B expressa antígenos de superfície celular que apontam o estágio de diferenciação do linfócito B precursor. Com isso, a LLA-B pode ser classificada em quatro subtipos: pró-B, comum, pré-B e B-maduro (CAVALCANTE, 2017).

- Células do tipo pró-B: representa 5% dos casos pediátricos e 10% dos casos de LLA em adultos e expressa HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22;

- Células do tipo comum (Calla): expressa CD10 (apresenta grande influência no prognóstico), CD22, CD19 e/ou CD20;
- Célula do tipo pré-B: apresenta cadeia μ citoplasmática, em adição de CD19, CD20 e CD10;
- Célula do tipo B-maduro: apresenta fenótipo incomum e expressa cadeia leves de imunoglobulina na superfície da membrana.

Com a leucemogênese multifatorial, não se faz conhecido todos os mecanismos envolvidos na formação da LLA-B, mas seu desenvolvimento pode estar relacionado ao processo fisiológico da célula tronco hematopoiética até a formação dos linfócitos B maduros. Sabe-se que nesse processo ocorre sinalizações celulares mediadas por citocinas e receptores de imunoglobulinas de células B, programação genética e transcricional intrínsecas (PEI, 2012).

Para o tratamento da LLA-B, leva-se em consideração o padrão das linhagens celulares da medula óssea, a citogenética, a contagem inicial de leucócitos no sangue periférico, as condições clínicas do paciente e análise de invasão do sistema nervoso, gânglios e testículo (DANTAS, 2015).

A poliquimioterapia utiliza vários tipos de drogas que agem em diferentes fases do ciclo celular. Como a célula leucêmica encontra-se em fase de replicação, ela é o principal alvo do tratamento. Além disso, como é frequente o ressurgimento de células malignas após o tratamento, utiliza-se esta combinação de quimioterápicos com o intuito de evitar uma possível quimiorresistência e o ressurgimento de células malignas mais tardiamente. (OLIVEIRA, 2017).

2.7 TRATAMENTO DA LLA-B

O tratamento da LLA é iniciado após a confirmação do diagnóstico através dos exames de imunofenotipagem, citoquímica, citogenética correlacionando a idade e o quadro clínico do paciente no intuito de escolher o melhor protocolo terapêutico, pois vários tipos de drogas são utilizadas para controlar a proliferação das células leucêmicas (CAVALCANTE, 2017).

No Brasil, o tratamento da leucemia baseia-se no protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil (GBTLI) de 2009. Esse protocolo se divide nas seguintes fases: indução, consolidação e intensificação e manutenção. Para cada fase, utilizam-se medicamentos e dosagens diferentes, para garantir que a poliquimioterapia seja eficaz (tabela 3). A partir deste protocolo, pode-se classificar os pacientes em alto ou baixo risco, de acordo com as características do diagnóstico, como idade e leucometria ao diagnóstico. Posteriormente, é realizada a estratificação de risco do paciente, a partir do resultado da análise citológica (GANAZZA, 2014).

Figura 2. Fase de indução, protocolo I utilizado em todos os grupos de risco.

PROTOCOLO I	DOSES	DIAS
Prednisona	60 mg/m ² VO	1 a 28
Vincristina	1,5 mg/m ² IV	8, 15, 22, 29
Daunorubicina	30 mg/m ² IV	8, 15, 22, 29
Asparaginase	5.000 U/m ² IM	12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 e 33
MTX IT, se SNC negativo	dose segundo idade	1, 12, 33, 45 e 59
MTX IT, se SNC positivo	dose segundo idade	1, 12, 18, 27, 33, 45 e 59

Legenda: SNC (Sistema Nervoso Central), MTX (Metotrexato) e IT (Via Intratecal).
Fonte: Revista Brasileira de Cancerologia, 2001.

A fase de indução é de extrema importância, tem duração de quadro semanas e inicia a primeira com o uso de corticoide (prednisona) e metotrexato de sódio (MTX) por via intratecal (IT). Esta fase visa realizar a remissão total da doença tem por objetivo impulsionar a restauração da produção normal de células sanguíneas. Para isso, utilizam-se doses de medicação de alta intensidade (Figura 3), para garantir que haja destruição dos clones leucêmicos. A indução é uma fase de extrema importância, pois tem o intuito de diminuir a carga tumoral para que o nível de células leucêmicas seja indetectável nos exames de hemograma e mielograma, além de evitar comprometimento do sistema nervoso central através do processo de quimioterapia intratecal. Os antineoplásicos utilizados na indução são corticoides, anticíclicos e asparaginase, acrescentada devido reações alérgicas. Esses medicamentos agem diretamente no processo mitótico celular, dificultando a dinâmica dos microtubúlos que estão ligados à fase M do

ciclo celular, levando a célula leucêmica ao processo de morte por apoptose (GANAZZA, 2014).

O sulfato de vincristina é considerado um quimioterápico citotóxico utilizado com frequência no tratamento de oncologias hematológicas a mais de 40 anos. Considerada uma amina lipofílica, pode levar ao quadro de necrose tumoral devido ao impedimento do fluxo sanguíneo local, devido a isso, seu uso limita-se até 2 mg devido a neurotoxicidade, como meio alternativo a neurotoxicidade, tem-se realizado o encapsulamento lipossomal para proteger a droga da degradação enzimática e do próprio sistema imunológico com o intuito de reduzir a toxicidade e aumentar a concentração plasmática (SOOSAY RAJ; SMITH; MOORE, 2013).

A fase de consolidação-intensificação é um período de tratamento intenso objetivando o não aparecimento de novas células resistentes aos fármacos da poliquimioterapia. Nessa fase, ocorre a associação da quimioterapia sistêmica com a intratecal, para consolidar a primeira fase de indução. Por conta disso, há frequentes episódios de infecções graves, pois a quimioterapia apresenta grande toxicidade sobre as células da medula óssea e do trato gastrointestinal (OLIVEIRA, 2017).

A fase de manutenção ocorre após 6 ou 12 meses de tratamento intensivo e pode durar até seis anos de tratamento, com o objetivo de prevenir o reaparecimento da doença esta fase utiliza baixas concentrações de drogas que agem no aumento no tempo da indução. Apesar disso, sabe-se que cerca de 20% dos pacientes não respondem ao tratamento da LLA-B, podendo evoluir para o óbito ou complicações tardias. Desta forma, é necessário o entendimento da fisiopatologia da LLA-B, bem como dos mecanismos associados ao perfil de resposta ao tratamento, especialmente nas fases iniciais (CAZE, 2010).

A morte de pacientes durante a fase de indução devido à toxicidade segundo protocolo (2009) é dado como uma falha no tratamento, assim como a presença de doença residual mínima (DRM) positiva que prediz a presença de células leucêmicas sem demonstração clínica da doença. Os quimioterápicos utilizados no tratamento não apresentam especificidade e nem atuam de forma

seletiva ou exclusiva para as células doentes, com isso as células normais também são agredidas por apresentarem características comuns às células tumorais (atividade mitótica rápida e ciclo celular curto), devido a agressão as células normais ocorre a toxicidade ou os efeitos colaterais dos quimioterápicos (RIUL,1999).

A toxicidade gerada pelos quimioterápicos sobre o tecido hematopoiético leva a mielossupressão, que é a incapacidade da medula óssea de repor os elementos figurados do sangue periférico, levando a leucopenia, trombocitopenia e a anemia. Essa toxicidade não é uniforme, varia de acordo com o paciente e de droga para droga. Com essa variação a mielodepressão pode ser caracterizada nas formas leve, moderada ou severa, necessitando realizar uma avaliação hematológica antes da administração de uma novo ciclo de droga (BONASSA,1992).

2.8 O PAPEL CONTRADITÓRIO DOS MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO NA PATOGÊNESE DA LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA DO TIPO B (LLA-B)

A fisiopatologia da LLA-B pode ser explicada através da complexidade de desenvolvimento fisiológico das células da medula óssea até a formação dos linfócitos B maduros. Apesar de pouco elucidada, nos clones malignos de linfócitos, sabe-se que ocorrem sinalizações aberrantes mediadas por proteínas e citocinas exógenas á medula, bem como por receptores de imunoglobulinas de células do tipo B que alteram sua programação genética (GREAVES, 2006).

É sabido que a LLA-B se desenvolve devido a um estacionamento na maturação do desenvolvimento normal da célula tronco hematopoiética, e com isso a célula neoplásica formada apresenta uma capacidade de proliferação ilimitada e falha no processo de apoptose. Após um dano celular que pode ser causado por agentes químicos, necrose tecidual ou reações imunológicas, o organismo se defende através da geração de resposta inflamatória, com a participação de diferentes células objetivando cessar a

proliferação de patógenos, e promover o reparo, recuperação e conservação do organismo (CHIARINI, 2016).

Nesta resposta são produzidas citocinas, que são glicoproteínas extracelulares hidrossolúveis de baixo peso molecular produzida por diferentes tipos celulares como monócitos, macrófagos, mastócitos, fibroblastos, células B e T, células endoteliais, queratinócitos, células musculares lisas, células do parênquima gastrointestinal e estroma endotelial, e também por células neoplásicas (LORENZI, 2010).

Quando o organismo se encontra em homeostase, as citocinas são produzidas em baixas quantidades e apresentam função fisiológica. Na presença de dano ou estímulos inflamatórios, estas substâncias são liberadas na corrente sanguínea em grande quantidade (OLIVEIRA, 2011) e são classificadas de acordo com a célula de origem ou pela função biológica, sendo então agrupadas como fatores de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL, sequencialmente numeradas de IL-1 a IL-35), interferons (IFN), quimiocinas (citocinas quimiotáticas) e fatores de crescimento mesenquimal (GARCIA, 2002).

O processo de hematopoiese normal é finamente regulado pela produção de citocinas no microambiente medular. Elas atuam de forma ampla, controlando funções desde a diferenciação até a ativação celular. Assim, as citocinas têm sido consideradas como importantes mediadores do processo de produção das células sanguíneas, especialmente os fatores estimulantes de crescimento de colônias (CG-SF) e a interleucina-3 (METCALF, 2008).

Entretanto, sabe-se que a desregulação na produção de citocinas que ocorre durante o processo inflamatório crônico parece estar associada ao desenvolvimento e progressão das neoplasias hematológicas, e é mediada por citocinas que não necessariamente afetam a produção normal de sangue. Algumas citocinas tem ação pró-inflamatória (resposta Th1) ou anti-inflamatória (resposta Th2), que é dependente do microambiente localizado. Elas influenciam na diferenciação, proliferação e sobrevivência das células imunológicas, além de regular a atividade e produção de outras citocinas

(GARCIA, 2002). O papel das citocinas na LLA ainda é pouco conhecido, e em algumas neoplasias hematológicas observam-se dados controversos.

2.9 CITOCINAS COM ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA

Citocinas como IFN, IL, TNF, e células como os macrófagos e natural killers (NK) desenvolvem um grande impacto sobre o desenvolvimento de tumores e recrutamento de células (Shi *et al.*, 2003). Dentre as citocinas do padrão Th1, destaca-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), uma citocina pró-inflamatória produzida por mastócitos, monócitos e linfócitos T, de meia-vida curta (20 minutos) e com atividade antineoplásicas (OLIVEIRA, 2011).

Na hematopoese, o TNF- α leva à expansão das células-tronco em conjunto com outros fatores de crescimento. No processo de leucemogênese, esta citocina estimula a proliferação celular e induz a apoptose dos precursores maduros na medula óssea, gerando pancitopenia (TIANTIAN, 2014). E no microambiente tumoral, esta citocina é importante na propagação, promoção e progressão da doença, e atua na transformação celular, proliferação, angiogênese e infiltração extramedular (JAIME-PÉREZ *et al.*, 2017).

Nas neoplasias hematológicas, o TNF- α pode ser produzido por diversas células do sistema imune, como macrófagos ativados, linfócitos T, células NK e neutrófilos, e também por células leucêmicas, como já descrito no caso da leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia mielóide crônica (LMC) e leucemia linfocítica crônica (LLC), colaborando para a progressão da doença. TNF- α está diretamente relacionado à manutenção da hematopoese na leucemia (ZHOU, 2007).

O aumento da produção de TNF- α pode ainda estar associado à hipogamaglobulinemia transitória, observada em crianças com leucemia após o término da terapia (BOGDAN *et al.*, 2004).

Uma das citocinas mais importantes neste processo de regulação da homeostasia da medula óssea é o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- β 1). O TGF- β 1 tem efeito antiproliferativo, pró-apoptótico e homeostático nas doenças hematológicas (TERME, 2009), suas ações podem ser notados sistemicamente além do microambiente do tumor, pois todas as células apresentam receptores de TGF- β . O TGF- β desempenha efeito sensor redox

(indicando regular a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em processos crônicos) além de estarem presentes em vários processos mediados por espécies reativas, especialmente inflamação, tendo em vista à restauração da homeostase. Através da análise da expressão gênica da sinalização do TGF- β , observa-se no câncer de mama que esta citocina regula a expressão de algumas quimiocinas durante o progredimento da doença e correlaciona-se ao mau prognóstico do paciente (PANIS *et al*, 2013). Sabe-se que esta citocina é capaz de induzir o processo de hibernação das células-tronco hematopoiéticas, afetando diretamente a produção normal de precursores na medula por regular o processo de apoptose e diferenciação celular conforme a necessidade do organismo (SATOSHI, 2009). TGF- β consegue modular processos como invasão celular, regulação do sistema imune, angiogênese e modificação do microambiente promovendo a disseminação de cânceres podendo assim facilitar a disseminação do câncer levando a um quadro clínico de metástase. A ação do TGF- β é altamente influenciado pelo tipo de célula, estágio de desenvolvimento e doença. No câncer de mama, por exemplo, a sinalização dessa citocina no início é antineoplásicas e atua impedindo o crescimento do tumor, porém com o decorrer dos eventos ela passa a apresenta uma ação contrária aumentando a motilidade e proliferação da neoplasia (HERRARA *et al.*,2012).

Nas doenças hematológicas parece haver resistência por parte dos clones precursores a este mecanismo inibitório do TGF- β 1. Por outro lado, o excesso desta citocina no microambiente tumoral pode levar à imunossupressão, estando relacionado com a patogênese desta doença (MEI, 2006).

Em pacientes com LLA-B na infância, é possível encontrar fenótipos de células natural killer (NK) alterados, onde o TGF β -1 produzido pelos blastos malignos é responsável pela indução de disfunção das NKs, com o objetivo de escapar da vigilância imunológica. Além disso, o bloqueio de TGF β -1 parece corrigir a disfunção das NKs na leucemia (ROUCE *et al.*, 2015), sugerindo que esta proteína tenha importante papel regulatório na leucemogênese. Neste sentido, sabe-se que a desregulação da via de sinalização do TGF β -1 está diretamente relacionada à gênese de diversos tipos de cânceres (HAELY,

2009) pois a presença do TGF- β 1 parece ter relação com a promoção da leucemia e aumento da mutagênese *in vitro* (FIDANZA *et al.*, 2017).

A produção de citocinas no microambiente medular induz aumento da produção de interferon gama (IFN- γ), outra citocina pró-inflamatória com atividade antineoplásicas (JIN *et al.*,2016). Além de liberar o IFN- γ , as células NK podem produzir estimulantes TNF- α , TNF- β e GM-CSF (fator de colônias de macrófagos de granulócitos) e expressar CD56 e CD16, que tem correlação pior prognóstico para LLA-T (VICTORINO *et al.*,2014).

Esta citocina também apresenta papel controverso nas leucemias. Sabe-se que o contato de linfócitos T normais com células leucêmicas mielóide, por exemplo, pode desencadear a sua produção; entretanto, não se sabe qual o efeito (ERSVAER,2007).O IFN- γ parece ainda ser capaz de inibir a morte de células de leucemia linfocítica crônica por apoptose (BUSCHLE,1993), contribuindo para a sobrevida aumentada dos clones malignos. Desta forma, observa-se que o papel das citocinas nas leucemias não está bem definido, e precisa maior aprofundamento.

2.10 O MICROAMBIENTE TUMORAL E A INFLAMAÇÃO CRÔNICA

A relação células/citocinas/microambiente tumoral medular vem sendo extensamente estudada, visando entender de que forma cada um destes componentes contribui para o processo de geração ou eliminação das leucemias. Desde o século passado tem-se criado hipóteses para entender o processo inflamatório crônico no câncer. Uma das hipóteses é de que a inflamação crônica leve ao aumento da proliferação celular, propiciando o desenvolvimento de tumores. Na inflamação crônica, o microambiente tumoral contém uma mistura complexa formada por células neoplásicas, fibroblastos, células endoteliais, e proteínas da matriz extracelular, macrófagos, neutrófilos, células supressoras da linhagem mielóide, mastócitos, células dendríticas, células NK e linfócitos T e B, todas interagindo de forma a manter um ambiente propício para o desenvolvimento tumoral (FIGUEIREDO, 2019).

Assim, o tumor tem majoritariamente a capacidade de direcionar as demais células para a produção e sustentação da inflamação a seu favor, propagando o seu crescimento e as interações das células tumorais com o sistema imunológico desenham um papel crucial no processo de carcinogênese (GRIVENNIKOV, 2010). Nos tecido malignos é possível encontrar leucócitos, demonstrando assim que os tumores surgem de locais inflamatórios crônicos. As células e citocinas podem influenciar mais para a progressão do tumor do que para a resposta antitumoral levando em consideração os diferentes tipos de tumor e graus de inflamação que cada um apresentam (VICTORINO, 2014).

Os blastos leucêmicos e o microambiente da medula óssea cooperam da mesma forma para o processo de neoangiogênese secretando diferentes fatores de crescimento e mediadores angiogênicos com ação pro-tumorais e autócrinos. O microambiente da LLA é rico em interleucinas e síntese da asparagina que contribui para a resistência ao tratamento, entendendo que o microambiente da medula óssea tem grande relevância na resistência das leucemias agudas a quimioterapia (AYALA *et al.*, 2009).

Neste contexto, os macrófagos associados ao tumor (TAMs), predominam sob o perfil M2 com função de supressão imunológica, anti-inflamatório, caracterizado pela diminuição na sua função imune. Isso promove o tumor e possibilita a ocorrência de eventos mitóticos, além de influenciar positivamente no crescimento do tumor. Sabe-se que em alguns tumores a superexpressão de TAMs prediz mal prognóstico (ZHOU, 2017). Os macrófagos do fenótipo M2 produzem preferencialmente o fator de crescimento do endotélio vascular alfa (VEGF- α) e nutrição facilitando o processo de metástase. Na leucemia, os macrófagos infiltrados são denominados de macrófagos associados à leucemia (LAMs), e estão diretamente associados à progressão da doença. A presença do fenótipo M2 tem sido associada ao pior prognóstico na LLA (LI, 2019).

Os neutrófilos, também infiltrados neste microambiente, atuam na promoção do tumor, quando estimulados por TGF- β 1. Esta ativação é capaz de gerar instabilidade genômica, uma vez que os neutrófilos quando ativados

liberam espécies reativas de oxigênio (EROS), capazes de se ligar no DNA e gerar mutações. Também produzem VEGF- α , que é um mediador importante para garantir a expressão de progenitores hematopoiéticos e endoteliais (FIGUEIREDO, 2019). Tanto VEGF- α quanto TGF- β 1 são importantes para a geração de progenitores hematopoiéticos, atuando na diferenciação celular (CHANGWON *et al.*, 2004). Assim, a desregulação na produção destas citocinas pode potencialmente afetar o processo normal de diferenciação celular na medula óssea.

Avanços têm sido descritos em relação ao entendimento do papel de alguns grupos celulares e seus mediadores presentes no microambiente tumoral nas leucemias. As células T específicas têm sido discutidas como potencial foco para uma abordagem imunoterapêutica (MANLOVE, 2015). As células T reguladoras (Tregs), por exemplo, suprimem respostas imunes anti-leucemia e mantêm a homeostase medular. No entanto, na LLA, estas células parecem estar desreguladas e envolvidas na patogênese da doença. Aumento dos níveis de Tregs na medula óssea, em relação ao sangue periférico, tem sido reportados em crianças com LLA, e este fato parece estar negativamente correlacionado com a presença de blastos (NIEDZWIECKI *et al.*, 2018).

A secreção de TGF β -1 mediada por células leucêmicas tem sido vista como um mecanismo que converte células T na linhagem Treg, o que deve potencialmente acontecer na medula leucêmica devido à alta quantidade de TGF β -1 produzida (MANLOVE, 2015).

Esta mistura complexa de células e mediadores solúveis presentes na medula óssea parece contribuir para a falta de entendimento do papel claro destes fatores nas leucemias. Desta forma, é necessário realizar uma análise pareada do sangue e da medula óssea de pacientes, especialmente na LLA pediátrica, para entendimento da dinâmica de produção e fluxo destas citocinas.

3. OBJETIVO

Objetivo Geral

- Avaliar os níveis de citocinas em sangue periférico e medula óssea de pacientes portadores de LLA-B pediátrica.

Objetivo Específicos:

- a) Mensurar os níveis de TGF- β 1, IFN- γ e TNF- α em amostras de sangue periférico e medula óssea destes pacientes e analisá-los comparativamente.
- b) Correlacionar estes níveis com parâmetros clinicopatológicos da doença.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Este é um estudo retrospectivo longitudinal observacional, recrutou-se todos pacientes com idade entre 0 e 18 anos (n=10) atendidos no período de Janeiro de 2015 a Janeiro de 2017, no Instituto do Câncer de Londrina-Paraná, submetidos ao protocolo de tratamento antineoplásicos padrão baseado no esquema GBTLI 2009 (Protocolo LLA GBTLI, 2009). Esta proposta foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e recebeu parecer favorável (CAAE 24498213.0.0000.5231- anexo 1). De acordo com o protocolo GBTLI 2009, as drogas utilizadas nessa fase foram: prednisona, metotrexato, daunorrubicina, vincristina e asparaginase.

Todos os responsáveis pelos participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes foram avaliados nos intervalos de dias D0 (diagnóstico), D8 (final da semana 1 de tratamento), D15 (final da semana 2 de tratamento) e D28 (final da fase de indução) da fase de indução do tratamento, em relação ao sangue periférico, e D0, D8, D15 e D28 em relação ao sangue da medula óssea. A diferença dos D (dias) de coleta de sangue e medula deve-se às recomendações de coleta descritas no protocolo GBTLI 2009.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo pacientes cujos responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, portadores de LLA-B, que foram submetidos ao protocolo de tratamento GBTLI-2009 e que iriam iniciar a fase de indução.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:

Foram excluídos do estudo os pacientes que não foram submetidos ao protocolo de tratamento, aqueles que não estavam na fase de indução da quimioterapia e pacientes portadores de outro tipo de leucemia.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

Nos tempos do tratamento previamente determinados (D0, D8, D15, D22 e D28) foi coletado sangue periférico e aspirado de medula óssea em tubos de EDTA para determinação dos níveis de citocinas. Estas amostras foram centrifugadas (3500 x g, 5 minutos) para obtenção de plasma. Todas as amostras foram armazenadas em -80°C até o momento da análise.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL HEMATOLÓGICO PERIFÉRICO E MEDULAR

Foi realizado em todos os pacientes deste estudo um acompanhamento clínico e laboratorial através da realização de hemogramas e mielograma (% blastos) para imunofenotipagem e estudo do perfil de evolução da doença.

4.6 DOSAGEM DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Os níveis das citocinas TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ foram medidos através de kits comerciais, ELISA (e-Biosciences, USA) seguindo o protocolo de análise recomendado pelo fabricante. Os kits apresentam sensibilidade de 4 pg/mL.

4.7 CORRELAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA

Os dados obtidos nas análises das citocinas foram associados a parâmetros clínicos e patológicos obtidos durante o seguimento dos pacientes, bem como de dados extraídos de prontuário.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade

da variância para cada variável estudada pelo teste de Levene. Para os dados com distribuição normal, utilizou-se o teste de ANOVA complementado pelo teste de Tukey ou Kruskal-Wallis (na comparação entre mais de 2 grupos de tratamento) ou o teste t de Student (dados paramétricos) ou de Mann-Whitney (dados não-paramétricos) para a comparação entre 2 grupos de tratamento. Também foram realizadas correlações de Pearson entre os parâmetros estudados. Foi considerado significativo sempre que $p < 0,05$. Todos os cálculos foram feitos no software GraphPadPrism 7.0 .

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados em um artigo científico com o título “**Systemic and medullary cytokine profiles of pediatric patients with acute lymphocytic leukemia B during the induction phase of the chemotherapeutic treatment**”, e submetido a revista *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*.

Artigo

ORIGINAL ARTICLE

Systemic and medullary cytokine profiles of pediatric patients with acute lymphocytic leukemia B during the induction phase of the chemotherapeutic treatment

Pamela Regina Brizola da Silva^{1,2}, Geise Hellen Broto¹, Fausto Celso Trigo³, Franciele Ferreira³ and Carolina Panis^{1,2}.

¹Post-Graduation Program in Clinical and Laboratorial Physiopathology, State University of Londrina, Londrina – Paraná, Brazil.

²Laboratory of Tumor Biology, State University of Western Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão – Paraná, Brazil.

³Londrina Cancer Institute, Londrina, Paraná.

Corresponding author

Carolina Panis, PhD

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Centro de Ciências da Saúde – Laboratório de Biologia de Tumores

Rodovia Vitório Traiano, Km2 – Água Branca

Francisco Beltrão, Paraná, Brazil

Phone +55 46 35200715 - Email: carolpanis@hotmail.com

The authors have no conflicts to declare.

Funding: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Bolsas de Produtividade em Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, Fundação Araucária.

Abstract

Introduction: In spite of the high cure rates, the biology of acute lymphocytic leukemia (ALL) is poorly understood. The study of inflammatory mediators profiling in both blood and tumor microenvironment can help to understand disease clinical behavior. **Methods:** This study followed 10 B-ALL patients since the diagnosis until the end of the induction phase, attended from January 2015 to January 2017 at a pediatric oncology public service in South Brazil. Samples were collected according to the Brazilian Group for Lymphoma and Leukemia Treatment 2009 protocol on the days D0 (at diagnosis) and the subsequent weeks of the induction phase treatment (D8, D15, and D28). Cytokine analysis included interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) measurements, performed by ELISA in bone marrow (BM) and peripheral blood plasma (PB). **Results:** Patients were aged from 3 to 12 years, with a range of leucocyte counting from 600 to 54600 white blood cells/mm³. Cytokine levels were very similar between BM and PB in all analyzed weeks. The comparative cytokine profile between BM and PB showed distinct qualitative behaviors according to each evaluated week of the induction phase. IFN- γ showed a behavior of reduction in BM at D8 followed by an upward shift in PB, and TNF- α showed a falling behavior in BM at D15 with a concomitant peak in PB. In the same way, TGF- β 1 was shown to fall in BM at D28 in parallel to its rising in PB. Regarding risk stratification and minimal residual disease status, no significant differences were found when comparing the circulating cytokine levels. Concerning patients' overall survival, a significant augment in TGF- β 1 levels was found in those that remained alive. Further, a strong positive correlation was found between the leucocyte counting at diagnosis and TGF- β 1 levels in BM at the same day. **Conclusion:** It is suggested that the differential profile of cytokines between PB and BM of ALL patients presents a qualitative behavior that may be influenced by the drugs used in the chemotherapy during the induction phase. These results indicated TGF- β 1 as a possible mechanism of action of drug chemotherapy related to patient survival, as well as a possible mediator to be investigated in the other phases of the disease.

Keywords: Acute lymphocytic leukemia B. Cytokines. Induction.

INTRODUCTION

Despite advances in the field of science, ALL remains the leading childhood and adolescent neoplasm and is an important cause of death in this population.¹ As a multifactorial disease, several factors may be associated with poorer outcomes of ALL, including inflammation and the cytokines.

The pathophysiology of Acute lymphocytic leukemia B (ALL-B) can be explained by the complexity of physiological development of bone marrow cells to the formation of mature B lymphocytes. Although poorly elucidated, in malignant lymphocyte clones, aberrant signaling is known to occur mediated by exogenous proteins and cytokines, as well as by type B cell immunoglobulin receptors that alter their genetic programming.²

The normal hematopoiesis process is finely regulated by cytokine production in the medullary microenvironment. They act broadly, controlling functions from differentiation to cellular activation³. However, it is known that the dysregulation in cytokine production that occurs during the chronic inflammatory process appears to be associated with the development and progression of hematologic malignancies, and is mediated by cytokines that do not necessarily affect normal blood production. Some cytokines influence the differentiation, proliferation and survival of immune cells, in addition to regulating the activity and production of other cytokines.⁴

In chronic inflammation, the tumor microenvironment contains a complex mixture of several cells, all interacting in such a way as to maintain a favorable environment for tumor development.⁵ Thus, the tumor has mainly the ability to direct the other cells to the production and support of the tumor inflammation in its favor, spreading its growth.⁶ In this context, the role of cytokines in ALL are still poorly understood, and in some hematological neoplasms, there are controversial data.

Mediators such as tumor necrosis factor alpha (TNF- α) are associated with both normal stem cell expansion and uncontrolled cell proliferation that occurs during leukemogenesis.⁷ Other cytokines, such as transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) has anti-proliferative, pro-apoptotic and homeostatic effects on hematological diseases and may also induce hematopoietic stem cell hibernation⁸, directly affecting the normal production of precursors in the bone marrow.⁹ On the other hand, the excess of this cytokine in the tumor microenvironment may lead to immunosuppression, being related to the pathogenesis of this disease.¹⁰ Similarly, interferon gamma (IFN- γ), another pro-inflammatory cytokine with antineoplastic activity¹¹, also plays a controversial role in leukemia. It is known that contact of normal T lymphocytes with myeloid leukaemic cells, for example, can trigger their production; however, its effect is unknown.¹² IFN- γ still seems to be able to inhibit apoptotic

chronic lymphocytic leukemia cell death¹³ contributing to the increased survival of malignant clones.

Understanding the antagonistic role of these mediators, this study aimed to analyze the behavior of TNF- α , TGF- β 1 and IFN- γ cytokines in peripheral blood and bone marrow samples from pediatric patients diagnosed with ALL-B and possible clinical pathological correlation.

METHODOLOGY

This is a longitudinal retrospective observational study. We recruited all patients aged 0 to 18 years old ($n = 10$) treated from January 2015 to January 2017, diagnosed with ALL-B at the Cancer Institute of Londrina-Paraná, not yet undergoing chemotherapy in other institutions, and who underwent the standard antineoplastic treatment protocol based on the GBTLI 2009 scheme.¹⁵ According to the GBTLI 2009 protocol, the drugs used in this phase were prednisone 60mg/m², daunorubicin 30mg/m², vincristine 1,5mg/m² and asparaginase 5.000 U/m².

On previously determined treatment days (D0, D8, D15, D22 and D28) peripheral blood was collected and bone marrow (D0,D8,D15,D22 and D28) aspirate was collected in EDTA tubes to determine cytokine levels. Blood counts were also performed to determine diagnostic leukometry and leukemia phenotyping. These samples were centrifuged (3500 x g, 5 minutes) to obtain plasma. All samples were stored at -80°C until the time of analysis. All patients in this study had clinical and laboratory follow-up by performing blood counts and myelogram (% blasts) for immunophenotyping and studying the disease evolution profile.

The levels of TGF- β 1, TNF- α and IFN- γ cytokines were measured by ELISA commercial kits (e-Biosciences, USA) following the manufacturer's recommended protocol of analysis. To evaluate the normality distribution of data, the Shapiro-Wilk test was performed and the homogeneity of variance for each variable studied by the Levene test. For data with normal distribution, we used the ANOVA test complemented by the Tukey or Kruskal-Wallis test (when comparing more than 2 groups) or the Student t test (parametric data) or Mann-Whitney test (data not parameters) for comparison between 2 groups. Data were analyzed for possible correlations by Pearson or Spearman tests. It was considered significant a $p < 0.05$. All analyses were performed using GraphPadPrism 7.0 (USA) software.

RESULTS

Table 1. Clinicopathological characterization of the patients included in the study.

Patient	Date of birth	Leukocytes D0	DX D0	DX D7	DX D15 MRD	DX D28 MRD	Death
1	28/12/2002	600	HR-FR	HR-FR	HR-FR /-	HR-FR/-	NO
2	15/08/2003	1200	HR-FR	HR-FR	HR-SR /+	NA	YES
3	26/05/2004	2900	LR-FR	LR-FR	HR-SR /+	HR-SR/+	NO
4	21/09/2002	800	HR-FR	HR-FR	HR-SR /+	HR-SR/+	YES
5	07/02/2008	6700	LR-FR	LR-FR	HR-SR /+	HR-SR/-	NO
6	19/01/2010	9600	LR-FR	LR-FR	HR-SR /+	HR-SR/+	YES
7	29/04/2006	26100	LR-FR	LR-FR	HR-SR /+	NA	NO
8	30/12/2008	54600	HR-FR	HR-FR	HR-SR /+	HR-SR/-	NO
9	05/01/2008	2900	HR-FR	HR-FR	HR-SR /+	HR-SR/-	YES
10	23/02/2011	2100	LR-FR	LR-FR	HR-SR /+	HR-SR/+	NO

Legend: HR - high risk, LR - low risk, FR - fast responder, SR - slow responder, MRD = minimal residual disease, - = no MRD + = presence of MRD, NA = not answering. Dx = diagnosis, D0 = patient at diagnosis, D7 = patient on the seventh day of induction treatment, D15 = patient on the fifteenth day of induction treatment, D28 = patient on the twenty-eighth day of induction.

In total, 10 children were volunteered, aged 3 to 12 years old. The leukocyte count of patients at D0 ranged from 600 leukocytes/mm³ to 54,600 leukocytes/mm³. At diagnosis, half of the patients had high-risk disease, and in D8 20% of patients went from fast to slow responders. In D15 all patients had high-risk disease, with minimal residual negative disease in only 1 of the cases. At the end of induction treatment (D28), 80% of patients were at high risk and 40% with minimal residual disease. Death in the induction phase was observed in 40% of the cases, most of them associated with sepsis (date not show).

The cytokine profile evaluated in bone marrow and peripheral blood revealed behavioral variations throughout the induction phase for the 3 cytokines studied (Figure 1). Bone marrow IFN- γ levels (Figure 1A) ranged from 491.11 \pm 50.89 pg / mL at D0, 426.8 \pm 55.6 at D8, 501 \pm 57.85 at D15 and 508.2 \pm 62.87 in D22. In peripheral blood levels ranged from 422.1 \pm 35.13 pg / mL for D0, 637.8 \pm 106.3 pg / mL at D8, 472.7 \pm 39.98 at D15 and 510.2 \pm 47.65 pg / ml in D28. Comparison of IFN levels between different treatment days revealed no statistical significance in either

bone marrow or peripheral blood. The blood versus marrow comparison was not statistically significant either; however, a qualitative analysis shows a pattern of behavior of this cytokine in relation to different days of treatment. At the same time that there was a reduction of this cytokine in the bone marrow in D8, there was an increase in its concentration in the peripheral blood.

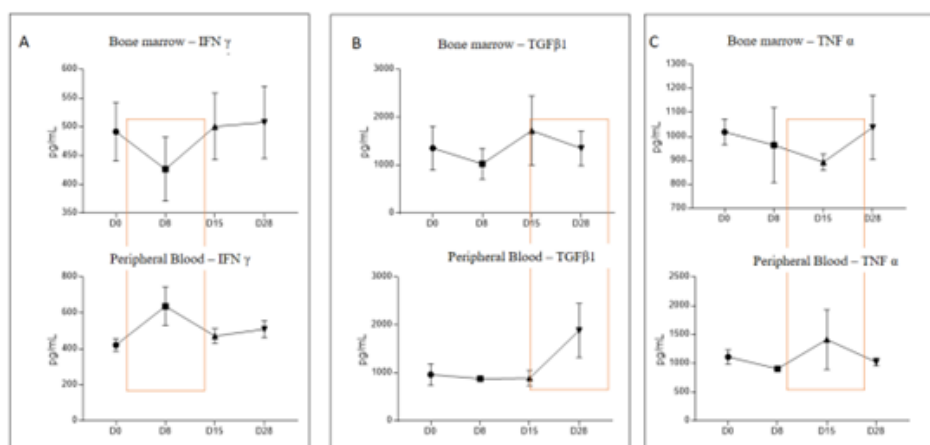


Figure 1- General profile of IFN- γ , TGF- β 1 and TNF- α levels in blood and marrow samples collected on different days of chemotherapy induction treatment. D0 = samples at diagnosis, D8 = samples collected on the eighth day of treatment. TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), IFN- γ (interferon gamma), and TNF- α (tumor necrosis factor alpha).

Figure 1B shows TGF- β 1 levels. In the bone marrow this cytokine presented oscillating levels between 1361 ± 456 pg / mL at D0, 1033 ± 321 pg / mL at D8, 1723 ± 721 pg / mL at D15 and 1355 ± 362.5 pg / mL at D28. And at peripheral blood levels were 967.5 ± 224.6 pg / mL at D0, 880.8 ± 9.25 at D8, 893.5 ± 157.1 pg / mL at D15 and 1886 ± 561 pg / mL at D28. As for IFN- γ , the analysis between the different days of treatment as well as the comparison between blood and bone marrow was not significant. Qualitative analysis of TGF- β 1 levels suggests a potential migration of the marrow into the blood, as a reduction in this marrow cytokine was observed in D28 with concomitant increase in peripheral blood.

For TNF- α (Figure 1C), no changes were observed over the days of treatment in either bone marrow (1019 ± 53.81 pg / mL for D0, 964 ± 156.2 pg / mL for D8, 893.4 ± 34.05 pg / mL for D15 and 1038 ± 132.9 pg / mL for D28) as in blood (1113 ± 124.1 pg / mL for D0, 907.7 ± 35.64 pg / mL for D8, 1416 ± 518.3 pg / mL for D15 and 1023 ± 68.1 pg / mL for D28). The comparison between blood and bone marrow showed no significance on any of the treatment days. As with the other cytokines, we

observed a decrease in TNF- α levels in the bone marrow at D15 and an increase in peripheral blood levels on the same day of treatment.

No statistical difference was observed between blood cytokine levels and risk stratification of patients at D0 (Figure 2: 456.4 \pm 57.97 pg / mL for high risk IFN- γ , 468.3 \pm 41.2 pg / mL for low risk IFN- γ , 603.8 \pm 115.8 pg / mL for high risk TGF- β 1, 1285 \pm 555.1 for low risk TGF- β 1, 1031 \pm 71.27 pg / mL for TNF- α high risk and 1138 \pm 135.1 pg / mL for low risk TNF- α).

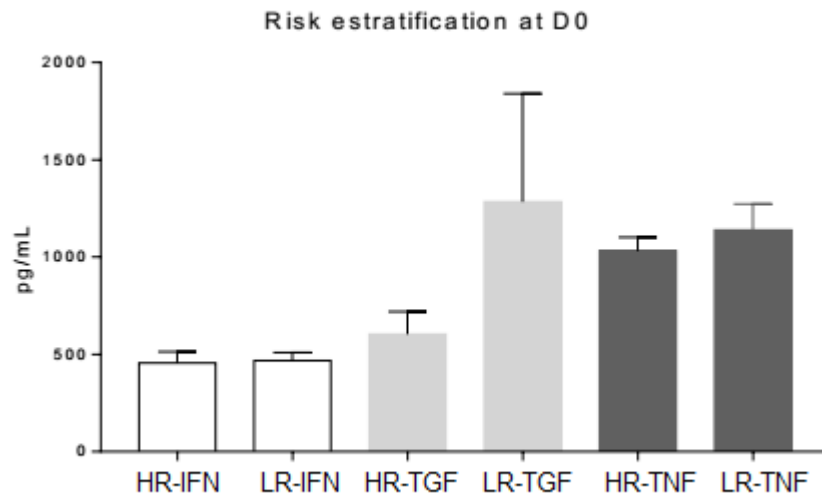


Figure 2 - Circulating cytokine levels according to diagnostic risk stratification in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia B. HR = high risk, LR = low risk. TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), IFN- γ (interferon gamma), and TNF- α (tumor necrosis factor alpha).

Regarding the presence of minimal residual disease (MRD) in peripheral blood in D28 (Figure 3), no variations were observed in the cytokines studied (521.6 \pm 100.5 pg / mL for IFN- γ positive MRD, 484.8 \pm 70.09 pg / mL for negative MRD IFN- γ , 1354 \pm 472.9 pg / mL for positive MRD TGF- β 1, 2339 \pm 800.9 pg / mL for negative MRD TGF- β 1, 877.1 \pm 104.1 pg / mL for positive MRD TNF- α and 1204 \pm 227.6 pg / mL for negative MRD TNF- α).

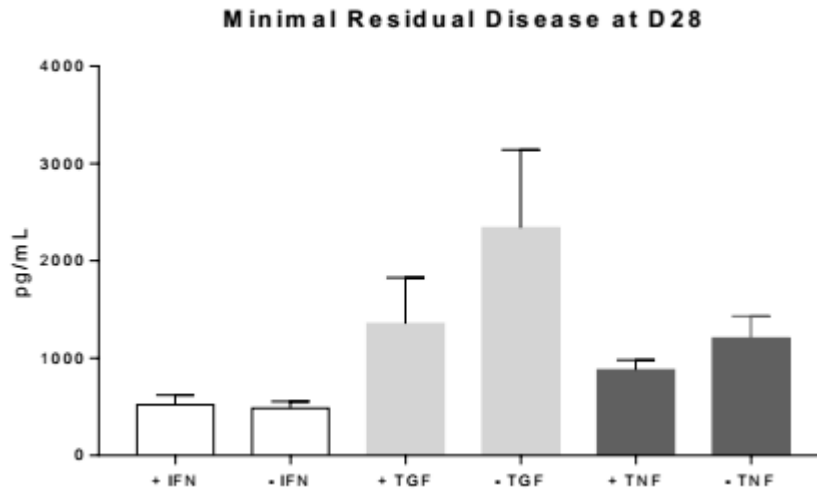


Figure 3 - Circulating cytokine levels according to the presence of minimal residual disease on the last day of induction treatment (D28) in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia B. TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), IFN- γ (interferon gamma), and TNF- α (tumor necrosis factor alpha).

Comparative analysis of circulating cytokine levels according to patient survival profile (Figure 4) revealed high levels of TGF- β 1 in those who remained alive compared to those who died (1284 ± 376.6 pg / mL in the living). and 473.3 ± 43.78 pg / mL in those who died, $p = 0.0462$), with no significant variation in the other cytokines (464.1 ± 43.94 pg / mL for IFN- γ in the living, 1096 ± 92.92 pg / mL for TNF- α in the living, 508.9 ± 73.24 pg / mL for IFN- γ at death and 1009 ± 98.9 pg / mL for TNF- α at death).

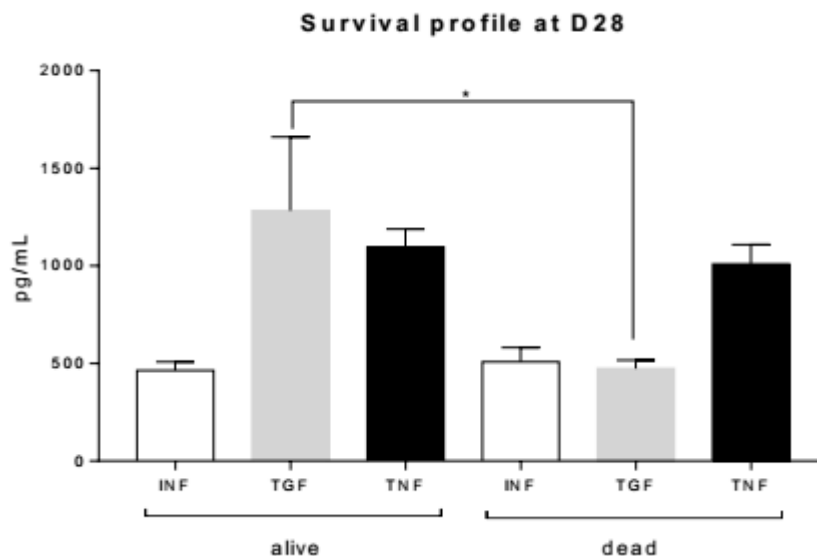


Figure 4 - Comparative analysis of circulating cytokine levels according to survival profile in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia B. TGF- β 1 (transforming growth factor beta 1), IFN- γ (interferon gamma), and TNF- α (tumor necrosis factor alpha), * $p < 0,05$.

DISCUSSION

This study shows the differential expression profile of IFN- γ , TNF- α and TGF- β 1 cytokines between bone marrow and peripheral blood of ALL patients undergoing induction, and their association with clinic pathological parameters.

About the clinic pathological profile at diagnosis, it was observed that half of the patients had high risk disease, while in D7 it was observed that 20% of patients evolved from fast to slow responders, with total conversion of all patients to high risk disease on D15. This fact directly implies the risk of lethality due to treatment toxicity, as those patients who do not have a good response are directed to another chemotherapy group to receive intensification. When the patient responds well to

chemotherapy, some medications are removed so that there isn't so much aggression to the body.¹⁴ It was also observed that at the end of D28 a good part of the patients died due to infectious processes (about 40 %), contrary to literature statistics that indicate an average survival of 80% in ALL.¹⁵ These data point to the occurrence of a more aggressive disease in these patients, and highlights the need to better understand the molecular mechanisms involved in the response to the induction phase of chemotherapy treatment.¹⁶

Considering that the cytokine profile between bone marrow and blood showed no statistical differences, but a variation behavior was detected suggesting migration of the tumor microenvironment to the blood in all studied individuals, it was decided to conduct a qualitative discussion of this phenomenon, presented next.¹⁷

The analysis of the comparative profile of cytokines between peripheral blood and bone marrow shows a potential reflex of these cytokines from the tumor microenvironment to the periphery, on specific days of the induction phase. Although no quantitative statistical variations were observed in this comparison, the cytokine profile in the studied ranges showed a qualitative variation, suggesting that they move from one environment to another throughout the induction. Cytokines can be produced in both blood and bone marrow, and it appears that drug entry at different weeks of induction affects this dynamic. Both peripheral TNF- α and TGF- β 1 and IFN- γ levels are regulated by cells in the bone marrow corroborating the idea that there is complementarity between the levels of these substances between blood and marrow¹⁸.

Chemotherapy, by killing malignant leukemic clones, makes room for normal cells in the marrow and small blood to be reactivated and can resume the Th1 response pattern of tumor immunity.

In D0, which represents the patient's state at diagnosis without treatment, it was observed that blood cytokine levels between blood and bone marrow were similar, with a predominance of TNF- α and TGF- β 1 levels, and lower IFN- γ levels. Observed levels may be considered high when compared with healthy individuals and may possibly be associated with common cancer phenomena such as cytokine release syndrome, common in individuals with hematologic malignancies¹⁹.

Initially, we evaluated the behavior of IFN- γ , which showed a qualitative variation of its levels in the first treatment block (D8), indicating a fall in the bone marrow with a concomitant increase in the periphery. These data may suggest a possible departure of interferon-producing clones from the bone marrow or their consumption in the bone marrow. Another possibility is that with the initial death of bone marrow malignant clones, normal cells will start producing IFN- γ in response to the recognition of leukemic antigens present in the malignant cells and released by

chemotherapy-killed leukemic clones, as predicted in the normal functioning of the immune response against tumors.²⁰

In D15, a similar qualitative variation profile was also observed in relation to TNF- α , with bone marrow reduction and increase in peripheral blood. This cytokine is directly associated with the maintenance of aberrant leukemia hematopoiesis²¹, and its consumption in the bone marrow may represent an attempt to survive the leukemic clones that are being attacked by treatment, or the activation of normal cells that have come to recognize tumor antigens and were activated in peripheral blood.

The role of TGF- β 1 in ALL is known, and it shows an association with the development and evolution of the disease related to the Th2 immune response pattern triggered by MHC type II antigens produced by leukemic cells, which has the ability to induce production of this cytokine²². TGF- β 1 levels showed visible qualitative variations in D28, suggesting that this cytokine migrates from the marrow to the peripheral blood. This may indicate that TGF- β 1-producing leukemic cells are more active in the periphery, or that the consumption of this cytokine in the medulla is higher than in the blood in D28. Consumption of cytokines in the medullary environment has already been described, and may occur within 7 days. Production of cytokines such as TGF can occur at 24h intervals²³.

Although qualitative, the observed variations suggest a dynamics induced by chemotherapy treatment, which suggests a sequence of events formed by IFN- γ , TNF- α and TGF- β 1, in this order, over the weeks of ALL induction. Drugs used in chemotherapy are known to induce immediate cytokine secretion, as documented in breast cancer patients²⁴ and in healthy blood cells treated with chemotherapy for only 1 hour.²⁵

No relationship was observed between IFN- γ , TNF- α and TGF- β 1 levels and the risk stratification profile at the diagnosis of the patients studied. Greater variability of TGF- β 1 levels was observed in individuals categorized as low risk, but without statistical significance. Risk stratification is the fundamental parameter for projecting the prognosis of leukemia patients, and is based on gender, age, leukocyte count at diagnosis, immunophenotyping examination, and genotype of leukemic cells.²⁶ Likewise, the presence Minimal residual disease (MRD) is of paramount importance, considered as a prognostic indicator in childhood ALL to stratify risk groups, identify relapse risk and guide therapeutic strategies.²⁷ These findings suggest that the factors currently used for risk stratification are superior and do not suffer from interference from the evaluated cytokines.

No association between cytokine levels and MRD was found in D28. A better prognosis is related to negative rates of OMR in the first month of treatment, and even if a patient has complete remission, may still have a tumor burden that may lead to a high risk of future relapse.²⁸

The presence of MRD is a direct indicator of the presence of residual neoplastic cells and these are more difficult to eliminate due to the accumulation of mutations and survival mechanisms over the 28 days of induction. For some patients, it may be that these cytokines may affect the presence of MRD, as in some cases high levels of these substances were observed in those individuals with a worse prognosis. Although the exact role of TGF in MRD is unknown, Tamai *et al.*, (2017) points out that this cytokine is directly linked to the development of chemo resistance, corroborating the profile we found when analyzing those patients with the worst response to treatment.

TGF- β 1 appears to be the crucial cytokine in human ALL, and was significantly related to patient survival according to our study (Figure 5). Higher survival compared patients compared with deaths were found to have a higher blood concentration of TGF- β 1 at the end of induction (D28), suggesting that TGF produced by normal cells plays a role in the normal functioning of hemopoiesis.²⁹

This highlights the controversial role of TGF- β 1 in ALL, as there was a strong correlation between leukocyte count at diagnosis, consisting mostly of leukemic clones and peripheral blood TGF levels, and further studies are needed to investigate TGF- β 1 to see if it can be used as a possible mediator.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to patients and their families, as well as to funding agencies.

REFERENCE

- 1 Ferreira JD, Couto AC, Alves LC, Oliveira MSP, Koifman S. Leukemia BCSGIA. Environmental exposures and childhood leukemias in Brazil: an exploratory analysis of their association. *Rev Bras Est Pop.* 2012, Rio de Janeiro. 29 (2) 4:77-492.
- 2 Hockenberry MJ, Taylor OA, Gundy PM, Ross AK, Pasvoqel A, Montgomery D, et al. F2-isoprostanes: a measure of oxidative stress in children receiving treatment for leukemia. *Biol Res Nurs.* 2014; 16(3): 303 – 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956352>
- 3 Lorenzi, T.F. Fundamentals of morphology, physiology, pathology and clinic. Ed, Atheneu, 1st ed., SP, 2010. *Blood.* 2006 June 15; 107 (12): 4589–4596.
- 4 Oliveira, C.M.B de. Cytokines and Pain. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011, 61 (2):255-265.
- 5 Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* 2008,11(2).
- 6 Garcia, J.B.S. Cytokines and Anesthesia. *Rev. Bras. Anesthesiol.* 2002. 52 (1):86-100.
- 7 Figueiredo CRLV. The intriguing paradox of cancer-associated inflammation: an update. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 2019; 55 (3):321-332.
- 8 Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation and cancer. *Cell.* 2010; 140 (6): 883-99.
- 9 Tian T, Wang M, Ma D. TNF- α , a good or bad factor in hematologic diseases. *Investigation.* 2014. 1(12).
- 10 Terme JM, Lemaire S, Auboeuf D, Mocquet V, Jalinot P. The proto-oncogenic protein TAL1 controls TGF- β 1 signaling through interaction with SMAD3. *Biochim Open.* 2016, 2, 69–78.
- 11 Satoshi Y, Atsushi I, Shin-ichiro T, Koji E, Hideo E, Hiromitsu N; TGF- β as a bone marrow niche candidate signals to induce hematopoietic stem cell hibernation. *Blood* 2009.113 (6):1250-1256.
- 12 Dong M, GC Blobe. Role of transforming growth factor beta in hematologic malignancies. *Blood.* 2006.107(12): 459-4596.
- 13 Jobim M, Jobim L.F. Natural killer and immunological cells. *J. Pediatr.* Rio Janeiro 2008. 84 (4): 58-S67.

- 14 Ersvaer, E., Skavland, J., Ulvestad, E. et al. Effects of interferon gamma on native human cells of acute myeloid leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2007. 56 (1): 13.
- 15 Buschle M, Campana D, Carding SR, Richard C, Hoffbrand AV, Brenner MK. Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in chronic B-cell lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 1993.177 (1):213-218.
- 16 GBTLI LLA-2009, Brazilian Childhood Leukemia Treatment Group, Boldrini Institute, Campinas-SP.
- 17 Ferreira JD. Couto AC. Alves LC. Oliveira MSP. Koifman S. Leukemia BCSGIA. Environmental exposures and childhood leukemias in Brazil: an exploratory analysis of their association. *Rev Bras Est Pop*.2012, Rio de Janeiro. 29 (2) 4:77-492.
- 18 Rock CRR. Mechanisms of resistance to chemotherapeutic in tumor cells. PhD Thesis in Biotechnology. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2015.
- 19 Laranjeira, P. Effect of bone marrow on the production of cellular stomach cell cytokines by naive peripheral blood, memory and effector T cells. *StemCell Res Ther*. 2015 January. 5(6): 3. doi: 10.1186 / scrt537.
- 20 Geyer MB.Ravière I. Senechal B. Wang X. Purdon TJ. Hsu M. et al. Autologous CD19-targeted CAR T cells in patients with residual CLL after initial analogue purine-based therapy. *Mol Ther*. 2018. 26 (8): 1896-1905.
- 21 Knustson KL.DISIS ML. T-cells specific for tumor antigens in cancer immunity and immunotherapy.*Immunol Immunother*. 2005. 54(8):721-8.
- 22 Zhou F, Zhang W, Wei Y, Zhou D, Su Z, Meng X, et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. *Leuk Res*. 2007.31:387–93.
- 23 Manlove LS. Katherine EBV, Kristen EP, Richard TW, Marc KJ.Michael A. Farrar Leukemia-adaptive and inhibited by cross-reactive regulatory T-cell immunity. *J. Immunol*, 2015. 195 (8).
- 24 Sensebe, L. Human marrow stromal cell release and consumption.*Br. J. Haematol*. 1997.98 (2) 274-82.

25 Panis C. Herrera ACSA. VICTORINO VJ. AMAN ARANOME CECCHINI R. Screening of TGF-beta1 circulating level and its clinical-pathological significance in human breast cancer. *Anticancer research*. 2013. 33:737-742.

26 Panis C. Victorino VJ. Herrera AC. FC Fields. Glued S, et al. Immunological effects of Taxol and Adryamicin in breast cancer patients. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2012. 61:481-488.

27 Hagedorn N. Acquaviva C. Fronkova E. Von S. Barth A. Zur. S. et al. Submicroscopic involvement of the bone marrow in isolated extramedullary recurrences in childhood acute lymphoblastic leukemia: a more precise definition of "isolated" and its possible clinical implications, a collaborative study by the Resistant Diseases Committee of the international MAB study group. *Blood*. 2007. 110:4022-2929.

28 Pieters, R .; Carrol, W.L Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *PediatrClin N Am*, 2008. 55:1-20.

29 Blank, U. Karlsson TGF- β signaling for hematopoietic stem cell control. *Blood*. 2015. 125(23):3542-50.

6. CONCLUSAO

Este estudo pode concluir que houve um diferencial no padrão qualitativo no perfil de citocinas no sangue e medula óssea de pacientes com LLA infantil pode ser observado que existe um padrão qualitativo de comportamento das citocinas analisadas que podem estar sendo influenciadas pelas drogas utilizadas ao longo da fase de indução da quimioterapia, e dentre as citocinas a que mais mostrou um diferencial quando comparado a sobrevida dos pacientes foi o TGF- β 1, sendo necessário mais estudos com intuito de investigar o TGF- β 1 para ver se pode ser utilizado como um possível mediador.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.R.; LUISA, C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, Feb. 2005.

ALVES, G.V.A. Caracterização Hematológica e Imunofenotípica em Pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda. (Tese). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

ARANHA, F.J.P. Leucemia Mielóide Crônica: transplante de medula óssea. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 30, supl. 1, p. 41-46, Abr. 2008 .

AYALA, F. D.R.; KIERAN, M.; KALLURI, R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. **Leukemia**. V.23, p. 2233-41, 2009.

BAIN, B.J.; PATH, F.R.C. Diagnosis from the Blood Smear. **N Engl J Med**, v.5 n.353, p.498-507, 2005

BARBOZA, L. P.; SOUZA, J.M.; SIMOES, F.V.; BRAGANÇA, I.C.; AHDELHAY, E. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em Leucemia Mielóide Crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 22, n. 2, p. 89-98, Aug. 2000.

BERGANTINI, A. P. F.; CASTRO, F. A.; SOUZA A.M.; FETT-CONTE, A. C. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 27, n. 2, p. 120-125, June 2005.

BITTENCOURT, R.; FOGLIATO L.; DAUDT, L.; BITTENCOURT, H.N. S., FRIEDERICH, J.R., FERNANDES, F. et al. Leucemia Mielóide Aguda: perfil de duas décadas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre - RS. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 25, n. 1, p. 17-24, Mar. 2003.

BOGDAN, M.; MERTAS, A.; SÓNTA-JAKIMCZYK, D. SZCZEPANSKI, T.; JANIK-MOSZANT, A. Concentration of IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF-ALPHA in

children acute lymphoblastic leukemia after cessation of chemotherapy. **Hematological Oncology**, V 1, n. 22, p. 27–34, 2004.

BONASSA, E.M.A. Enfermagem em quimioterapia. **Atheneu**. São Paulo, 1992

BORTOLHEIRO, T.; CHIATTONE, C. Chronic Myeloide Leukemia: natural history and classification. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 30, supl. 1, p. 3-7, Apr. 2008.

CAVALCANTE, A.G.M; BRUIM, P.F.C. The role of oxidative stress in COPD: current concepts and perspectives. **J. Bras. Pneumol**. V.35, supl.12, p. 1227-1237, 2009.

CAZÉ, M.O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E.F. Estudo Referencial de um Protocolo Quimioterápico para Leucemia Linfocítica Aguda Infantil. **Clinical & Biomedical Research**. V. 30, n. 1, apr. 2010.

CHANGWON P.; IVA A.; YUN SHIN C.; WEN J.Z.; ELIZABETH A.; GUO H.F.; ALEXANDER ,R.; KYUNGHEE, C. A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. **Development and disease**. V. 131,n.11, 2004.

CHAUFFALLE, M.L. L. F. Importância do cariótipo em leucemia linfocítica crônica: relato de 18 casos. **Jornal Brasileiro de Medicina Laboratorial**. V.40, n.2, p.75-8, 2004.

CHIARINI, F. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular Cell Research**. V. 1863, Ed. 3, p. 449 -463, 2006.

DANESHMANDI, S. Transduced Mesenchymal Stem Cells Have Profound Modulatory Effectson DC sand T Cells. **Iran J Immunol**. V.14,n.1,p.13-23. Mar, 2017.

DANTAS, G.K.S. Diagnóstico diferencial da leucemia linfóide aguda em pacientes infanto-juvenis. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**. V.13, n.2, p.3-18, Três Corações, 2015.

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

FARIAS, M. G. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. V.40, n.2, p.91-8, 2004.

FAYAD, L.; KEATING, M.J.; REUBEN, J.M.; O'BRIEN, S.; LEE, B-N.; LERNER, S.; KURZROCK, R. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. **Blood**. V, 97 n.1, p. 256–263. 2001.

FIDANZA, M. SEIF, A.; JO, S.; KARIMINIA, A.; ROLF, N.; SLY, L.; GRUPP, S.; REID, G. IFN- γ directly inhibits murine B-cell precursor leukemia-initiating cell proliferation early in life. **European Journal of Immunology**, 2017.

GARNICA, M.; NUCCI, M. Epidemiologia, tratamento e profilaxia das infecções na leucemia linfóide crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto. V. 27, n. 4, p. 290-300, Dec. 2005 .

GREAVES, M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. **Nature**. V. 6, p. 193-203, 2006.

HAMERSCHLAK, N. Leucemia: fatores prognósticos e genética. **Sociedade Brasileira de Pediatria**, 2008.

HEALY, J. ROY-GAGNON, M.; SINNETT, D. No evidence for association between TGF β 1 promoter SPPs and the risk of childhood pre-B acute lymphoblastic leukemia among French Canadians. **Hematologica**. V. 94, p. 1034-1035. 2009.

HERRARA, A.C.S.A.; PANIS, C.; VICTORINO, V.J.; CAMPOS, F.C.; COLADO-SIMÃO, A.N.; CECCHINI, A.L.; CECCHINI, R. Molecular subtype is determinant

on inflammatory status and immunological profile from invasive breast cancer patients. **Cancer Immunol Immunother.** V. 61, p. 2193-2201. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER (INCA). Tipos de Câncer: Leucemia. 2002. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/leucemia> acesso em 10 de set. de 2019.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade. **INCA.** Rio Janeiro, 2018.

JAIMES-PÉREZ, J. C., GAMBOA-ALONSO, C.M., JIMÉNEZ-CASTILHO, R.A., LÓPEZ-SILVA, L.J., PIEZÓN-URESTI, M. A., LEÓN, A.G. GÓMEZ-ALMAGUER, D. TNF- α increases in the CSF of children with acute lymphoblastic leukemia before CNS relapse. **Blood Cells, Molecules, and Diseases.** V 63, p 27 -31, 2017.

JIN, F.; LIN, H.; GAO, S.; HU, Z.; ZUO, S.; SUN, L.; JIN, C.; LI, W.; YANG, Y. The anti-tumor role of NK cells in vivo pre-activated and re-stimulated by interleukins in acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget.** V.7, n. 48.2016.

LI, Y, You M, J, Yang Y, Hu D, Tian C: The Role of Tumor-Associated Macrophages in Leukemia. **Acta Haematol** 2019.

LIMA, M.C.; SILVA, D.B.; FREUND, A.P.F.; DACOREGIO, J. S.; COSTA, T.E.J.B.; COSTA, IMARUÍ, F.D.; SILVA, M.L. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. **J. Pediatr.** (Rio J.). V. 92, n. 3, p. 283-289, Porto Alegre. June, 2016 .

LOPES, N.R.; ABREU, MARIA T.C. L. Inibidores de tirosina quinase na leucemia mieloide crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** V. 31, n. 6, p. 449-453. São Paulo, 2009 .

MEI, D.; BLOBE, C. G. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. **Blood.** V. 107, n.12. Jun. 2006.

METZE, I.L. LLC: Critérios diagnósticos, imunofenotipagem e diagnóstico diferencial. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 27, n. 4, p. 233-235, Dec. 2005 .

NIEDŹWIECKI, M.; BUDZIŁO, O.; ZIELIŃSKI, M.; Adamkiewicz-Drożyńska, e.; Maciejka- Kembłowska, L.; Szczepański, T.;Trzonkowski, P.. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}FoxP3⁺ Regulatory T Cell Subpopulations in the Bone Marrow and Peripheral Blood of Children with ALL: Brief Report. **Journal of Immunology Research**. VI. 2018. 2018.

ONUCHI, A.C.; CHAMMAS, R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev. Med. Sao Paulo**. V. 89, n.1, p 21-31. Mar, 2010.

PEI, S.;JORDAN, C.T. How close are we to targeting the leukemia stem cell. **Best Practice & Research Clinical Haematology**. V. 25, p. 415–418, 2012.

RIUL, S.; AGUILLAR, O.M. Quimioterapia Antineoplasica: revisão de literatura. **Rev. Min. Enf.**, V.3. Jan/ Dez. 1999.

ROUCE,R.H.;SHAIM,H.;SEKINE,T.;WEBER,G.;BALLARD,B.;KU,S.;BARESSE, C.; MURALI, V.K.;WU, M.; LIU, H.; SHPALL, E.; BOLLARD, C.; RABIN,K.; REZVANI,K. The TGF-B pathway is an important mechanism for NK cell evasion in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**. V.30, n. 4. Dec. 2015.

SANCHEZ. C. B.; BERGUA J.M.; CAMPOS, C.; GAYOSO, I.; ARCOS, M.J.; BAÑAS, H.; MORGADO, S.; CASADO, J.G.; SOLANA, R.; TARAZONA, R. Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels .**Cytokine**. V.61, n. 3, p.885-91. March, 2013.

SILVA, G.C.; PILGER, D.A.; CASTRO, S, M.;WAGNER, S.C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 2, p. 77-84, Apr. 2006.

SOOSAY RAJ, T. A.; SMITH, A. M.; MOORE, A. S. Vincristine sulfate liposomal injection for acute lymphoblastic leukemia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 4361–4369, 2013.

SOSSELA, F. R.; ZOPPAS, B.C.A.; WEBER, P.L.; Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnósticos e principais alterações observadas no hemograma. **Revista Brasileira de Análises Clínicas** – RS, 2017.

SHULING WU M.D. REINHARD GEßNER M.D., PH.D. AREND VON STACKELBERG M.D. RENATE KIRCHNER PH.D. GUENTER HENZE M.D., PH.D. KARL SEEGER M.D., PH.D. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. Correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. **Cancer**. V 103, n. 5, p. 1054-1063. March 2005.

TAMAI, M.; FURUICHI, Y.; KASAI, S.; ANDO, N.; HARAMA, D.; GOI, K.; INUKAI, T.; KAGAMI, K.; ABE, M.; ICHIKAWA, H.; SUGITA, K. TGF β 1 synergizes with FLT3 ligand to induce chemoresistant quiescence in acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. **Leukemia Research**. V. 61, p. 68-76. Oct. 2017.

VICTORINO, V.J.; JEREMIAS, I.C.; ASSUNÇÃO, K.M. IMMUNOLOGICAL PROCESSES IN CANCER: A LINK BETWEEN INFLAMMATION AND IMMUNITY. **American Journal of Immunology** . V.10,n.2, p. 93-106, 2014.

YAMAMOTO M.; FIGUEIREDO V.L. P. Epidemiologia da leucemia linfocítica crônica e leucemia linfocítica crônica familiar. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 27, n. 4, p. 229-232, Dec. 2005.

ZHOU, X. LI, X. ZHOU, J. Tumor necrosis factor α in onset and progression of. **Experimental Hematology**, v. 45, p. 17–26, 2017.

ANEXO

ANEXO A: Parecer de aceite do comitê de ética



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
Universidade Estadual de Londrina
Registro CONEP 5231

Parecer CEP/UEL:	245/2013
CAAE:	24498213.0.0000.5231
Data da Relatoria:	13/12/2013
Pesquisador(a):	Fausto Celso Trigo
Unidade/Órgão:	Programa de PG em Patologia Experimental

Prezado(a) Senhor(a):


O "Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina" (Registro CONEP 5231) – de acordo com as orientações da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:

"Investigação dos mecanismos oxidativos potencialmente associados à resposta ao tratamento quimioterápico da leucemia linfocítica aguda (LLA)"

Situação do Projeto: **Aprovado**

Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL, via Plataforma Brasil, relatório final da pesquisa.

Londrina, 13 de dezembro de 2013.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina

