



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**IMPACTO DA FASE DE INDUÇÃO DA QUIMIOTERAPIA NO
PERFIL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS E
DO MICROAMBIENTE TUMORAL NA LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA DA INFÂNCIA**

Londrina
2021

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**IMPACTO DA FASE DE INDUÇÃO DA QUIMIOTERAPIA NO
PERFIL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS E
DO MICROAMBIENTE TUMORAL NA LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA DA INFÂNCIA**

Tese de doutorado apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Fisiopatologia clínica e laboratorial.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Panis

Londrina
2021

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

- O48 Oliveira, Geise Ellen Broto Oliveira.
Impacto da fase de indução da quimioterapia no perfil de mediadores inflamatórios sistêmicos e do microambiente tumoral na leucemia linfocítica aguda da infância / Geise Ellen Broto Oliveira Oliveira. - Londrina, 2021.
106 f.
- Orientador: Carolina Panis.
Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2021.
Inclui bibliografia.
1. leucemia linfóide aguda - Tese. 2. proteômica - Tese. 3. Mediadores inflamatórios - Tese. 4. Estresse oxidativo - 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.

GEISE ELLEN BROTO OLIVEIRA

**IMPACTO DA FASE DE INDUÇÃO DA QUIMIOTERAPIA NO
PERFIL DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS E
DO MICROAMBIENTE TUMORAL NA LEUCEMIA
LINFOCÍTICA AGUDA DA INFÂNCIA**

Tese de doutorado apresentado à
Universidade Estadual de Londrina - UEL,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutora em Fisiopatologia clínica e
laboratorial.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Daniele Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Marla Amarante
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra Vanessa Jacob Victorino
Instituto Federal do Rio de Janeiro - IFRJ

Prof. Dra. Fernanda Tomiotto-Pellissier
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 03 de Dezembro de 2021

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, pois por Ele são todas as coisas, por ter me capacitado e por me dar condições, em todas as áreas, de chegar até aqui.

À Prof^a. Dra. Carolina Panis, minha orientadora e amiga de todas as horas, que há alguns anos se dispôs a estar comigo nessa jornada. Muito obrigada por me carregar no colo cientificamente, me passar todo seu conhecimento e amor pela ciência, por me mostrar que todo trabalho tem muito significado nesse universo que é a ciência. Ela me dizia: “Você decide como vai estar daqui 4 anos, com ou sem doutorado, porque o tempo vai passar de qualquer maneira” e, aqui estou, finalizando mais um ciclo!

Ao meu esposo Lucio, que esteve comigo em cada momento, quando sorria e quando eu chorava, tinha sempre uma palavra de tranquilidade ao meu coração, me incentivando e me fazendo enxergar as coisas com leveza. Amo você!

Às minhas filhas Rebeca, Victória e Cecília, por entenderem o meu trabalho e a minha ausência tantas vezes. Amo vocês.

Aos meus pais, que tanto me apoiaram, sempre me incentivando e encorajando. Amo muito vocês.

Ao Dr. Fausto Celso Trigo, pelo apoio, contribuição e parceria neste trabalho, sua ajuda foi fundamental na realização desse estudo.

Ao Sr. Edmilson Garcia, diretor do hospital do câncer de Londrina, pelo apoio e amizade. Sua contribuição foi essencial para conclusão desse trabalho. Que o Senhor continue te abençoando nessa missão tão importante que leva esperança a tantas pessoas, sejam pacientes ou colaboradores. Muitas vidas têm sido abençoadas através da sua.

Ao professor Décio Sabbatini, pois me orientou durante um período e me mostrou a seriedade e honestidade no universo acadêmico. Admiro muito ele.

Aos demais professores que contribuíram com a minha formação ao longo desses anos. Vocês com certeza enriqueceram a minha bagagem de conhecimento.

As professoras da banca, pela contribuição e os apontamentos realizados.

Aos meus familiares, por estarem sempre presentes todas as vezes que precisei. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas de classe e jornada, pelo companheirismo e parceria. Muito sucesso a todos!

“Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento” Provérbios 2:6

..

OLIVEIRA, Geise Ellen Broto. Impacto da fase de indução da quimioterapia no perfil de mediadores inflamatórios sistêmicos e do microambiente tumoral na leucemia linfocítica aguda da infância. 2021. 103 p. Tese de Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é a principal neoplasia da infância cujo tratamento se baseia na poliquimioterapia dividida em fases (indução, consolidação e manutenção). A indução consiste em uma etapa determinante para o bom prognóstico dos pacientes portadores de LLA e no uso intensivo de drogas antineoplásicas combinadas no período de 28 dias, escalonados do dia 0 (D0 - ao diagnóstico), ao dia 28 (D28 - final da fase de indução). Apesar do bom prognóstico da doença, com taxas de cura superiores a 80%, pouco se sabe sobre o impacto do tratamento no perfil de mediadores moleculares da inflamação, um *hallmark* do câncer descrito como determinante do comportamento biológico dos tumores. A importância das proteínas e metabólitos produzidos na resposta inflamatória, como citocinas e mediadores do estresse oxidativo, tem sido discutida tanto no funcionamento normal da medula óssea, como na resposta à invasão medular pelos clones malignos. Apesar disso, pouco se sabe sobre o impacto do tratamento quimioterápico sobre a dinâmica destes mediadores e de que forma isso pode influenciar tanto a resposta ao tratamento, como a imunopatogênese da LLA. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o impacto da quimioterapia na fase de indução do tratamento da LLA sobre o perfil de mediadores inflamatórios produzidos sistemicamente e no microambiente tumoral em amostras de sangue de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA do tipo B (LLA-B), comparando-se os perfis em D0 e D28. Para alcançar este objetivo, este estudo foi dividido em 2 etapas. A primeira parte teve como objetivo traçar o perfil proteômico sistêmico e tumoral de amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) coletadas em D0 e D28, e validar possíveis proteínas de interesse ou vias de sinalização pouco conhecidas na LLA-B. Na segunda etapa, avaliou-se o perfil de estresse oxidativo e de citocinas em amostras de SP e MO de pacientes com LLA-B também em D0 e D28. O estudo encontra-se cadastrado na Plataforma Brasil sob o número CAAE 24498213.0.0000.5231 e foi aprovado pelo comitê de Ética Institucional. Para ambas as etapas, foram recrutados 17 pacientes pediátricos atendidos no Instituto de Câncer de Londrina, entre setembro de 2014 a dezembro de 2016, com diagnóstico confirmado clínica e laboratorialmente para LLA-B, submetidos ao mesmo protocolo de tratamento. Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos responsáveis, e assentimento dos pacientes, foram coletadas amostras anticoaguladas de SP (5mL) e aspirado de MO (2 a 3 mL) em D0 e D28. As amostras foram centrifugadas para obtenção de plasma, onde foram realizadas as seguintes análises: investigação do perfil diferencial de proteínas por espectrometria de massa *label-free*, dosagem dos níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon gama (IFN- γ) por ensaio imunoenzimático (ELISA), dosagem de transtiretina por ensaio imunoturbidimétrico, determinação dos níveis dos metabólitos do óxido nítrico pela técnica de Cádmio-Cobre-Griess (NOx), determinação do conteúdo de grupos sulfidrila de proteínas (SH) baseado na reação

do ácido 5,5-ditiobis-2 nitrobenzólico, determinação da capacidade antioxidante total plasmática (TRAP) e mensuração dos níveis de hidroperóxidos lipídicos por quimioluminescência. Dados clínicos foram obtidos de consultas aos prontuários médicos e incluíram idade e peso ao diagnóstico, perfil do hemograma, acometimento de sistema nervoso central e testicular, dados de mielograma e avaliações sobre a presença de doença residual mínima (DRM) ao final do tratamento de indução. Os dados obtidos foram analisados no *software* GraphPad Prism 7.0 (USA) e foi adotado o valor de $p < 0,05$ como significativo. Em relação ao estudo proteômico, em D0 o SP x MO, foi caracterizado como um ambiente pró-inflamatório, com a expressão das proteínas de coagulação cininogênio (KNG), plasmina e plasminogênio downreguladas. D28 foi caracterizado pelos processos relacionados à resposta imunológica e a super expressão do IRF3 (activation of Interferon Regulatory Factor 3) e da proteína transtiretina. O fator de transcrição da proteína leucemia mielóide aguda 1 (RUNX1) foi apontado como fator de transcrição comum tanto em D0 como em D28. As proteínas transtiretina e IFN- γ foram validadas nas amostras e se mostraram aumentadas e diminuídas, respectivamente, em D28. Sobre o perfil de citocinas e de estresse oxidativo, observou-se que no D28 os níveis de TNF- α estavam aumentados no SP, enquanto que o IFN- γ aumentou de modo significativo apenas na MO. Os hidroperóxidos aumentaram em D28 no SP de pacientes com DRM positiva. Os resultados obtidos em ambos estudos permitem concluir que a transtiretina e IFN- γ desempenham um papel importante nos mecanismos de resolução da LLA-B, e que os níveis de hidroperóxidos podem variar ao longo do tratamento de LLA na presença da DRM.

Palavras-chave: LLA-B. Proteômica. Estresse oxidativo. Citocinas. Inflamação.

OLIVEIRA, Geise Ellen Broto. Impact of the chemotherapy induction phase on the profile of systemic inflammatory mediators and the tumor microenvironment in childhood acute lymphocytic leukemia. 2021. Doctoral thesis in Clinical and Laboratory Pathophysiology – Health Sciences Center, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 103 p. Londrina, 2021.

ABSTRACT

Acute lymphocytic leukemia (ALL) is the main cancer in childhood, whose treatment is based on polychemotherapy divided into phases (induction, consolidation and maintenance). Induction is a decisive step for the good prognosis of patients with ALL, and consists of the intensive use of antineoplastic drugs combined in a period of 28 days, staggered from day 0 (D0 - to diagnosis) to 28 (D28 - end of induction phase), and divided into weeks of polychemotherapeutic treatment. Despite the good prognosis of the disease, with cure rates above 80%, little is known about the impact of treatment on the profile of molecular mediators of inflammation, a hallmark of cancer described as a determinant of the biological behavior of tumors. The importance of proteins and metabolites produced in the inflammatory response, such as cytokines and oxidative stress mediators, has been discussed both in the normal functioning of the bone marrow and in the response to bone marrow invasion by malignant clones. Despite this, little is known about the impact of chemotherapy treatment on the dynamics of these mediators, and how this can influence both the response to treatment and the immunopathogenesis of ALL. In this context, the present study aimed to evaluate the impact of chemotherapy in the induction phase of ALL treatment on the profile of systemically produced inflammatory mediators and in the tumor microenvironment in blood samples from pediatric patients diagnosed with type B ALL (ALL- B), comparing the profiles in D0 and D28. To achieve this goal, this study was divided into 2 stages. The first part aimed to trace the systemic and tumor proteomic profile of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples collected at D0 and D28, and to validate possible proteins of interest or poorly known signaling pathways in ALL-B. In the second stage, the profile of oxidative stress and cytokines was evaluated in PB and BM samples from patients with ALL-B also in D0 and D28. The study is registered at Plataforma Brasil under the number CAAE 24498213.0.0000.5231, and was approved by the Institutional Ethics Committee. For both stages, 17 pediatric patients treated at the Cancer Institute of Londrina between September 2014 and December 2016 with clinically and laboratory confirmed diagnosis for ALL-B, who underwent the same treatment protocol, were recruited. After signing the free and informed consent form by the guardians, and consenting to the patients, anticoagulated PB samples (5mL) and BM aspirates (2 to 3 mL) were collected on D0 and D28. The samples were centrifuged to obtain plasma, where the following analyzes were performed: investigation of the differential protein profile by label-free mass spectrometry, measurement of the levels of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) by enzyme immunoassay (ELISA), measurement of transthyretin by immunoturbidimetric assay, determination of levels of nitric oxide metabolites by the Cadmium-Copper-Griess (NOx) technique, determination of the content of sulfhydryl groups of proteins (SH) based on the reaction of 5,5-dithiobis-2 nitrobenzoic acid, determination of plasma total antioxidant capacity (TRAP) and measurement of lipid hydroperoxide levels by

chemiluminescence. Clinical data were obtained from medical records consultations, and included age and weight at diagnosis, blood count profile, involvement of the central nervous system and testicular, myelogram data and assessments of the presence of minimal residual disease (MRD) at the end of treatment Induction. The data obtained were analyzed using the GraphPad Prism 7.0 software (USA) and the value of $p < 0.05$ was adopted as significant. Regarding the proteomic study, on D0 the PB, in comparison to BM, was characterized as a pro-inflammatory environment, with the expression of downregulated kininogen (KNG), plasmin and plasminogen coagulation proteins. D28 was characterized by processes related to the immune response and the overexpression of the transcription factor in response to interferon 3 (IRF3) and the transthyretin protein. Acute myeloid leukemia protein transcription factor 1 (RUNX1) was appointed as a common transcription factor in both D0 and D28. The transthyretin and IFN- γ proteins were validated in the samples and showed to be increased and decreased, respectively, in D28. Regarding the profile of cytokines and oxidative stress, it was observed that on D28, TNF- α levels were increased in PB, while IFN- γ increased significantly only in BM. Hydroperoxides increased at D28 in the BM of patients with positive minimal residual disease (MRD). The results obtained in both studies allow us to conclude that transthyretin and IFN- γ play an important role in the mechanisms of resolution of ALL-B, and that the levels of hydroperoxides can vary along the treatment of ALL in the presence of MRD.

Key-words: ALL-B. Proteomics. Oxidative stress. Cytokines. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das leucemias.....	16
Figura 2 – Representação esquemática da terapia para LLA-B derivada do grupo de baixo risco GBTLI 2009.....	22
Figura 3 – Desenho do estudo.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Alto Risco
B	Linfócito B
BR	Baixo Risco
CD19	Antígeno de Linfócitos B
CTH	Célula Tronco Hematopoiética
D0	Dia Zero, ao Diagnóstico
D28	Dia 28 do Tratamento
DRM	Doença Residual Mínima
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
ERN	Espécie Reativa de Nitrogênio
FAP	Polineuropatia Amiloide Familiar
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAT	<i>Isotope-Coded Affinit Tag</i>
IFN	Interferon
IFN-γ	Interferon Gama
Ig	Imunoglobulina
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1 Beta
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRF3	Fator Regulatório Do Interferon
LLA	Leucemia Linfoide Aguda
LLA B	Leucemia Linfoide Aguda de Célula B
LLC	Leucemia Linfoide Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
LOOH	Hidroperóxidos Lipídicos
MHC	Complexo de Histocompatibilidade
MO	Medula Óssea

MTX	Metotrexato
NK	Célula Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NRF2	Fator de Transcrição Eritroide <i>2-like-2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PET Scan	Tomografia Por Emissão de Pósitrons
RC	Remissão Completa
RIR	Respondedor Inicial Rápido
RIL	Respondedor Inicial Lento
SH	Grupamento Sulfidrila
SOD	Superóxido Dismutase
SPG	Sequenciamento de Próxima Geração
T	Linfócito T
TCR	Receptores De Célula T
TGF- β 1	Fator Transformador de Crescimento
TK	Tirosina Kinase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAP	Parâmetro Antioxidante de Captura Total de Radicais
TTR	Transtiretina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	LEUCEMIAS	15
1.1.1	Leucemia Linfoide Aguda	16
1.1.2	Epidemiologia da LLA	17
1.1.3	Diagnóstico e Aspectos Clinicopatológicos da LLA	18
1.1.4	Modalidades de Tratamento da LLA	19
1.1.4.1	Protocolo do grupo brasileiro de tratamento da leucemia infantil – GBTLI para tratamento da LLA	20
1.2	FISIOPATOLOGIA DAS LEUCEMIAS: PAPEL DA INFLAMAÇÃO, CITOCINAS E ESTRESSE OXIDATIVO	24
2	OBJETIVO	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	DESENHO DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS	31
3.2	OBTENÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	32
3.3	VALIDAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE INTERESSE: DOSAGEM DE TRANSTIRETINA, IFN- γ E TNF- α	35
3.3.1	Breve Descritivo Das Proteínas De Escolha	35
3.3.2	Dosagem De Citocinas	36
3.3.3	Dosagem De Transtiretina	36
3.4	DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO	37
3.5	CARACTERIZAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO STATUS DE DRM	38
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4	LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS	39
5	ASPECTOS ÉTICOS	40

6	RESULTADOS	41
6.1	ARTIGO 1: Comparative analysis of systemic and tumor microenvironment proteomes of children with B-cell acute lymphocytic leukemia at diagnosis and after induction treatment	41
6.2	ARTIGO 2: Impact of the induction phase chemotherapy on cytokines and oxidative markers in peripheral and bone marrow plasma of children with acute lymphocytic leukemia	68
7	CONCLUSÃO	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	105
	APÊNDICE A – Parecer do comitê de ética.....	105

1 INTRODUÇÃO

As leucemias constituem um grupo de doenças hematológicas de elevada significância na infância. Caracterizam-se pela proliferação maligna desordenada dos precursores dos leucócitos na medula óssea, que perdem a capacidade de auto-renovação e diferenciação e se espalham pelo organismo comprometendo as funções leucocitárias (BOTELHO et al., 2017).

Acometem diferentes tipos de linhagens celulares, sendo a leucemia linfóide aguda (LLA), a principal neoplasia diagnosticada em crianças (GRAUX, 2011). As neoplasias hematológicas são resultantes de uma hematopoiese aberrante, cuja produção dos componentes normais do sangue é comprometida e substituída por clones malignos sem funcionalidade. Como resultado, o paciente apresenta, desde anemias leves, até sintomas hematológicos graves, como infecção e sangramento (HAMERSCHLAK, 2008; FERREIRA et al., 2012).

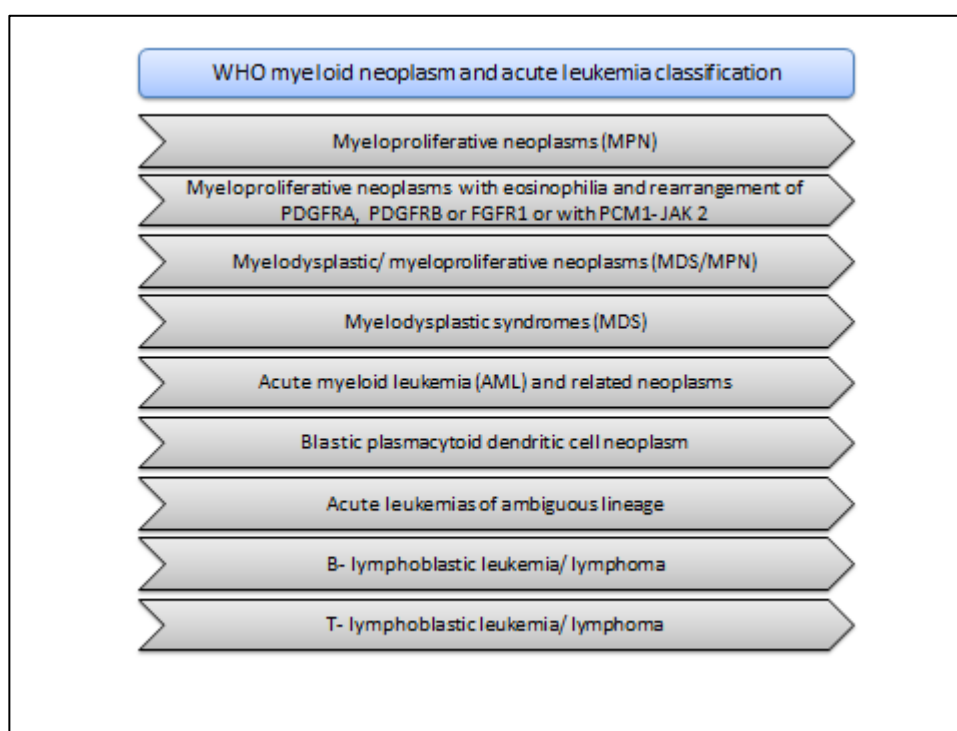
A hematopoiese é o processo de produção das células sanguíneas (*hemo* = sangue, *poiesis* = produção), que ocorre na medula óssea por uma cascata dinâmica coordenada por diversos fatores reguladores, como citocinas e fatores de transcrição (BAO, CHENG, SANKARAN, 2019; BENTO; DAMASCENO; AQUINO NETO, 2003; PENG, 2020). É um mecanismo regulado pela disponibilidade de nutrientes como o ferro, vitamina B e ácido fólico, e hormônios como a eritropoietina e testosterona. Independente da disponibilidade dos fatores de crescimento e nutricionais, sabe-se que a ocorrência de mutações pode alterar o ciclo produtivo normal da hematopoiese, transformando o fenótipo das células precursoras e impedindo a formação de células maduras normais, originando doenças denominadas leucemias (GROARK, YOUNG, 2019).

1.1 CLASSIFICAÇÃO DAS LEUCEMIAS

Quanto à linhagem celular, as leucemias podem ser do tipo linfóide ou mielóide, afetando respectivamente precursores que originam linfócitos e mielócitos. Em ambas, a doença pode se manifestar de forma aguda ou crônica, de acordo com o tempo de desenvolvimento de anormalidades. Enquanto as leucemias crônicas demoram meses ou anos para que as células anormais tenham a sua produção aumentada, as leucemias agudas têm início muito rápido e são mais comuns em crianças (INCA, 2001).

De acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), as neoplasias hematológicas são definidas em grupos: neoplasias mielóides crônicas, leucemias agudas e neoplasias linfoproliferativas crônicas (Figura 1). Quanto ao grau de maturação, para determinar se trata de uma neoplasia aguda, a contagem de blastos se faz necessária. Desta forma, se no início da doença a contagem de blastos for maior que 20% na MO, considera-se de caráter agudo. (SWERDLOW, 2016; VARDMAN et al., 2009; ARBER, et al., 2016).

Figura 1: classificação das leucemias



Fonte: adaptado de SWERDLOW, 2016; VARDMAN et al., 2009; ARBER, et al., 2016).

1.2 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)

A LLA é uma doença hematológica que se origina de alterações em precursores hematológicos da linhagem linfóide B, T ou NK, sendo a linhagem B o tipo mais frequente diagnosticado na infância. Caracteriza-se como um distúrbio genético que prejudica o processo de maturação normal dos leucócitos, comprometendo suas funções de diferenciação e proliferação (GRAUX, 2011).

Os sintomas clínicos característicos são febre, aumento dos linfonodos,

massa abdominal e dor óssea, frequentemente associados a sinais de sangramento e infecções (HAMERSCHLAK, 2008; INCA, 2021).

Pesquisas tem mostrado que há dois momentos envolvidos na transformação das leucemias, sendo que um deles possivelmente ocorre ainda dentro do útero, enquanto o outro acontece após o nascimento (GILHAM, 2005; GREAVES, 2002; 2006). Não há um fator isolado que predispõe o surgimento das leucemias, mas sim uma associação de fatores genéticos, ambientais ou infecções. Dentre os fatores de risco ambientais, a radiação ionizante é comprovadamente associada à ocorrência das leucemias (MAHONEY, 1955). Além disso, o benzeno, muito utilizado pela indústria química, e também presente na gasolina, é uma substância carcinógena relacionada à predisposição da leucemia mielóide aguda. Outros fatores como o uso de pesticidas e substâncias químicas diversas têm sido associados ao desenvolvimento de leucemias agudas (BELSON et al., 2007).

Em cada caso, o grau de exposição e a idade também devem ser observados (INCA, 2021). Síndrome de Down, anemia de Fanconi, hábitos maternos, como o uso de drogas, medicamentos, ingestão de bebida alcoólica, tabagismo, exposição a pesticidas e infecções durante a gestação podem estar associadas ao surgimento de leucemias. Logo, a transformação leucêmica é provavelmente resultante de múltiplos eventos, e não somente de um único fator. Sendo assim, relacionar os fatores envolvidos na leucemogênese é uma tarefa difícil, pois muitas variáveis confundidoras parecem estar envolvidas nesse processo. Além disso, faltam metodologias capazes de quantificar essas exposições (HAMERSCHLAK, 2008; FERREIRA et al., 2012).

1.2.1 Epidemiologia da LLA

O câncer é uma das principais causas de mortalidade infantil, sendo as leucemias os tumores de maior letalidade em crianças de 0 a 14 anos (FELICIANO; SANTOS; POMBO-DE-OLIVEIRA, 2018). As taxas de mortalidade nesse grupo são maiores em países pouco desenvolvidos, e no Brasil destacam-se as regiões Norte e o Nordeste. Vale ressaltar que muitas regiões não têm registros sobre essas taxas, o que dificulta estimar de fato a mortalidade nessa população (OLIVEIRA et al., 2020).

Estima-se que aproximadamente 270.000 novos casos de câncer foram diagnosticados em crianças no ano de 2018 no mundo. Dos cânceres infantis, as leucemias são as mais prevalentes, e as de origem linfóide são as que mais

acometem essa população, representando 64,9% do total de casos (BOTELHO et al., 2017).

De acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no triênio 2020-2022 espera-se 5.920 novos casos de leucemias em homens e 4.890 em mulheres no Brasil, representando um risco de 5,67 e 4,56 a cada 100 mil homens e mulheres respectivamente. No estado do Paraná, o risco para homens é de 6,52 casos para 100 mil homens e 4,73 para mulheres no ano de 2020 (INCA, 2021).

1.2.2 Diagnóstico e Aspectos Clinicopatológicos da LLA

Os sinais e sintomas clínicos são resultados da substituição das células normais pelas leucêmicas e da velocidade com que isso ocorre. Em geral os sintomas são inespecíficos como fadiga e dor óssea, porém alguns são característicos e estão relacionados à anemia (como mal-estar e palidez), sangramentos e epistaxe. Cerca de dois terços dos pacientes podem apresentar febre, otite, pneumonia, baço e fígado aumentados, dentre outros (SMITH, HIM 2006; INCA, 2021). Logo, para diagnosticá-la, são necessários exames mais aprofundados e específicos (JOHNSTON et al., 2019).

O hemograma de rotina e o mielograma alterados são sinais de alerta. A contagem leucocitária pode estar normal, aumentada ou diminuída, há diminuição das hemácias e plaquetas, e a presença de células imaturas denominadas blastos (SOSSELA FR, et al., 2017; MILLER O, et al., 1999; DUTRA et al., 2020). Para o diagnóstico confirmatório são realizados estudos de morfologia e imunofenotipagem celular, baseados na morfologia, estrutura e função cromossômica. Por definição e para diferenciação de outras leucemias, na LLA haverá comprometimento medular, com pelo menos 20% de blastos (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014).

A avaliação morfológica medular através da citometria de fluxo é o primeiro passo do diagnóstico, onde é possível diferenciar a leucemia linfóide e mielóide. Além disso, algumas características celulares são utilizadas nessa diferenciação, como a presença de células com forma de raquete, citoplasma com grânulos azuis e testes citoquímicos com resultados diversos analisados através do mielograma (CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014).

Quanto à diferenciação entre leucemia aguda ou crônica, na LLA faz-se a análise microscópica do sangue e medula, imunofenotipagem e citogenética, onde são avaliados os antígenos celulares que as células leucêmicas expressam na sua

superfície. Por exemplo, na leucemia linfocítica crônica (LLC) são expressos principalmente CD19, CD5 e CD23, enquanto na LLA são observados os antígenos CD19, CD20, CD22, CD24, e CD79a (HAMERSCHLAK, 2008; INCA, 2001; MARRERO et al., 2019; CHIARETTI; ZINI; BASSAN, 2014). A imunofenotipagem, realizada através da citometria de fluxo é o teste padrão-ouro para identificar a linhagem celular e realizar a subclassificação da LLA, sendo utilizada principalmente para monitorar a doença. A avaliação morfológica concomitante à realização da citometria é suficiente para concluir o diagnóstico (DIGIUSEPPE, WOOD, 2019). Com os avanços das técnicas de diagnóstico, apesar de raro, é possível identificar leucemias ambíguas, ou seja, com as duas linhagens celulares, T mielóide, linfóide ou NK (MATUTES et al., 2011).

Como a leucemia aguda progride muito rapidamente, o tratamento deve ser instituído tão logo se obtenha o resultado (INCA, 2021).

1.2.3 Modalidades de Tratamento da LLA

O tratamento da LLA apresenta boa resposta e tem melhorado de forma significativa a sobrevida dos pacientes. Tem por objetivo eliminar as células doentes e não funcionais para que a medula possa produzir células saudáveis (GRAUX, 2011). É baseado na combinação de diversas modalidades terapêuticas, podendo incluir quimioterapia citotóxica, transplante de medula, radioterapia e imunobiológicos. Embora obtenha-se bons resultados, uma parcela dos pacientes não responde ao tratamento, evoluindo para óbito (MARTINS et al., 2020; BOTELHO et al., 2017).

A poliquimioterapia consiste na combinação de medicamentos citotóxicos que atuam em diferentes etapas do ciclo celular. É a principal modalidade de tratamento da LLA, em conjunto com outros tratamentos de suporte necessários devido a infecções, hemorragias e invasão do sistema nervoso central. O tratamento quimioterápico é dividido em fases, e segue protocolos instituídos por grupos de pesquisas e estudos nas leucemias ao redor do mundo. Consiste, basicamente, nas fases de indução, consolidação e manutenção, sendo a resposta almejada a remissão completa (RC) da doença (PUI, ROBISON, 2008).

Já o transplante de MO é uma opção de tratamento complementar, cujo objetivo é substituir a medula doente por uma saudável. Essa nova medula pode ser a do próprio paciente, autóloga, ou de um doador, ou seja, alogênica. O transplante

pode ainda ser feito com células precursoras oriundas do cordão umbilical, por exemplo (INCA, 2001).

Como alternativa ao tratamento citotóxico, pode-se utilizar anticorpos monoclonais alvo-específicos, que vêm sendo desenvolvidos e testados em diversas neoplasias. Consistem imunoglobulinas das classes IgG e IgM, que causam menos efeitos indesejados nas células normais saudáveis, podendo aumentar consideravelmente a sobrevida do paciente. São utilizados em associação à quimioterapia ou como terapia única, e embora configure um tratamento de alto custo, apresenta vantagens tanto na eficácia quanto na qualidade de vida do paciente leucêmico (BRUNETO et al., 2019). Apesar disso, a poliquimioterapia citotóxica permanece como modalidade terapêutica predominante na LLA no Brasil.

1.2.3.1 Protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil (GBTLI) para tratamento da LLA

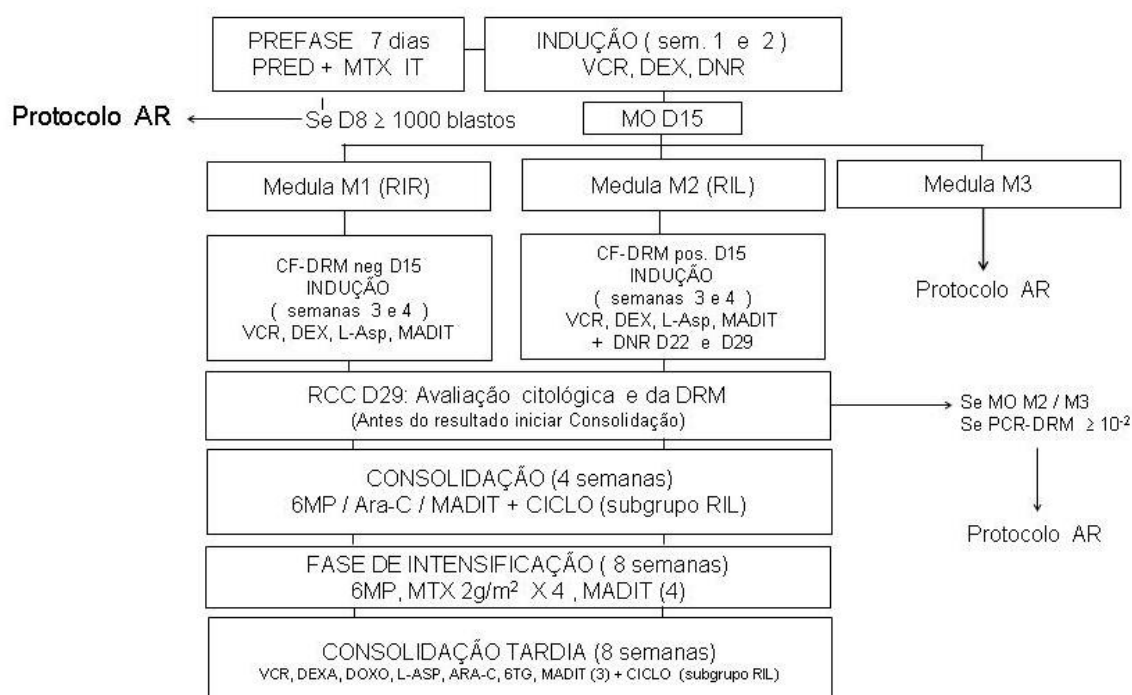
Os protocolos de tratamento das leucemias no Brasil foram definidos pelo GBTLI, sendo específicos para cada subtipo da doença, permitindo assim um tratamento ajustado e individualizado de acordo com o grupo de risco correspondente. É baseado em estudos e protocolos internacionais, e também nas versões do GBTLI anteriores (INCA, 2001; GBTLI, 2009; CAZE et al., 2010).

A estratificação da LLA é fundamental para que o paciente receba o tratamento que melhor condiz com a sua situação. Para isso, os achados clínicos e laboratoriais são utilizados para definir o risco de recidiva (GRAUX, 2011; GBTLI, 2009). Em relação à idade, considera-se aqueles pacientes com idade entre 1 a 9 anos como os melhores respondedores. A idade está intrinsecamente relacionada à presença de comorbidades, que aumentam conforme os anos, enquanto menores de 1 ano de idade em geral tem um prognóstico desfavorável (BIOND, 2000).

A LLA é considerada agressiva quando a contagem de leucócitos é elevada. A doença é extramedular, quando há o envolvimento do sistema nervoso central e quando há resistência ao tratamento com corticoides e quimioterápicos. A presença de doença residual mínima (DRM) ao final da fase de indução do tratamento, caracterizada pela presença de blastos quimiorresistentes na medula óssea, é sinal de má resposta, e transfere o paciente de baixo risco (BR) para o grupo de alto risco (AR), intensificando o seu tratamento (GRAUX, 2011).

Para os pacientes de baixo risco, os critérios utilizados inicialmente são a

idade (entre 1 e 9 anos), a leucometria (glóbulos brancos $< 50.000/mm^3$) e imunofenotipagem B – derivada. Além da classificação de leucemia B ou T e dos grupos BR e AR, os pacientes são ainda subclassificados em respondedores rápidos (RIR) ou lentos (RIL), conforme esquematizado abaixo na Figura 2. Essa avaliação ocorre ao longo do protocolo com os resultados de exames que são feitos nos dias preconizados, podendo mudar o direcionamento do tratamento, sendo que pacientes de baixo risco podem se tornar de alto risco e vice-versa (GBTLI, 2009).



A Figura 2 mostra o esquema terapêutico adotado com base no protocolo para LLA-B de BR. O tratamento tem duração de aproximadamente 2 anos e meio. Na fase de indução, a meta é eliminar mais de 99% das células leucêmicas e restaurar a hematopoiese normal. As drogas administradas são glicocorticoides (prednisona ou dexametasona), vincristina (alcaloide) e asparaginase ou antraciclíco (ou os dois). Essa fase dura aproximadamente 4 semanas. Já a consolidação objetiva erradicar células resistentes e evitar a recaída. Da mesma maneira, a manutenção evita que a doença retorne. Nesta fase, são mantidos os medicamentos

em doses menos intensas (PUI, ROBISON, 2008).

A resposta terapêutica é avaliada por critérios clínicos, fenotípicos e citogenéticos. Há polimorfismos nos genes que codificam as enzimas metabolizadoras de fármacos que fazem com que o portador dessa alteração sofra mais com a toxicidade em relação aos pacientes sem esse polimorfismo, explicando porque alguns pacientes respondem melhor ao tratamento. Por exemplo, o polimorfismo no gene codificante da enzima timidilato sintase (alvo do MTX) está associado ao maior risco de recidiva, enquanto o genótipo *Null* da glutathione S-transferase está associado com menor risco (GRAUX, 2011; GBTLI, 2009).

A remissão completa pode ser definida como a ausência de neoplasia, visualizada pelos métodos de escaneamento como a tomografia por emissão de pósitrons (PET-Scan) combinada a exames histológicos da medula e do sangue periférico. Em pacientes leucêmicos, a quimioterapia pode induzir a remissão completa na maioria dos casos, o que nem sempre ocorre em pacientes com outras neoplasias sanguíneas como os sarcomas metastáticos ou o mieloma múltiplo (MM).

Nos casos nos quais não ocorre remissão completa, utiliza-se o termo doença residual mínima (DRM) (LUSKIN et al., 2018). A DRM é um parâmetro utilizado para acompanhar prognóstico das doenças hematológicas e a resposta ao tratamento, e que auxilia na estratificação do risco. É o parâmetro avaliado durante o tratamento, entre a indução e a consolidação. Consiste na presença de células leucêmicas que sobrevivem à quimioterapia e radioterapia e permanecem na medula óssea ou, em menor frequência, no sangue periférico. Pacientes com DRM negativa apresentam boa resposta ao tratamento. A citometria de fluxo é um dos métodos utilizados para sua detecção, mas também pode ser avaliada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), e pelo sequenciamento gênico (SPG), com significativo avanço na sensibilidade do diagnóstico de DRM. O resultado da DRM é fundamental para tomada de decisões terapêuticas e seguimento do protocolo de tratamento (JEYAKUMAR; O'Brien, 2020; KRUSE et al., 2020; PANTEL; ALIX-PANABIÈRES, 2019).

Clinicamente, pacientes com níveis de DRM acima de 0,01% apresentam risco aumentado de recaída. Níveis acima de 1% ao final da indução sugerem AR de recaída e menor taxa de sobrevida (KRUSE et al., 2020). Nem todas as células da DRM são capazes de contribuir para uma recaída, porém tratar esses pacientes antes que recidivem traz muitas vantagens e ajuda a direcionar o tratamento

(LUSKIN et al., 2019).

A presença de DRM está associada às características intrínsecas das células leucêmicas e sua baixa sensibilidade às drogas, que juntamente com a farmacodinâmica e farmacogenômica do hospedeiro, o regime administrado e a adesão ao tratamento são determinantes para a resposta prognóstica (PUI, ROBSON, 2008). Em alguns casos, apesar das modalidades múltiplas de tratamento, pode ocorrer a falha na resposta terapêutica levando à quimiorresistência e presença de DRM (GUZMÁN-ORTIZ, 2017). Ela pode ser intrínseca, associada à alguma anormalidade genética já presentes nas células tumorais ou microambiente, ou adquirida, induzida após a exposição a determinado agente terapêutico.

Alguns mecanismos moleculares vêm sendo associados à ocorrência de DRM. O microambiente, por exemplo, induz a quimiorresistência modificando a sensibilidade celular à apoptose, através da liberação de fatores solúveis (CASTELLS, 2012). A quimiorresistência pode ainda ocorrer por alterações genéticas da célula neoplásica e também pelo microambiente, sugerindo que cada tumor apresenta um perfil único. Além de alterações genéticas, as modificações epigenéticas são descritas como uma das causas de a célula sensível tornar-se quimiorresistente (CASTELLS, 2012; MEADS, GATENBY e DALTON, 2009).

Os mecanismos moleculares específicos que levam à ocorrência LLA, bem como aqueles associados à ocorrência de DRM, serão detalhados no tópico a seguir.

1.3 FISIOPATOLOGIA DAS LEUCEMIAS: PAPEL DA INFLAMAÇÃO, CITOCINAS E ESTRESSE OXIDATIVO

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento da LLA, pouco se sabe sobre os mecanismos que permeiam a biologia desta doença. As leucemias são doenças inflamatórias. Portanto, a leucemogênese é um evento que envolve muitos mediadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral (TNF- α), interferons (IFN- γ), citocinas e mediadores do estresse oxidativo.

O processo normal de maturação celular de linfócitos B ocorre na medula óssea, enquanto que para os linfócitos T esta maturação ocorre no timo, onde estas células passam a expressar receptores de célula T (TCR). Erros nos genes TCR podem interromper a via de maturação celular normal, levando à leucemogênese.

(GRAUX, 2011; PUI; ROBISON, 2008; YANG; WONG; NG, 2019). No timo, além de adquirirem o receptor de célula T madura, os linfócitos passam por uma etapa de seleção onde são capazes de reconhecer antígenos específicos via complexo de histocompatibilidade (MHC). No seu processo de maturação, há o envolvimento de sinalizações proteicas, fatores de transcrição e reguladores da hematopoiese, e a falha em alguma dessas vias pode desencadear a leucemogênese (MURRE, 2000; YANG; WONG; NG, 2019).

Já para os linfócitos B, a maturação ocorre na medula. Translocações nos genes reguladores podem ativar oncogenes e levar a leucemogênese, por perda do controle do ciclo celular, estimulando a expansão do clone anormal (DYER et al., 2010; GRAUX, 2011). Os rearranjos clonais nos genes das imunoglobulinas, por exemplo, levam à expressão de receptores de antígenos e glicoproteínas de superfície celular que estão ligadas à diferenciação nos estados iniciais de desenvolvimento celular (PUI; ROBSON, 2008).

Além de alterações referentes ao maturamento dos linfócitos, diversos mediadores solúveis também participam do processo de leucemogênese. A inflamação crônica é uma das assinaturas da malignidade e a desregulação na produção de mediadores desta resposta está fortemente associada à patogênese do câncer (Hanahan e Weinberg, 2011).

O envolvimento das citocinas no desenvolvimento de leucemias tem sido amplamente estudado. Sabe-se que as citocinas atuam diretamente nas respostas imunológicas, incluindo a resposta imune contra a LLA (JIN et al., 2016). Muito do que se sabe atualmente sobre a participação das citocinas nas respostas imunes contra tumores se refere a outras leucemias. Pacientes portadores de LLC apresentaram níveis aumentados de interferon gama (INF- γ), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 10 (IL-10), correlacionados ao resultado desfecho da doença, demonstrando sua importância no prognóstico e no monitoramento da terapia. Níveis plasmáticos aumentados de IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em pacientes com LMA foram associados com o perfil de sobrevida e eventos livre de doença (SANCHEZ; CORREA et al., 2013; FAYAD 2001; WU et al., 2005). Assim, observa-se que na resposta inflamatória são produzidas diversas citocinas cujos papéis se destacam como antitumorais, especialmente o IFN- γ e o TNF- α .

O IFN- γ é uma citocina produzida pelas células T ativadas e células NK, durante as respostas imunológicas inata e adaptativa, com atividade antineoplásica

capaz de induzir a apoptose em células tumorais. Polimorfismos nos genes do IFN- γ estão associados ao desenvolvimento de leucemias por mecanismos ainda não elucidados (FIDANZA et al., 2017; AHMED, 2014). Já o TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que induz macrófagos e monócitos a produzirem IL-6 e que pode estar aumentada em LMA e LLC (SANCHES-CORREA, 2013). Estas substâncias são produzidas por diversas células do sistema imune, que também participam da resposta anti-tumoral, com destaque para os linfócitos.

As células natural killer (NKs) são um tipo de linfócito e atuam na imunidade natural com potente ação na vigilância antitumoral, inclusive em LLA-B, e depende das citocinas produzidas por outras células para completar sua ação, como a interleucina 12 (IL-12). As células tumorais, por sua vez, podem impedir a ação das NKs diminuindo a produção de IL-10 e fator transformador de crescimento beta 1 (TGF- β 1), que são imunossupressores (ROUCE et al., 2016).

A produção de mediadores da inflamação é coordenada por fatores de transcrição ativados pelo processo inflamatório. O principal deles é o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), responsável pela transcrição dos genes inflamatórios que codificam, além das citocinas, componentes da sinalização redox e estresse oxidativo (EO) (ZHAO et al., 2021), bastante descritos nas leucemias linfoides (BARGOU et al., 1996; PÉREZ-FIGUEROA et al., 2016).

O EO é uma condição que resulta do desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou nitrogênio (ERNs) e sua neutralização pelo sistema antioxidante (ZAHRA et al., 2021). Tais espécies reativas podem provocar danos às estruturas celulares, incluindo o DNA, gerando instabilidade genômica e mutações, que são eventos diretamente ligados à carcinogênese, progressão das células cancerosas (JORGENSEN; ZHONG; OBERLEY, 2013).

O radical livre é definido como uma espécie reativa independente que contém um ou mais elétrons desemparelhados, formados por vários mecanismos como, por exemplo, adição de um elétron. A principal fonte de EROs descrita para a célula leucêmica é a sua geração na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, além da diminuição dos níveis antioxidantes. Apesar de o sistema antioxidante ser bastante estudado no câncer, na LLA essas vias são ainda pouco compreendidas (CAREW et al., 2003).

O papel das espécies reativas no câncer é ambíguo, e depende da quantidade, localização e duração. Seu efeito antitumoral ocorre quando há

apoptose ou necrose celular, e seu papel pró-tumor está relacionado à iniciação e propagação do câncer pela indução de alterações no DNA como mutações e modificações epigenéticas, que geram a instabilidade genômica (VISCONE, GRIECO, 2009; ZAHRA et al., 2021).

Neste contexto, célula tronco são o principal alvo das espécies reativas devido ao seu longo tempo de vida na medula óssea. Ela desempenha funções importantes por originar os clones que darão origem às células sanguíneas através de mecanismos de diferenciação e proliferação, reguladas por vias intrínsecas e extrínsecas ao nicho medular. No contexto das EROs, sabe-se que o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em baixos níveis, contribui para a quiescência da célula tronco hematopoiética (CTH), enquanto níveis aumentados leva à diferenciação, proliferação e sobrevivência (URAO; USHIO-FUKAI, 2014). O aumento de EROs parece ser a chave para a transdução de sinal na leucemia, induzindo à proliferação de células leucêmicas e resistência à apoptose, porém não é claro como esse processo ocorre (SARMENTO-RIBEIRO et al., 2012).

As alterações produzidas pela resposta inflamatória podem também alterar o perfil redox celular, não somente no ambiente medular, mas também na circulação sistêmica, uma vez que as células da LLA extravasam para além da medula óssea. Isso tem sido demonstrado pelo mapeamento do estresse oxidativo em amostras de sangue periférico de pacientes com leucemias diversas (REUTER et al., 2010).

Quando em hipóxia, a cadeia respiratória induz a produção de óxido nítrico ($NO\cdot$), que gera outras espécies nitrosativas como o peroxinitrito ($ONOO\cdot$), capazes de interagir com as estruturas celulares. Nas membranas lipídicas, por exemplo, ocorre peroxidação com formação do radical lipoperoxil que resulta na formação do hidroperoxido lipídico ($LOOH\cdot$), um produto instável. Estas alterações são capazes de alterar a integridade celular e são descritas por contribuir para a mutagênese (HUSSAIN, HOFSETH E HARRIS, 2003; POYTON, BALL, CASTELLO, 2009; TUDEK et al., 2017).

Neste contexto, o $NO\cdot$ desempenha um papel modulador dúbio nas doenças hematológicas, seja como protetor ou estimulador tumoral, dependendo da sua concentração, podendo interagir com diversas moléculas que participam na formação do câncer (VIVARELLI et al., 2020). Níveis aumentados de $NO\cdot$ foram observados em pacientes leucêmicos e depressivos. Nesse mesmo estudo, a superóxido dismutase (SOD) e a capacidade antioxidante total (TRAP) estavam

diminuídos (ZHOU et al., 2007). Resultados similares com parâmetros oxidantes aumentados e antioxidantes diminuídos, foram observados em outros estudos com diversas leucemias (ER et al., 2007; BATTISTI et al., 2008). Entretanto, o papel dos componentes redox na LLA ainda é pouco compreendido.

A participação do EO na LLA é diretamente afetado pelo tratamento quimioterápico, devido ao seu papel na geração de EROs. O tratamento da leucemia por si só promove EO, sendo este o objetivo de algumas terapias utilizadas, promovendo altos níveis de EROs a fim de destruir as células doentes. A resistência e a recaída envolvem o desbalanço redox, podendo contribuir com o sucesso do tratamento para o benefício do paciente (IRWIN, 2013).

Por exemplo, mutações no fator de transcrição eritroide *2-like-2* (NRF2) têm sido descritas em crianças com LLA. O NRF2 regula finamente a balança do estresse oxidativo, pois contrapõe os efeitos pró-inflamatórios do fator de transcrição NF-kB. Um estudo conduzido em 30 pacientes portadores de LLA mostrou que a ocorrência de mutações específicas no gene Keap-1, supressor do NRF2, parece ter uma função patológica (AKIN-BALI et al., 2019). Outras mutações em genes com função redox, como o supressor de tumor TP53, têm sido descritas na LLA e associadas à ocorrência de falha na resposta ao estresse gerado por drogas antineoplásicas como doxorrubicina, gerando falha terapêutica (DEMIR et al., 2020).

O microambiente medular se mostra fundamental nesta dinâmica do estresse oxidativo induzido pela quimioterapia. Por exemplo, células mesenquimais parecem ter um papel fundamental no desenvolvimento de quimiorresistência por parte dos blastos da LLA, pois quando são expostas aos EROs gerados pela quimioterapia se tornam capazes de neutralizar seus efeitos sobre as células leucêmicas, gerando DRM e quimiorresistência (BURT et al., 2019).

A lipoperoxidação também é descrita como um dos processos relacionados à resistência ao tratamento, e parece estar associada principalmente à presença de adipócitos no microambiente medular. Estas células teriam a capacidade de proteger as células leucêmicas dos EROs produzidos por drogas e irradiação, sendo oxidadas no lugar das células tumorais (SHENG et al., 2016). Outras células do microambiente medular, como as mesenquimais, teriam um papel neste processo de indução de quimiorresistência, induzindo influxo de cálcio mitocondrial para aumentar os níveis de ROS das células leucêmicas. Após este processo, as células quimiorresistentes passariam então pelo processo de adaptação redox, reduzindo

seus níveis internos de EROs e aumentando consideravelmente a expressão de moléculas antioxidantes (LIU et al., 2015).

A ocorrência de EO no tratamento da LLA não se limita à medula óssea, sendo descrita como um processo sistêmico. Hooke e colaboradores (2020) demonstraram este impacto ao analisar o perfil redox de pacientes com LLA durante seu primeiro ano de tratamento, descrevendo variações dos níveis de glutatona reduzida no fluido cerebrospinal, relacionados a sequelas cognitivas. Ainda a expressão aberrante de enzimas do sistema antioxidante, como a tireoredoxina, tem sido reportada em pacientes com LLA, sugerindo inclusive que este seja um dos mecanismos importantes da ocorrência de quimiorresistência nesta doença (FIDYT et al., 2019). O mesmo tem sido descrito para o sistema glutatona peroxidase, cuja inibição é associada à ocorrência de lipoperoxidação, formação de EROs e morte das células leucêmicas (PROBST et al., 2017).

Coletivamente, os mecanismos descritos aqui seriam potencialmente associados à ocorrência da DRM, que nada mais é do que a expressão clínica da resistência à quimioterapia pelos clones leucêmicos adaptados. Assim, a participação do microambiente medular na ocorrência de quimiorresistência é um evento conhecido, cujos mecanismos moleculares ainda são obscuros. Embora muitos estudos tenham por objetivo compreender a dinâmica redox, há muita controvérsia no que se refere aos benefícios ou malefícios desse cenário, principalmente nas LLAs. Porém sabe-se que essa é uma das vias que podem ajudar a compreender a doença e deve ser explorada como nova abordagem de tratamento utilizando agentes quimioterápicos e antioxidantes (SAMIMI et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar proteínas do perfil inflamatório e redox em amostras de sangue periférico e de medula óssea em pacientes portadores de LLA-B ao diagnóstico e durante a fase de indução do tratamento quimioterápico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer o perfil proteômico comparativo sistêmico e medular, em D0 e D28, para identificação de possíveis proteínas de interesse;
- b) Analisar o perfil de citocinas plasmáticas periféricas e medulares, em D0 e D28, através da dosagem de IFN- γ e TNF- α ;
- c) Avaliar os níveis de mediadores de estresse oxidativo periféricos e medulares, em D0 e D28, através da quantificação dos metabólitos do óxido nítrico (NOx), grupamento sulfidril (SH), antioxidantes totais (TRAP) e hidroperóxidos (LOOH);
- d) Quantificar os níveis de transtiretina periférica e medular, em D0 e D28, nas amostras analisadas;
- e) Correlacionar os achados laboratoriais e estabelecer seu significado clínico em pacientes com LLA-B em relação aos parâmetros: idade e peso ao diagnóstico, leucometria, contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina ao diagnóstico, etnia, data do diagnóstico, invasão do sistema nervoso central e testicular, transplante de medula óssea e status de DRM.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO E COLETA DAS AMOSTRAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional e encontra-se disponível para consulta na Plataforma Brasil sob o número CAAE 24498213.0.0000.5231.

Trata-se de um estudo longitudinal prospectivo que incluiu 17 pacientes acompanhados de setembro de 2014 a dezembro de 2016, cujas amostras (EDTA) de sangue periférico (5 mL) e aspirado de medula (2 a 3 mL) foram coletadas nos dias 0 (ao diagnóstico) e 28 (D28) correspondentes à fase de indução do protocolo de tratamento GBTLI – 2009 (Figura 3). As amostras foram utilizadas para estudo proteômico e de citocinas (objetivo 1) e para a determinação do perfil de estresse oxidativo (objetivo 2). Todos os pacientes foram tratados no Instituto do Câncer de Londrina/PR e fizeram parte do estudo após a aprovação e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pelos responsáveis legais. Também houve o assentimento dos pacientes envolvidos nesse estudo.

As amostras de sangue periférico e MO foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos para obtenção do plasma e foram armazenadas em freezer - 80°C até a realização das análises.

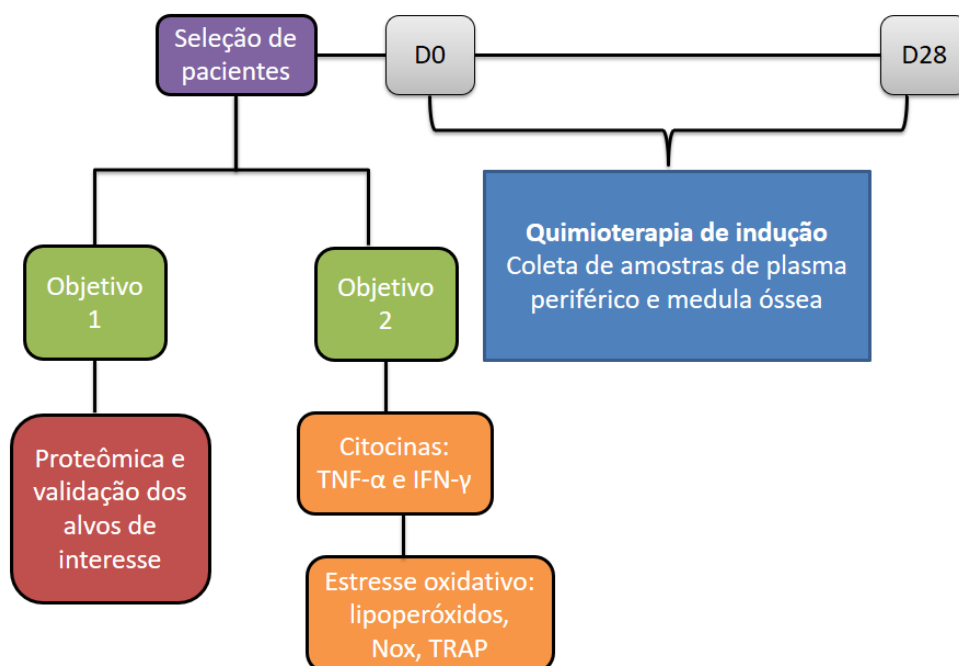


Figura 3: Desenho do estudo. Fonte: próprio autor, 2021

3.2 OBTENÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

O estudo do perfil de proteínas pode ser feito por técnicas de amplo espectro como a proteômica, que combina a cromatografia com a espectrometria de massas, com o objetivo de identificar e quantificar as proteínas presentes em determinada amostra, sendo possível conhecer sua estrutura, função e expressão. São técnicas de custo elevado e alta complexidade, que fornecem dados em larga escala relevantes para caracterização de sistemas biológicos (ASLAM, 2017; COX, MANN., 2007). Através do uso da estratégia proteômica, este estudo identificou proteínas de interesse na LLA, seja por não haver relatos prévios sobre seu papel na doença, ou pela sua relevância na fisiopatologia relacionada ao tratamento quimioterápico.

Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Proteômica do Sangue da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob coordenação da Prof. Dra. Luciana Pizzatti. A análise proteômica foi realizada nos grupos de interesse, utilizando amostras de plasma agrupadas. As concentrações de proteína dos sobrenadantes limpos foram determinadas usando o Qubit™ Protein Assay Kit (Life Technologies). As amostras foram concentradas e trocadas com bicarbonato de

amônio 50 mM usando um dispositivo de ultrafiltração de 3 kD (Millipore). Os extratos de proteínas (50 µg) foram então desnaturados (0,1% RapiGEST a 60 ° C por 15 min, Waters, Milford, EUA), reduzidos (ditiotretol 10 mM a 60 ° C por 30 min), alquilados (iodoacetamida 10 mM por 30 min à temperatura ambiente no escuro) e digerido enzimaticamente com tripsina na proporção 1:50 (p/p) de enzima para proteína. A digestão foi terminada pela adição de 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% (TFA). Os peptídeos foram dessalinizados em microcolunas C18, secos em centrífuga a vácuo, ressuspensos em ácido fórmico a 0,1%, quantificados pelo ensaio de proteína Qubit e analisados por sem marcador.

Para as análises de LC-MS / MS, dois µg de peptídeos digeridos foram analisados em triplicado técnico após 3 h de gradiente (5% a 40% de B / 167 min; 40% a 95% de B / 5 min; 95% de B / 8 min). O solvente Easy-nanoLC1000 (Thermo fisher) consistia em (95% de H₂O / 5% de acetonitrila (ACN) / 0,1% de ácido fórmico) e o solvente B de (95% de ACN / 5% de H₂O / 0,1% de ácido fórmico). A coluna de armadilha foi a coluna Easy C18, 2 cm × 100 µm i. d. × 5 µm, 120Å e coluna analítica de 25 cm e diâmetro interno de 75 µm (esferas de 3 µm, Reprosil Pur C18). A quantificação *label-free* será realizada em um Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a um QExactive Plus no modo FullScan-DDA MS2, usando uma lista de exclusão dinâmica de 45 s e tensão de pulverização a 2,70 kV. A varredura completa foi adquirida com uma resolução de 70000 a m / z 200, com um intervalo de m / z de 350-2000, AGC de 1 × 10⁶ e tempo de injeção de 50 ms. A seleção dos 15 íons mais intensos para fragmentação de HCD utilizou uma energia de colisão normalizada de 30, janela de isolamento precursor de deslocamento de m / z 1,2 e 0,5, resolução de 17 500 em m / z 200, AGC em 5 × 10⁵ e tempo de injeção de 100 ms.

Todas as amostras foram analisadas pelo software Proteome Discoverer 2.1 usando o banco de dados humano UniProt (V. Nov 2018-<https://www.uniprot.org/>). Os parâmetros utilizados foram espaço de busca tríplico completo, até duas clivagens perdidas permitidas para tripsina, tolerância de massa precursora de 10 ppm e tolerância de massa de fragmentos de 0,05 Da. A carbamidometilação da cisteína foi incluída como modificação fixa, e a oxidação com metionina e a acetilação do terminal N da proteína incluídas como modificações dinâmicas na quantificação sem marcador. As análises espectrais utilizaram uma estratégia alvo-isca, considerando o máximo delta CN de 0,05 todas as correspondências

disponíveis do espectro peptídico e uma taxa alvo de descoberta falsa (FDR) 0,01 (estrita). Os parâmetros no filtro de peptídeo foram estabelecidos para alta confiança com um comprimento mínimo de peptídeo de seis aminoácidos. Para o filtro de proteínas, foi considerado o número mínimo de sequência de peptídeo como 1, contando apenas o peptídeo de classificação 1. Os peptídeos compartilhados entre várias proteínas foram contados para a proteína com maior pontuação. Os limiares de confiança no validador de proteínas FDR foram de 0,01 para o FDR alvo (estrito). A análise estatística foi realizada usando o Perseus Computational Platform v 1.6.10.50. A estratégia com os dois conjuntos de dados foi a transformação Log₂ seguida de subtrair a mediana da normalização do teste t de Student (valor de p <0,05).

A análise funcional *in silico* foi realizada com o *FunRich - Functional Enrichment Analysis Tool* - e o software MetaCore, utilizando os bancos de dados integrados: Human Protein Reference Database (HPRD); Entrez Gene e Uniprot para vias biológicas e processo biológico. Para interações proteína-proteína, foram acessadas as seguintes bases de dados: BioGRID; Proteína humana intacta. Para localização, dados de expressão e informações de vias de sinalização, os bancos de dados: *Human Protein Atlas*; Navegador de Proteoma Humano; Mapa de Proteoma Humano, *Proteomics DB*, *Reactome*; NCI; Mapa celular; *HumanCyc* foram utilizados. Os dados de predição das sequências de consenso dos fatores de transcrição foram obtidos com busca automática em 29 bases de dados de mamíferos em tempo real na ferramenta FunRich, seguida pela análise estatística de Bonferroni. A análise da rede de interação foi avaliada com o banco de dados da rede funcional de associação de proteínas da String (<https://string-db.org/>) usando análise de rede baseada em evidências com a pontuação mínima exigida de interação de 0,400. Para o Diagrama de Venn foi usada a ferramenta (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>). Para validação, foram selecionadas as proteínas de interesse transtiretina, medida por *kit* comercial de imunoturbidimetria (Aptec Diagnostics, Belgium) e a citocina IFN- γ , medida por ELISA (descrição abaixo).

3.3 Validação das proteínas de interesse: dosagem de transtiretina, IFN- γ e TNF- α .

3.3.1 Breve descritivo das proteínas de escolha

Com base no estudo de bioinformática, foram selecionadas as proteínas transtiretina, IFN- γ e TNF- α para validação.

A transtirretina (TTR), também conhecida como pré-albumina é uma proteína que foi assim nomeada pois ela se liga aos hormônios tireoidianos e ao retinol (vitamina A), sendo esta a sua principal função. É sintetizada principalmente no fígado podendo ser encontrada no plasma e no fluido cerebrospinal. Essa proteína é muito conhecida por causar amiloidose sistêmica, uma doença onde há o depósito de proteínas amiloides em alguns órgãos específicos comprometendo a sua função (NC-IUB., 1978; FELDING, FEX, 1982; SMITH, GOODMAN, 1971; VIEIRA, SARAIVA, 2013). É uma proteína solúvel que quando mutada torna-se insolúvel formando fibras amiloides que se depositam em tecidos, principalmente o sistema nervoso periférico. Mais de cem mutações na TTR já foram descobertas e estão envolvidas na polineuropatia amiloide familiar (FAP) e nas formas graves de amiloidose (PLANTÉ-BORDENEUVE, SAID, 2011; PLANTE-BORDENEUVE, 2014; ANDO, NAKAMURA, ARAKI, 2005; YEE et al., 2019). A TTR pode ser utilizada como indicador de estados de desnutrição e correlação nos resultados de diversas doenças, inclusive como marcador no câncer gástrico, em complicações pós-operatórias e metástases nas neoplasias gástricas. Os níveis de TTR plasmáticos têm sido utilizados como biomarcador de doenças malignas como pulmão, esôfago e câncer renal, associados ao mau prognóstico quando diminuídos (RAMBOD et al., 2008; DEVAKONDA et al., 2008; AHN et al., 2012; ZHOU et al., 2017; ESFAHANI et al., 2016; KAWAI, OTA, 2012; KELLY et al., 2012; CAI et al., 2017; SHIMURA et al., 2018).

A TTR foi demonstrada como potencial biomarcador em LMC como preditivo ou associado à terapia. Em relação às leucemias, esses achados são novos uma vez que essa proteína ainda não havia sido demonstrado no contexto da doença (FATIMA, SADAF, MUSHARRAF, 2017).

Da mesma maneira, o fator regulatório do interferon (IRF3) é uma proteína membro da família de fatores de transcrição possível de ser analisado pela proteômica. Quando fosforilado, o IRF3 migra para o núcleo onde regula e induz a transcrição dos interferons (IFN) alfa e beta, citocinas envolvidas na resposta imunológica. Em um estudo com LLA, observou que quando silenciado o IRF3 bloqueia o processo de diferenciação de células B e, quando super expresso, a capacidade de diferenciação é restaurada. Esses dados sugerem o envolvimento de

IRF3 – IFN α/β na maturação celular (A DE LAURENTS et al., 2015; YSEBRANT DE LENDONCK L, MARTINET V, GORIELY S, 2014; TAMASSIA N, et al., 2012; MULLER U, et al., 1994). Foi demonstrado que IRF3 facilita o desenvolvimento de LMA, promovendo o crescimento e sobrevivência celular, pois regula a expressão de miR-155, micro RNA que é regulado positivamente nesses pacientes (TIAN, et al., 2016). Polimorfismos no gene de IRF3 foram associados com a suscetibilidade e prognóstico de LLC (ZHANG et al., 2016). Devido ao seu papel crucial na regulação da produção de interferon, e da identificação da sua superexpressão nas amostras avaliadas, optou-se por avaliar os níveis desta citocina. A relevância do TNF- α já foi discutida no tópico que aborda a fisiopatologia da LLA, justificando-se sua escolha.

3.3.2 Dosagem de citocinas

Os níveis de IFN- γ e TNF- α foram medidos através de *kits* comerciais (e-Biosciences USA), pelo método de ELISA, seguindo o protocolo de análise recomendado pelo fabricante. Resumidamente, amostras de plasma foram adicionadas em uma placa de poliestireno contendo anticorpo de captura específico de cada citocina para incubação *overnight*. Na sequência, adicionou-se anticorpo de detecção marcado com avidina e solução do substrato para revelação da reação. Os resultados foram calculados em pg/mL segundo curva padrão obtida para cada uma das citocinas testadas.

3.3.3 Dosagem de transtiretina

A TTR, também conhecida como pré-albumina, foi mensurada nas amostras através de ensaio de turbidimetria imunológica utilizando-se *kit* comercial (Aptec Diagnostic, Belgium) com leitura a 340 nm. Os níveis de TTR foram definidos de acordo com a curva de calibração e expressos em mg/dL.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ESTRESSE OXIDATIVO

PARA DETERMINAR O PERFIL DE ESTRESSE OXIDATIVO DAS AMOSTRAS, QUANTIFICAMOS OS SEGUINTE PARÂMETROS:

a) Grupos sulfidril (SH): grupos sulfidril de proteínas foram avaliados pelo método descrito por Hu (1994) adaptado por Taylan e Resmi (2010). O método SH é baseado na reação do ácido 5,5-ditiobis-2 nitrobenzóico (DTNB) com grupos sulfidril. A determinação foi realizada em leitor de microplacas, Perkin Elmer®,

modelo EnSpire (Waltham, MA, EUA) a 412 nm. Os resultados foram expressos como μM de sulfidrilos.

b) Parâmetro antioxidante de captura total de radicais (TRAP): o TRAP foi avaliado de acordo com o método descrito por Repetto *et al.* (1996) no leitor de microplacas Victor X-3, Perkin Elmer® (Waltham, MA, EUA). As condições experimentais foram: tempo de execução de 25 minutos, faixa de resposta de 300 a 620 nm e temperatura de 30° C. Este método detecta antioxidantes hidro e/ou lipossolúveis presentes no soro. Os resultados foram expressos como trolox μM .

c) Metabólitos do óxido nítrico (NOx): os níveis de NOx foram avaliados indiretamente por meio da determinação da concentração de nitrito plasmático, por meio de uma adaptação da técnica descrita por Navarro-González *et al.* (1998). Este método é baseado na redução do nitrato presente na amostra a nitrito por meio de reações de oxidação-redução mediadas pelo sistema reagente cádmio-cobre. As amostras foram desproteínas com sulfato de zinco (ZnSO_4) e em seguida foram colocadas em contato com os grânulos de cádmio (após ativação com sulfato de cobre CuSO_4). Em seguida, o reagente de Griess foi adicionado para induzir a diazotização, formando um complexo colorido e subsequente detecção em 540 nm. A quantificação de NOx foi realizada em leitor de microplacas Asys Expert Plus, Biochrom® (Holliston, MA, EUA). A concentração de metabólitos de óxido nítrico foi expressa como nitrito μM .

d) Hidroperóxidos lipídicos - ensaio de quimioluminescência (LOOH): LOOH foram determinados de acordo com uma adaptação da técnica descrita por Gonzales-Flecha *et al.* (1991) e Panis *et al.* (2012). Este método usa o composto terc-butil hidroperóxido para iniciar uma reação em cadeia lipídica que pode ser detectada por emissão de fótons durante a formação de hidroperóxidos lipídicos. As leituras foram realizadas em um luminômetro Glomax (TD 20/20 Turner Designers, E.U.A.) durante 1 hora a 1 leitura/s. Os resultados foram expressos como unidades relativas de luz (RLU).

3.5 CARACTERIZAÇÃO CLINICOPATOLÓGICA E DETERMINAÇÃO DO STATUS DE DRM

Foram analisados os prontuários médicos para coletar os seguintes dados: idade e peso ao diagnóstico, etnia, data do diagnóstico e transplante de medula óssea. A leucometria, contagem de plaquetas e níveis de hemoglobina foram extraídos dos hemogramas realizados no hospital cujos resultados foram inseridos

em prontuário. A DRM foi realizada por citometria de fluxo e foi definida como negativa, com $< 0,01\%$ de célula leucêmica, sendo a sensibilidade analítica de 10^{-3} .

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações foram realizadas de acordo com a distribuição normal dos dados no teste de Shapiro-Wilk, bem como a homogeneidade pelo teste de Levene. As diferenças foram avaliadas comparando-se D0 x D28 de sangue periférico e D0 x D28 de medula óssea pelo teste T de Student (dados paramétricos) ou teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos). Não realizamos comparações entre os dados de PB e BM. Os gráficos foram apresentados como box-plots (mínimo a máximo). Todas as análises foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4 LOCAIS DE REALIZAÇÃO DOS ESTUDOS

- As análises de estresse oxidativo foram realizadas no laboratório de Pós-Graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da UEL.
- As dosagens de citocinas foram realizadas no Laboratório de Biologia de Tumores da Unioeste de Francisco Beltrão.
- A análise de proteômica foi realizada no Laboratório de Proteômica do Sangue da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido ao comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos da Universidade Estadual de Londrina. CEP/UEL CAAE: 24498213.0.0000.5231 (apêndice).

6 RESULTADOS

ARTIGO 1



ORIGINAL RESEARCH
published: 14 December 2020
doi: 10.3389/fonc.2020.550213



Comparative Analysis of Systemic and Tumor Microenvironment Proteomes From Children With B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia at Diagnosis and After Induction Treatment

Geise Ellen Broto^{1,2†}, Stephany Corrêa^{3†}, Fausto Celso Trigo⁴, Everton Cruz dos Santos³, Fernanda Tomiotto-Pelissier⁵, Wander Rogério Pavanelli⁵, Guilherme Ferreira Silveira⁶, Eliana Abdelhay^{3†} and Carolina Panis^{1,2,5,7*†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Suman S. Thakur,
Centre for Cellular and Molecular
Biology (CCMB), India

Reviewed by:

Marilia Seelaender,
University of São Paulo, Brazil
Alex Kentisis,
Cornell University, United States

***Correspondence:**

Carolina Panis
carolpanis@hotmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 08 April 2020

Accepted: 06 November 2020

Published: 14 December 2020

Citation:

Broto GE, Corrêa S, Trigo FC, Santos ECd, Tomiotto-Pelissier F, Pavanelli WR, Silveira GF, Abdelhay E and Panis C (2020) Comparative Analysis of Systemic and Tumor Microenvironment Proteomes From Children With B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia at Diagnosis and After Induction Treatment. *Front. Oncol.* 10:550213. doi: 10.3389/fonc.2020.550213

¹ Programa de Pós-graduação em Patologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ² Laboratório de Biologia de Tumores, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão, Brazil, ³ Laboratório de Células-Tronco, Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴ Pediatrics Department, Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, Brazil, ⁵ Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ⁶ Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Carlos Chagas, Curitiba, Brazil, ⁷ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Francisco Beltrão, Brazil

Among the childhood diseases, B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL) is the most frequent type of cancer. Despite recent advances concerning disease treatment, cytotoxic chemotherapy remains the first line of treatment in several countries, and the modifications induced by such drugs in the organism are still poorly understood. In this context, the present study provided a comparative high-throughput proteomic analysis of the cumulative changes induced by chemotherapeutic drugs used in the induction phase of B-ALL treatment in both peripheral blood (PB) and bone marrow compartment (BM) samples. To reach this goal, PB and BM plasma samples were comparatively analyzed by using label-free proteomics at two endpoints: at diagnosis (D0) and the end of the cumulative induction phase treatment (D28). Proteomic data was available via ProteomeXchange with identifier PXD021584. The resulting differentially expressed proteins were explored by bioinformatics approaches aiming to identify the main gene ontology processes, pathways, and transcription factors altered by chemotherapy, as well as to understand B-ALL biology in each compartment at D0. At D0, PB was characterized as a pro-inflammatory environment, with the involvement of several downregulated coagulation proteins as KNG, plasmin, and plasminogen. D28 was characterized predominantly by immune response-related processes and the super expression of the transcription factor IRF3 and transthyretin. RUNX1 was pointed out as a common transcription factor found in both D0 and D28. We chose to validate the proteins transthyretin and interferon-gamma (IFN- γ) by commercial kits and expressed the

Abstract

Among the childhood diseases, B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL) is the most frequent type of cancer. Despite recent advances concerning disease treatment, cytotoxic chemotherapy remains the first line of treatment in several countries, and the modifications induced by such drugs in the organism are still poorly understood. In this context, the present study provided a comparative high-throughput proteomic analysis of the cumulative changes induced by chemotherapeutic drugs used in the induction phase of B-ALL treatment in both peripheral blood (PB) and bone marrow compartment (BM) samples. To reach this goal, PB and BM plasma samples were comparatively analyzed by using label-free proteomics at two endpoints: at diagnosis (D0) and the end of the cumulative induction phase treatment (D28). Proteomic data was available via ProteomeXchange with identifier PXD021584. The resulting differentially expressed proteins were explored by bioinformatics approaches aiming to identify the main gene ontology processes, pathways, and transcription factors altered by chemotherapy, as well as to understand B-ALL biology in each compartment at D0. At D0, PB was characterized as a pro-inflammatory environment, with the involvement of several downregulated coagulation proteins as KNG, plasmin, and plasminogen. D28 was characterized predominantly by immune response-related processes and the super expression of the transcription factor IRF3 and transthyretin. RUNX1 was pointed out as a common transcription factor found in both D0 and D28. We chose to validate the proteins transthyretin and interferon-gamma (IFN- γ) by commercial kits and expressed the results as PB/BM ratios. Transthyretin ratio was augmented after induction chemotherapy, while IFN- γ was reduced at the end of the treatment. Considering that most of these proteins were not yet described in B-ALL literature, these findings added to understanding disease biology at diagnosis and highlighted a possible role for transthyretin and IFN- γ as mechanisms related to disease resolution.

Keywords: B-acute lymphocytic leukemia; chemotherapy; proteomics; induction phase; Transthyretin; interferon-gamma; IRF3.

Introduction

B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL) is the most frequent neoplasia in childhood worldwide (1). Regardless of the great success in B-ALL treatment, this disease consists of an important cause of death in the child population. Considerable advances have been reached in understanding the biology of leukemia, and most are due to the scientific community efforts to bring new information based on high-throughput studies based on molecular approaches, that have driven recently B-ALL treatment to powerful targeted treatments (2).

The clonal rise of leukemia cells is mainly associated with cumulative mutations that directly affect the panel of proteins that are secreted in the tumor microenvironment (3). Some of these proteins are responsible for cellular events in the leukemic niche that control disease spread (4) and can result from systemic transcriptional changes related to disease prognosis (5). Drug therapy can also have a profound impact in B-ALL biology, further than killing its malignant clones. Changes in the local and systemic immunological profiles have been reported in B-ALL patients after completing conventional chemotherapy, and are related to their immune recovering (6). Remodeling induced by treatment in the genomic profile of

blood cells from B-ALL has been reported as a determinant of prognosis and associated with disease outcomes as relapse and death (7).

Recently, proteomics-based approaches have been revealed as valuable tools to map changes in the protein profiling in both blood and bone marrow of B-ALL patients (8), and are helping to explore gaps related to disease relapse (9), chemoresistance (10), and biomarker discovery (11). Despite this, studies focusing on understanding the comparative analysis between the bone marrow tumor microenvironment and the peripheral blood are still missing. In this context, some overarching challenges as the hidden mechanisms behind immature lymphoid cells accumulation in the bone marrow, as well the mechanisms underlying the chemotherapy effects against B-ALL need to be improved, and therefore, the study of leukemia biology and the cumulative impact of the initial phase of chemotherapy become necessary.

For this purpose, this study performed the proteomic analysis of samples from children diagnosed with B-ALL by comparing bone marrow and peripheral blood profiles, before chemotherapy starting - at diagnosis, and the cumulative effects found after the induction treatment. To reach this goal, we used the nano-ultra performance liquid chromatography label-free proteomic strategy to obtain the differential proteomic profiles and further investigated the putative mechanistic evidence by using bioinformatics tools.

Methods

Patients selection and sample collection

A total of 17 children diagnosed with B-ALL attended from September 2014 to January 2016 in the Londrina Cancer Hospital, Londrina-Paraná, Brazil, were enrolled. Those responsible for the children signed their consent terms. This study was approved by the Institutional Ethics Committee (approval number CAAE 24498213.0.0000.5231) and was designed and conducted following the ethical principles for medical research involving human subjects from the Declaration of Helsinki. The Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies (REMARK) criteria were followed regarding patient selection, assay performance, and data analysis throughout the study. All samples were routinely screened in the laboratory to determine the type of leukemia, and only those diagnosed as B-ALL were included in the study.

All patients presented as high risk at diagnosis, and were submitted to the same drug schedule, as determined by the Brazilian Group for Treatment of Childhood Leukemia scheme - GBTLI 2009, displayed in Figure 1. The induction protocol was based on a combined schedule based on prednisone, L-asparaginase, vincristine, and doxorubicin. Whole peripheral blood and bone marrow aspirate samples were collected in EDTA tubes from recently diagnosed patients, before starting any treatment (D0) and at the end of the chemotherapy induction phase (D28). Samples were centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes at 4⁰C to the obtention of plasma and kept frozen until analysis. Each sample was supplemented with a 1000:1 (μL) protease inhibitor cocktail (GE Healthcare, USA).

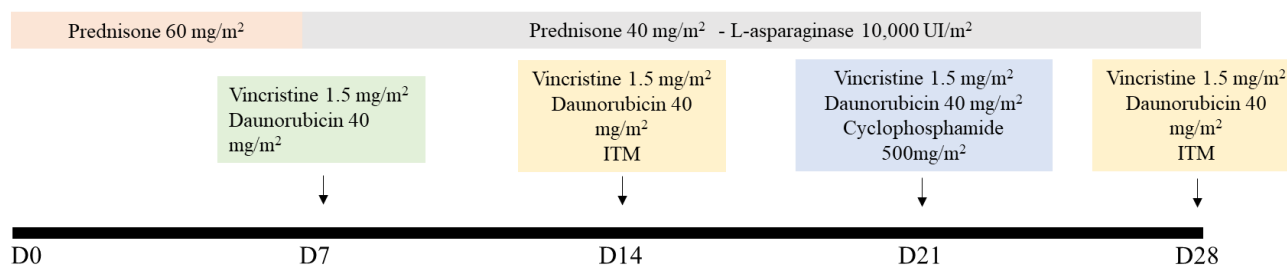


Figure 1 - Induction phase chemotherapeutic schedule - Prednisone 60 mg/m² orally from D1 to D7, then 40 mg/m² / day orally, divided into 2-3 doses for 3 weeks (D8-29), suspending regressively in 3 to 4 days. If necessary, Prednisolone can be administered intravenously, divided into 3 doses. Vincristine: 1.5 mg / m²/ week intravenously (maximum dose of 2 mg) administered in days 8, 15, 22 and 29. Daunorubicin: 40 mg/m²/week intravenously, administered in days 8, 15 and 22. L-Asparaginase: 10,000 IU/m² intramuscular or intravenous (if thrombocytopenia <75000 / mm³) every 3 days, from day 8 of treatment, for a total of 9 doses. Cyclophosphamide: 500 mg/m² intravenously on days 22 and 23 of induction for patients in the slow response subgroup. Intrathecal medication (ITM): triple therapy with Methotrexate, Ara-C and Dexamethasone will be administered at age-adjusted doses, on days 15 and 29 of induction (> 1 <3 years: 10mg/m² and 20mg/m², for Methotrexate and Ara-C respectively; > 3 <9 years: 12 mg / m² and 24 mg/m², respectively; > 9 years: 15mg/m² and 30mg/m², respectively. The dose of Dexamethasone is uniform (2 mg/m². Max. 2 mg dose). Reference:

Label-free protein quantitation via mass-spectrometry (MS)

Proteomic analysis was conducted with pooled plasma samples for each B-ALL group. Protein quantification was obtained via the Bradford assay, and the samples were processed using Amicon columns device of 3 kDa ultra-filtration (Millipore, USA) for concentration (39x) and exchanged buffer with 50 mM NH₄HCO₃. A total of 200 µg of protein were used for subsequent treatment with Rapigest 2 µg/µL (Waters), DTT 100 mM (Sigma), IAA 100 mM (Sigma), and tryptic digestion 0.25 µg/µL (High-grade Trypsin, Promega), carried out at 37 °C, overnight and under light agitation (400 rpm). The proteomic approach applied in this study was the nano-Ultra Performance Liquid Chromatography (nano-UPLC) tandem nano-ESI-HDMSE method for qualitative and quantitative experiments. A nanoACQUITY UPLC system (Waters, UK) was employed, as previously reported by our group.(12,13) Briefly, a strong cation exchange column (180 µm × 23 mm, Waters, England) packed with Polysulfoethyl aspartamide (5 µm, PolyLC, USA) was used for the first dimension. Nine salt gradient fractions were used to elute the samples from the strong cation exchange column, followed by an RP gradient. After the peptides were captured, the trap column was placed online with a different RP analytical column (100 µm × 100 mm, 1.8 µm C18, nanoACQUITY UPLC HSS T3, Waters, UK), and an RP gradient of 5–40% acetonitrile (containing 0.1% v/v formic acid) in 58 min was used as the second dimension, with a flow rate of 600 nL min⁻¹. Analyses were performed using nano-ESI in positive ion mode (nanoESI (+)) with a NanoLockSpray ionization source (Waters, UK). Multiplexed data-independent scanning with specificity and selectivity based on nonlinear “T-wave” ion mobility (HDMSE) experiments were performed with a Synapt HDMS mass spectrometer (Waters, UK), as previously described (14). Full scan orthogonal acceleration TOF (oa-TOF) MSE data were acquired from m/z 50 to 2000.

Database searching, quantification, and statistical analysis

Database searching and protein quantification were performed as previously reported (15-17) Using the PLGS Expression E tool algorithm, the identified proteins were organized into a statistically significant list corresponding to increased and decreased regulation ratios between the plasma from peripheral blood compared to plasma from bone marrow at D0 and the plasma from peripheral blood compared to plasma from bone marrow at D28. *In silico*

analysis for biological processes, canonical pathways, network interactions, and transcription factors were performed using Metacore™ software (Clarivate Analytics, <https://portal.genego.com/>).

Validation study

Transthyretin and interferon-gamma (IFN- γ) were chosen as targets for the validation step. Transthyretin (also known as pre-albumin) was measured in PB and BM plasma by a commercial kit based on immune turbidimetry assay (Aptec Diagnostics, Belgium). Plasma samples were individually diluted 1:10 in a saline buffer and an aliquot of 50 μ L was added to 900 μ L of reaction buffer. This mixture was read at 340 nm (OD₁). Then, 60 μ L of goat anti-human pre-albumin antibody was added to this mixture and read again at 340 nm after a 5-minute incubation (OD₂). The difference between both OD was obtained, and transthyretin levels were calculated against a standard calibration curve. Interferon-gamma levels were determined in samples by using the Human Th1/Th2 cytokine kit (BD Biosciences, catalog number 550749) by flow cytometry. A plasma aliquot of 50 μ L from each patient was mixed to 50 μ L of capture beads provided by the kit and incubated for 3 hours with 50 μ L of PE detection reagent. After each tube was washed and centrifuged, the bead pellet recovered, plated, and read after incubation in a flow cytometer (BD Accuri™). The same procedure was performed to the calibration standard curve. Results were expressed individually and as PB/BM ratios, and compared by t-test in the software GraphPad Prism 6.0, considering as significant a p-value < 0.05.

Results

Table 1 shows the clinicopathological characteristics of patients. A total of 17 B-ALL children were enrolled in the study, the mean age at diagnosis was 6.8 years, 9 patients were male, most of them were Caucasian, and the mean body mass index was 16.8 kg/m². The mean leukocyte counting in the PB at D0 was 18,273 cells/mm³, ranging from 200 to 74,300 white blood cells/mm³, and 1,609 cells/mm³ at D28 in PB, ranging from 200 to 9,700 white blood cells/mm³. The mean tumor cells counting in BM aspirate at D0 was 56%, ranging from 28-90%, and 6.5% at D28, ranging from 0-11%.

	B-ALL patients
Total number of patients	n = 17
Gender	
Female	n = 8
Male	n = 9
Ethnicity	
Caucasian	n = 15
Afro-descendant	n = 2
Mean age at diagnosis, years (min-max)	6.9 (1.7 – 15)
Mean body mass index, kg/m² (min-max)	16.8 (13.13-25)
Mean leukocyte counting, peripheral blood cells/mm³ (min-max)	
D0	18,273 (200-74,300)
D28	1,609 (200-9700)
Mean blast counting in bone marrow aspirate, percentage (min-max)	
D0	56 (28-90)
D28	6,5 (0-41)

Figure 2 shows the results of the initial high-throughput screening of blood

and bone marrow samples at D0 and D28. As shown in Figure 2A, 91 proteins were initially identified as differentially expressed, with 7 proteins expressed uniquely in the blood, 21 down expressed in blood, and 18 exclusively expressed in the bone marrow. At D28, 94 proteins were initially identified as differentially expressed among blood and bone marrow, being 8 overexpressed in blood, while 12 were down expressed in blood being exclusive from bone marrow. A false discovery rate (FDR) of a maximum of 4% was applied, and an FDR rate lower than 1% was detected for all analyses, at protein and peptide level, on average. Moreover, a minimum of 15 peptides, on average, was applied for protein identification.

The Venn diagram (Figure 2B) shows that 23 proteins were exclusively differentially expressed in the blood at D0, and 15 were exclusively differentially expressed in the blood at D28. Moreover, 5 proteins were common to both D0 and D28 (vitronectin, apolipoprotein C III, serum amyloid A2 protein, inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 and putative protein ZNF720, Figure 2C). Vitronectin was upregulated in both comparisons whereas apolipoprotein C III and putative protein ZNF720 were downregulated in both comparisons. However, 2 proteins had their expression shifted among comparisons: serum amyloid A2 protein and inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4, which indicate their putative association in treatment response.

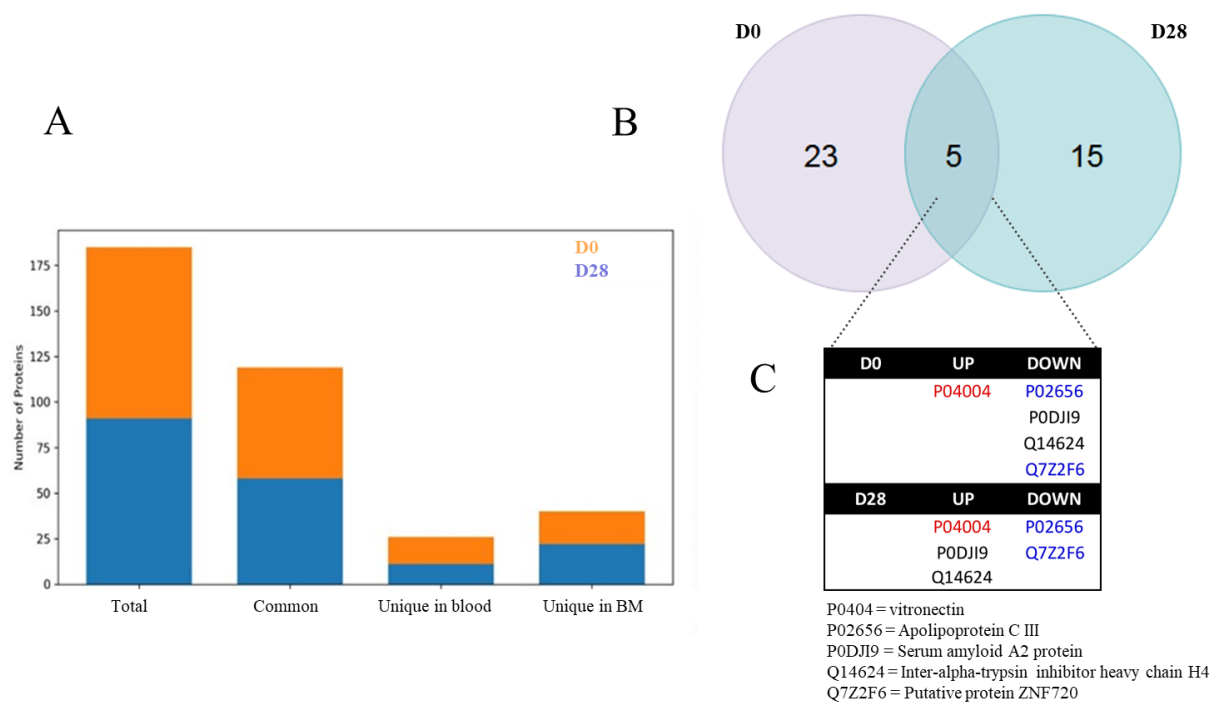


Figure 2 – Initial high-throughput proteomic screening results. In (A), the number of common and unique proteins identified. In (B), Venn's diagram from the differentially expressed proteins in our study. Up and downregulated proteins differentially expressed in peripheral blood plasma samples from ALL-B patients at D0 – at diagnosis, before treatment start, and D28 – at the end of the treatment, in the blood in relation to bone marrow. (C) Highlight from the 5 protein differentially expressed among D0 and D28. In red: upregulated proteins in both comparisons; In blue: downregulated proteins in both comparisons; In black: proteins in which quantification shifted according to comparison to bone marrow. * Chemotherapeutic protocol according to the Brazilian Group for Treatment of Childhood Leukemia scheme (2009).

Box 1 shows the final list containing differentially identified proteins after 2-fold change cut-off and statistical significance, and their status as up or downregulated in the blood at D0 and D28. The full list of identified proteins, together with raw data and details regarding methods were deposited in ProteomeXChange repository (Project accession: PXD021584, Project DOI: 10.6019/PXD021584).

Box 1 – Up and downregulated proteins differentially expressed in peripheral blood plasma samples from ALL-B patients at D0 – at diagnosis, before treatment start, and D28 – at the end of the treatment, in relation to bone marrow.

UPREGULATED IN BLOOD – D0	UPREGULATED IN BLOOD – D28
Uncharacterized protein C16orf90 Apolipoprotein C-I Vitronectin Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain Forkhead box protein E3 Dehydrogenase/reductase SDR family member 11 Protein RUFY3	Transthyretin Vitronectin Serum amyloid A-2 protein Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 Interferon regulatory factor 3 Reticulocalbin-3 Regulator of microtubule dynamics protein 1 Protein C10
DOWNREGULATED IN BLOOD – D0	DOWNREGULATED IN BLOOD – D28
Apolipoprotein A-II Immunoglobulin kappa variable 3D-15 Immunoglobulin kappa variable 3-15 Potassium channel subfamily K member 1 Putative PIN1-like protein P antigen family member 1 Plasminogen Kininogen-1 Hemoglobin subunit epsilon Apolipoprotein C-III Leucine-rich alpha-2-glycoprotein Serum amyloid A-2 protein Notch homolog 2 N-terminal-like protein C Hemoglobin subunit gamma-1 Hemoglobin subunit gamma-2 Paired box protein Pax-2 Complement factor H-related protein 3 Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H4 Putative protein ZNF720 Notch homolog 2 N-terminal-like protein A Protein eva-1 homolog A	Homeobox protein VENTX Prothrombin Apolipoprotein C-III Homeobox protein Hox-B1 Inorganic pyrophosphatase ATPase family AAA domain-containing protein 3B Docking protein 3 Putative protein ZNF720 Ribonuclease 8 Zinc finger and SCAN domain-containing protein 10 WW domain binding protein 1-like Hsp70-binding protein 1

Figure 3 shows the significant gene ontology cellular processes and networks regarding the differentially expressed proteins in the blood at D0 and D28, as identified by using the Metacore software. At D0, the main processes identified were related to the cellular redox status and detoxification, and the networks were related to inflammation and blood coagulation signaling. At D28, the processes were related mainly to inflammation and immunity, and the networks represented mostly extracellular remodeling and innate immune response-related pathways.

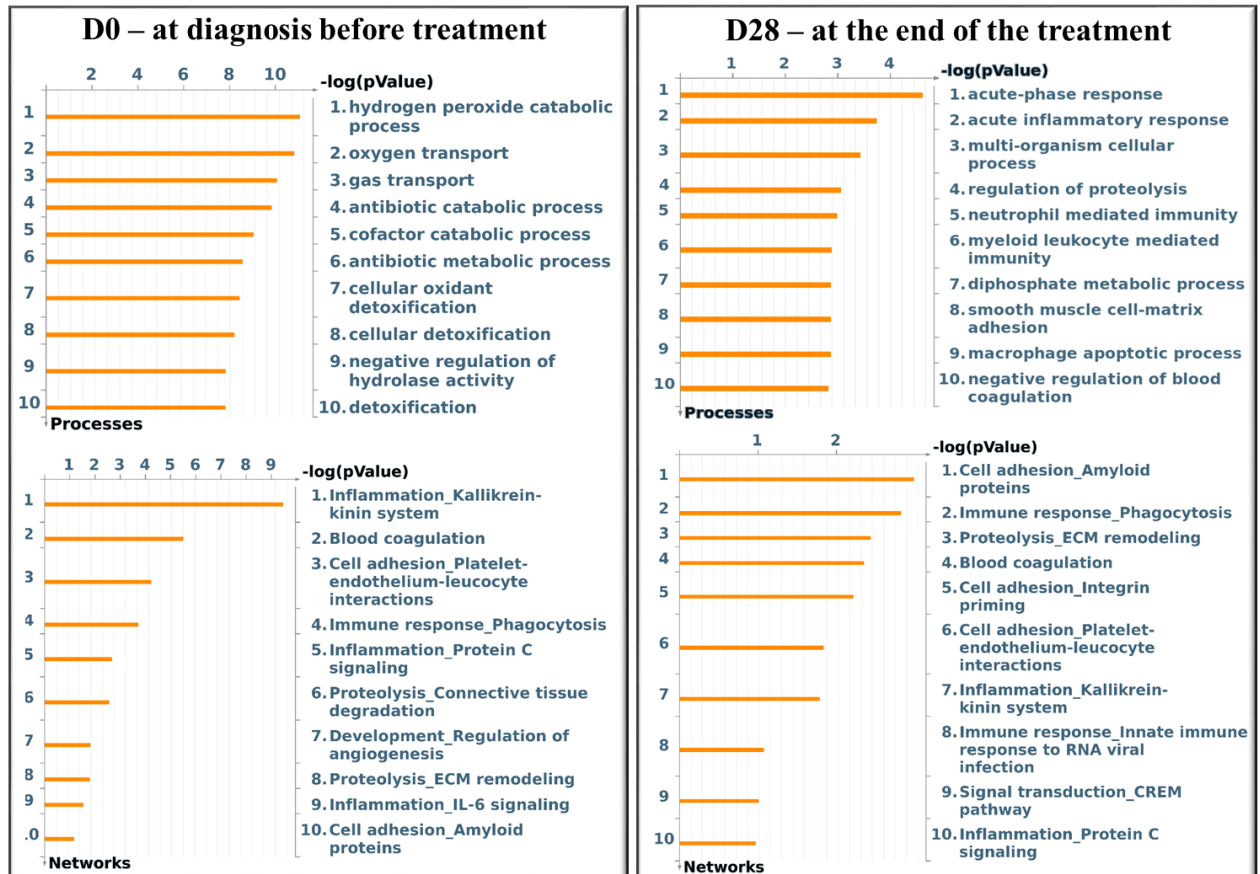
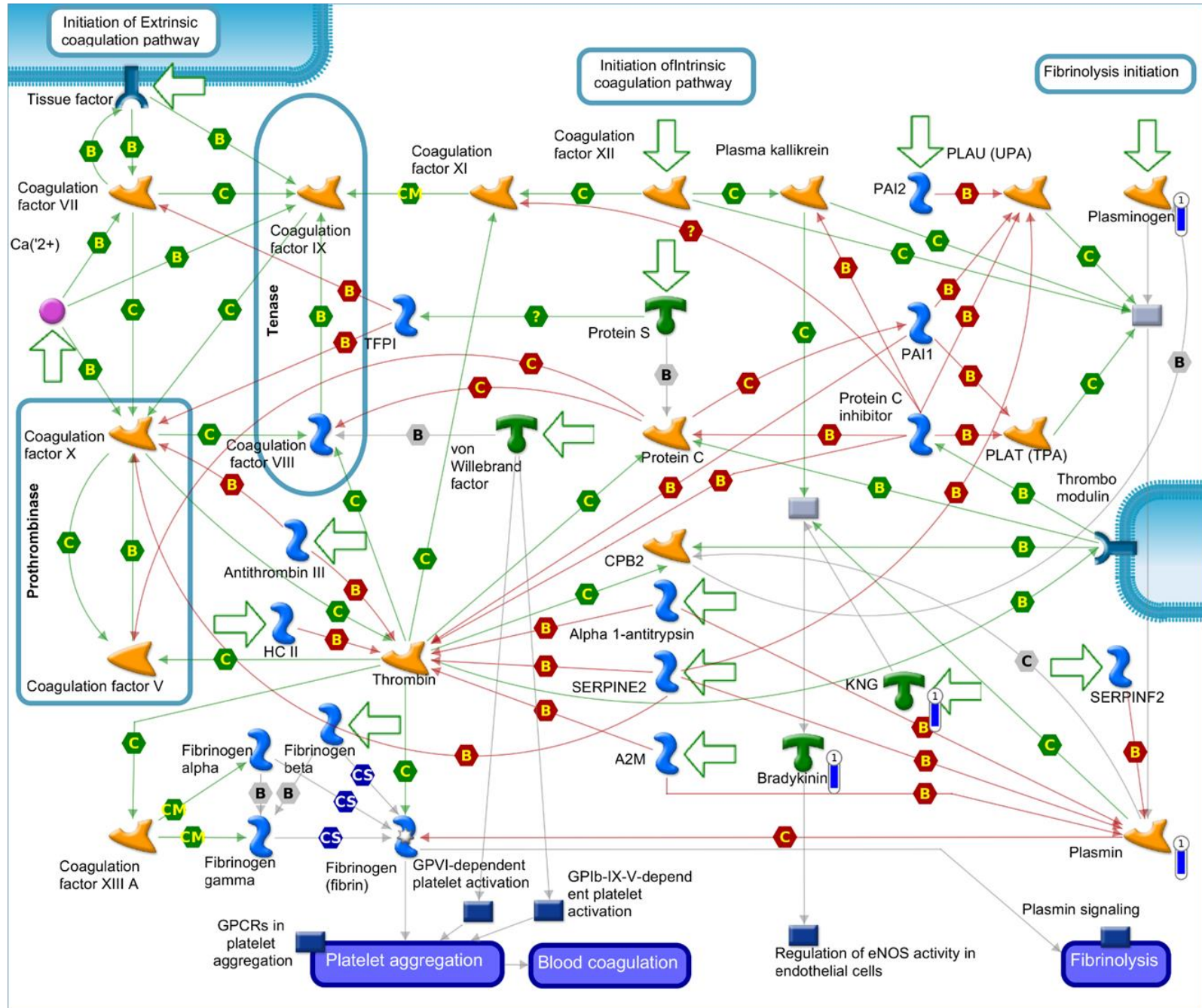


Figure 3 – Significant Gene Ontology cellular processes and networks identified by Metacore analysis of the differentially identified proteins from each group. *In silico* analysis was performed using GeneGO Metacore™ software (GeneGO Inc., USA). Sorting is done for the 'Statistically significant Processes.

The *in silico* analysis of the differentially expressed proteins at D0 in the blood of patients (Figure 4) revealed that some downregulated proteins, as KNG, plasmin, bradykinin, and kallidin, were enrolled in the protein folding and maturation process (Figure 4A), which affects inflammation. In Figure 4B, downregulated proteins from the coagulation system, plasminogen, KNG, and plasmin are shown. Plasminogen and plasmin are also highlighted in the map shown in Figure 4C, as participants of the wound-healing, proliferation, and migration processes. Figure 4D shows the involvement of the upregulated vitronectin in the extracellular matrix remodeling and actin cytoskeleton reorganization processes, altogether with the downregulated plasminogen and plasmin.

B



D

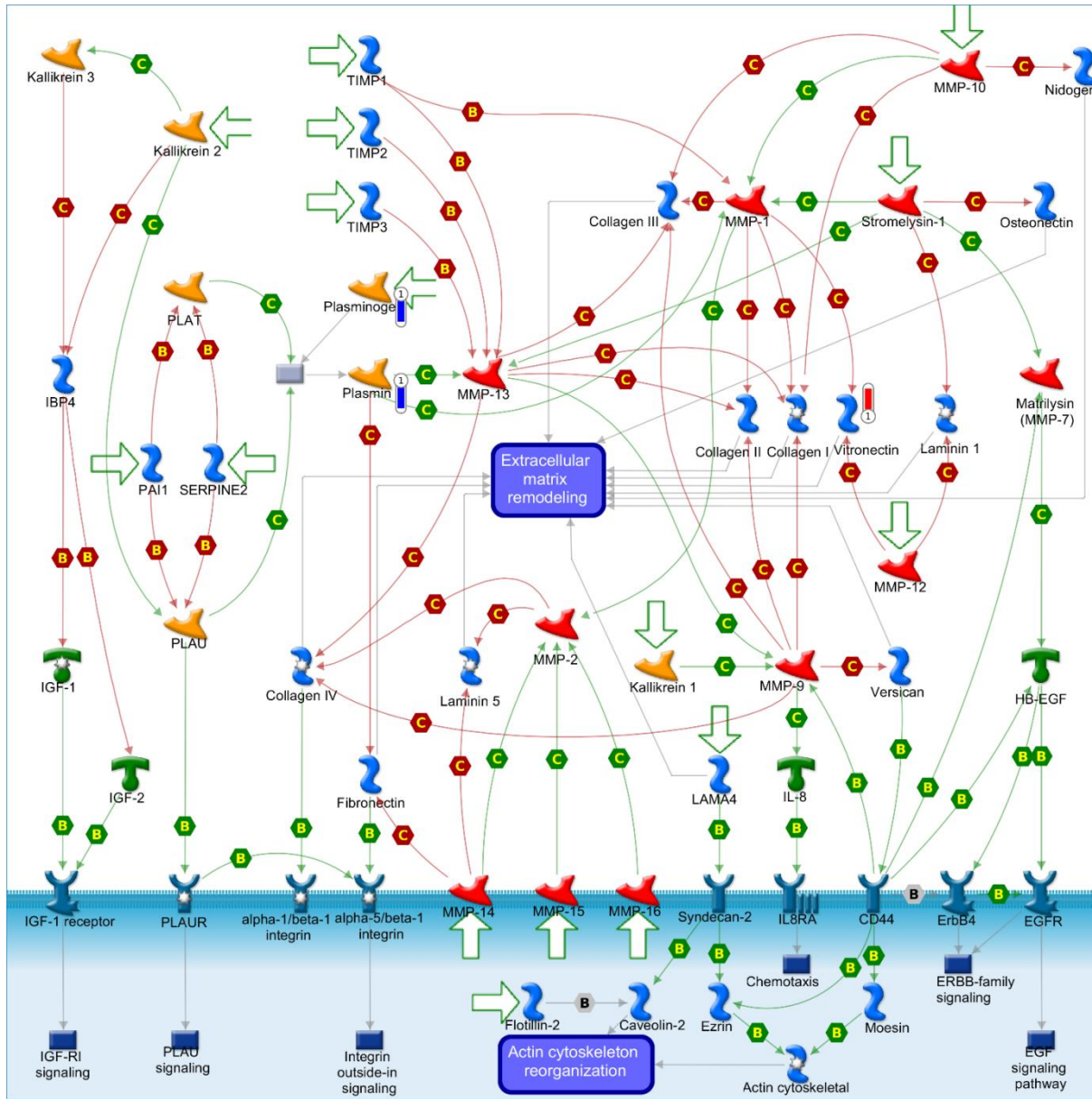
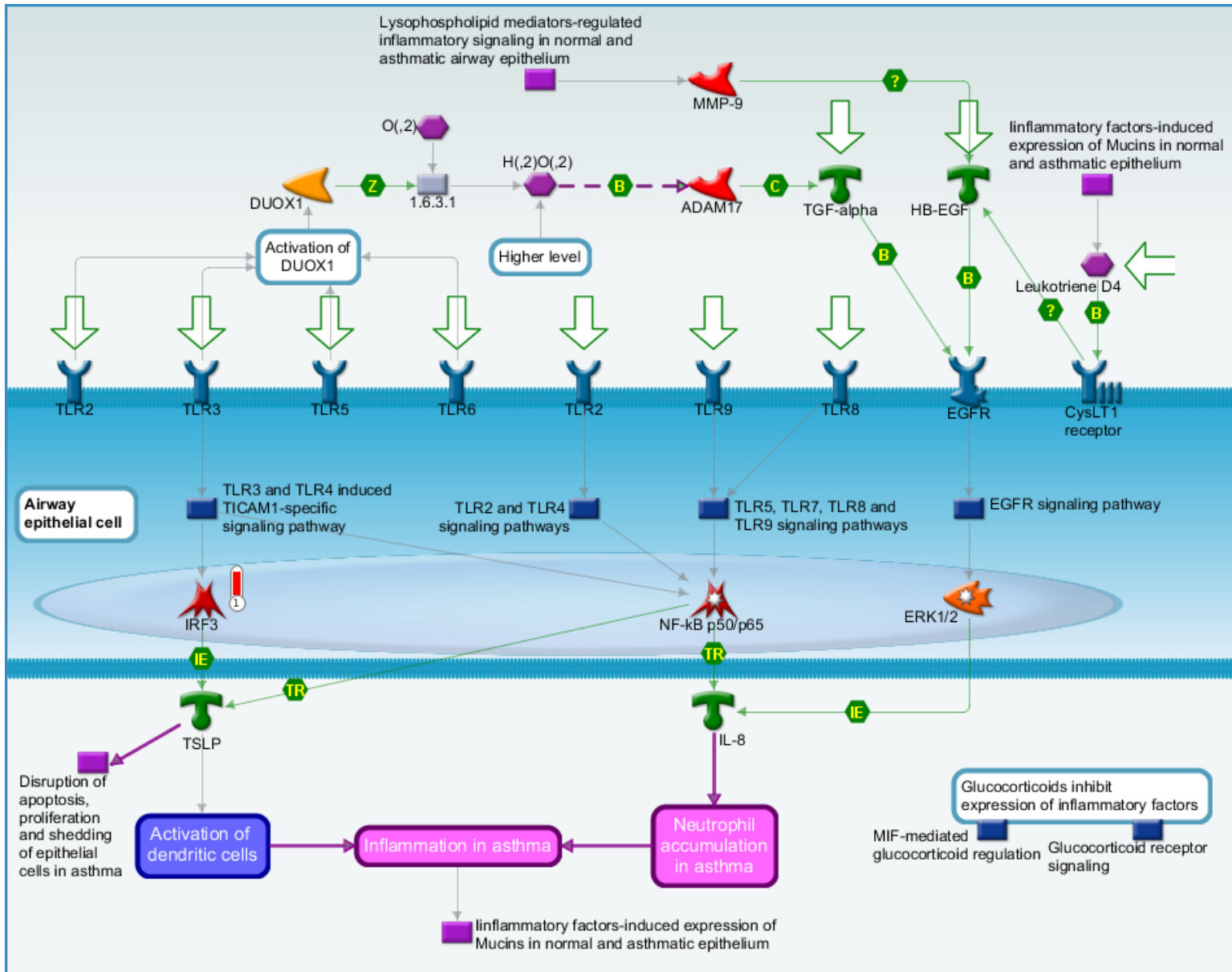
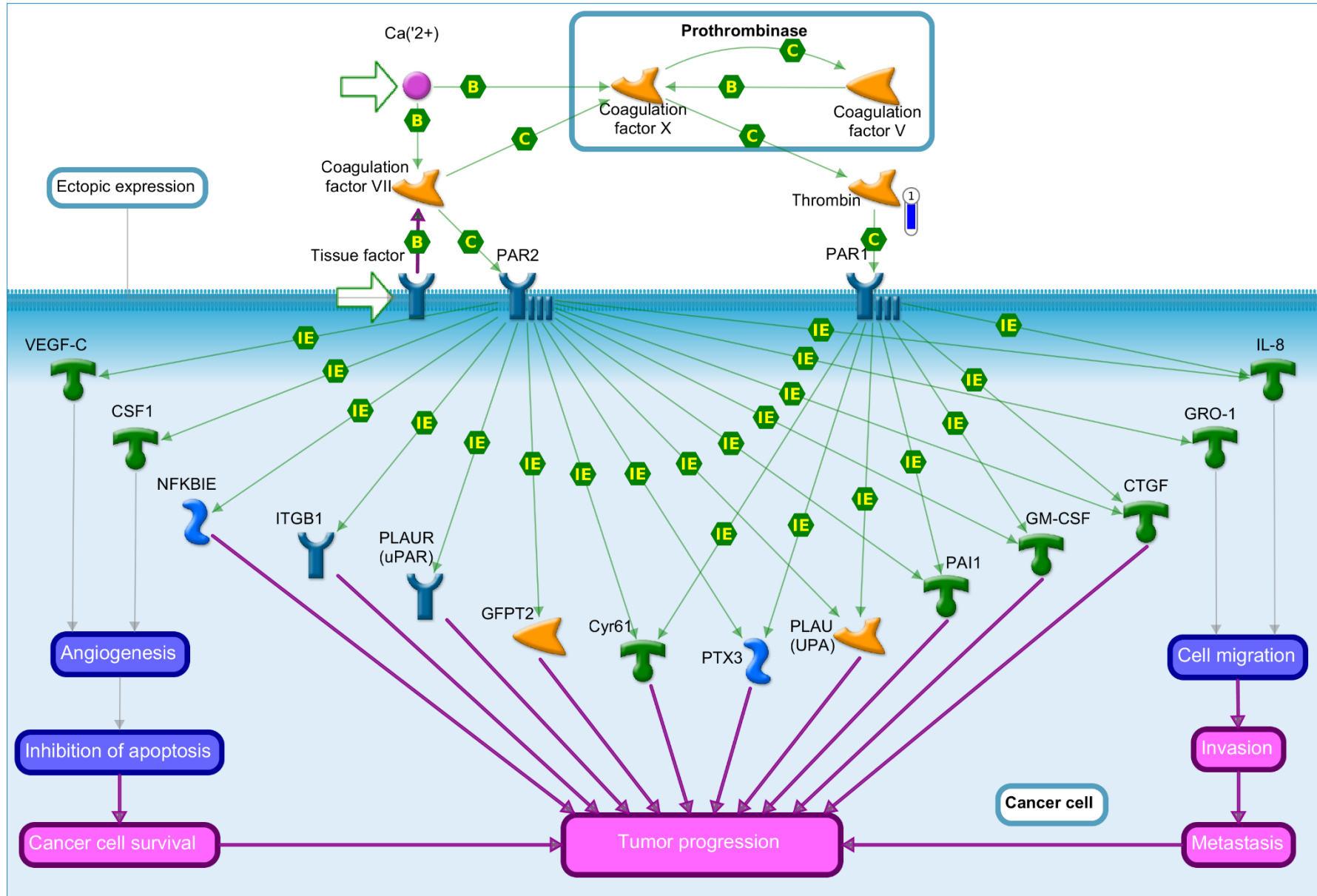


Figure 4 – In silico analysis reveals the main biological networks differentially expressed in the blood of ALL-B at D0. (A) Protein folding and maturation, (B) Blood coagulation, (C) Wound healing and (D) extracellular matrix remodelling. Experimental data from all files is linked to and visualized on the maps as thermometer like figures. Up ward thermometers have red color and indicate up regulated signals and down ward (blue) ones indicate down regulated expression levels of the genes.

Figure 5 shows the main biological networks for the differentially expressed proteins found in the blood at D28. Figure 5A shows the enrollment of the upregulated transcription factor named interferon regulatory factor 3 (IRF3) in triggering the TLR-inflammatory cascade. In 5B, thrombin downregulation and its putative role in cell migration and tumor progression pathways. Figure 5C demonstrates the upregulated protein transthyretin and its participation in the stem cell differentiation process.





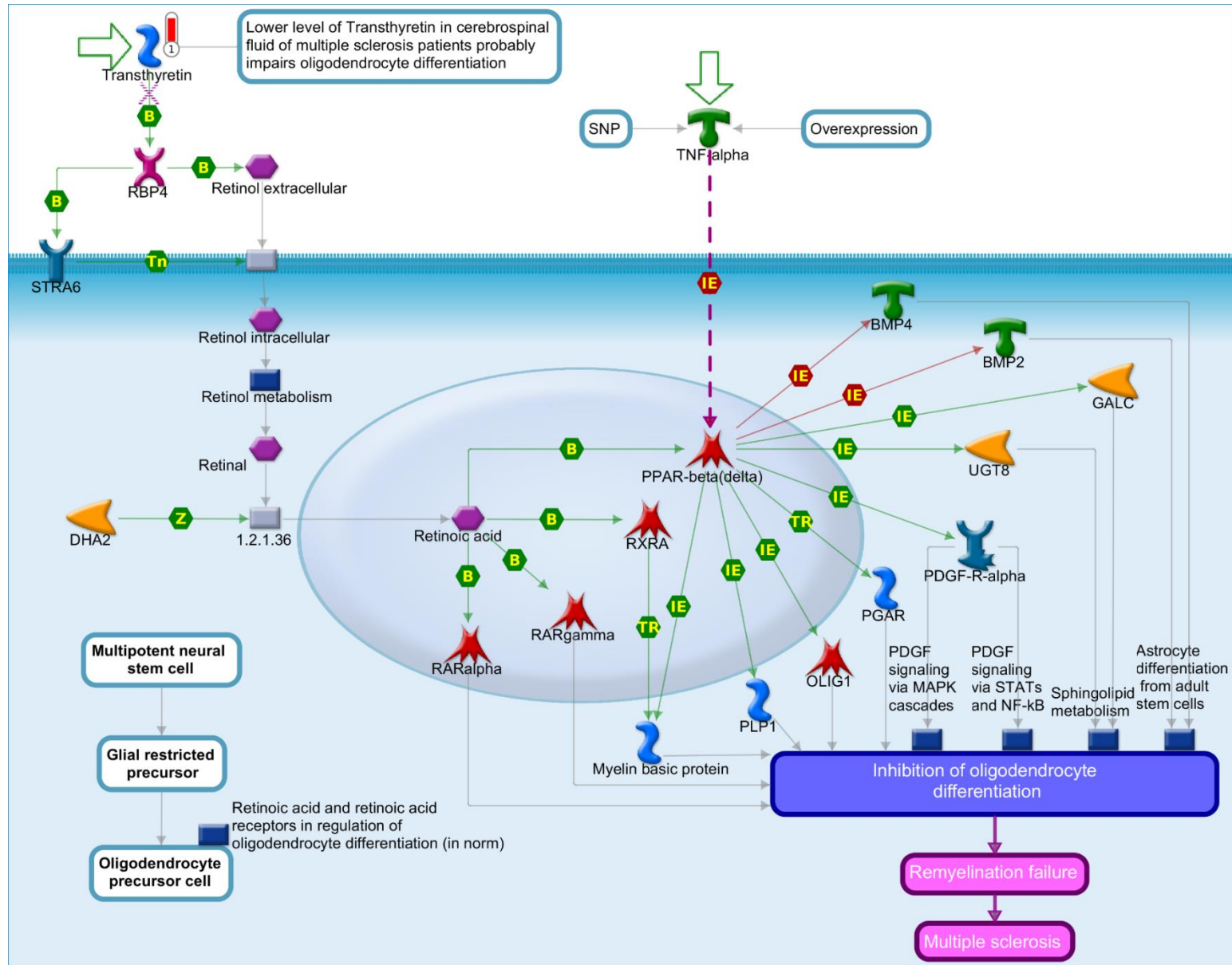


Figure 5 – In silico analysis reveals the main biological networks differentially expressed in the blood of ALL-B at D28. (A) IRF3-TLR-induced inflammatory signaling, (B) Expression targets of Tissue factor signaling in cancer and (C) 7-Retinoic acid regulation of cell differentiation. Experimental data from all files is linked to and visualized on the maps as thermometer like figures. Up ward thermometers have red color and indicate up regulated signals and down ward (blue) ones indicate down regulated expression levels of the genes.

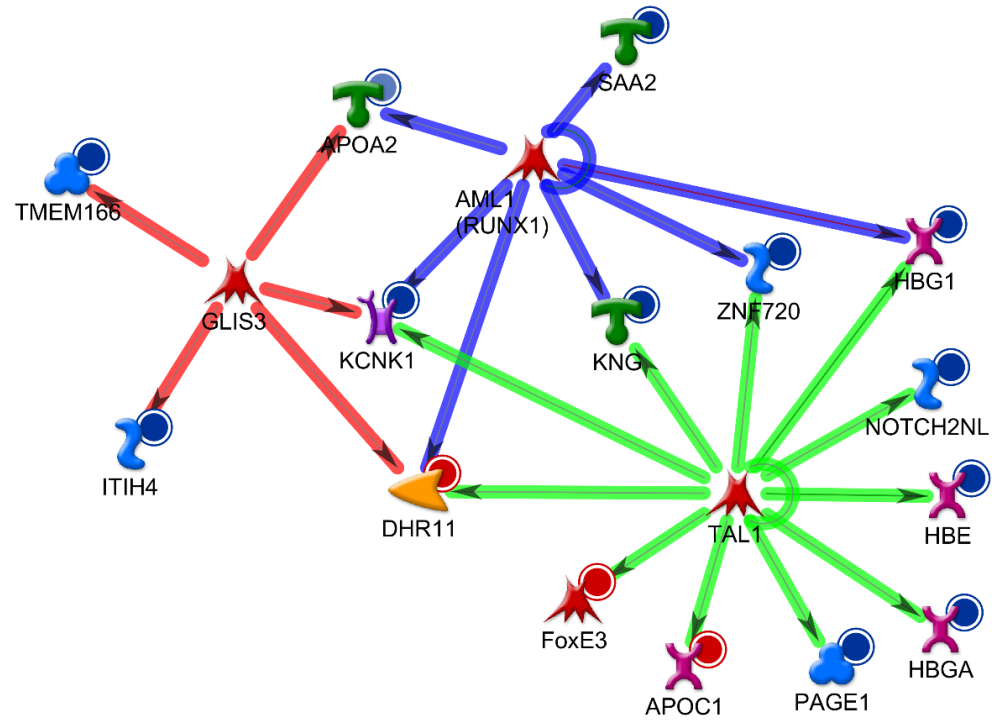
Metacore analysis also provided the potential transcription factors (TFs) identified as upstream regulators in ALL-B identified proteins. As shown in Box 2, it was observed differences between the top 10 upstream regulators pointed for D0 and D28 in the blood. Some TFs presented a difference in the score (e.g. FOXP3) and some TFs were only associated with D0 data (e.g. TAL1) or D28 data (e.g. GCR). We selected TAL1 from D0 analysis and AML1(RUNX1) from D28 analysis to visualize their regulation in the attempt to better understand the potential regulation of these TFs (Figures 6A and B). We observed a crosslink with other TFs, which is different among analysis (D0 x D28), together with an activation/inhibition regulation.

Box 2: Top 10 upstream regulators from D0 and D28, after comparison between peripheral blood and bone marrow, identified by Metacore analysis.

DO	D28
GATA1	GATA1
TAL1	AML1 (RUNX1)
SOX17	SOX17
HNF4-alpha	HNF4-alpha
FOXP3	ETS1
AML1 (RUNX1)	GCR
SOX2	GABP-alpha
GATA2	SOX2
c-MYC	FOXP3
GLIS3	Oct-3/4

Legend: GATA1 = GATA Binding Protein 1, TAL1 = T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1, SOX17 = SRY-related HMG-box 17 protein, HNF4-alpha = Hepatocyte nuclear factor 4 alpha, FOXP3 = forkhead box P3 or scurfin, AML1 (RUNX1) = Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) also known as acute myeloid leukemia 1 protein (AML1) or core-binding factor subunit alpha-2, SOX2 = SRY-Box Transcription Factor 2, GATA2 = GATA-binding factor 2, c-MYC = c-MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor, GLIS3 = GLIS Family Zinc Finger 3, ETS1 = v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, GCR = glucocorticoid receptor, GABP-alpha = GA-binding protein alpha chain, Oct-3/4 = Octamer binding transcription factor 3/4.

A



B

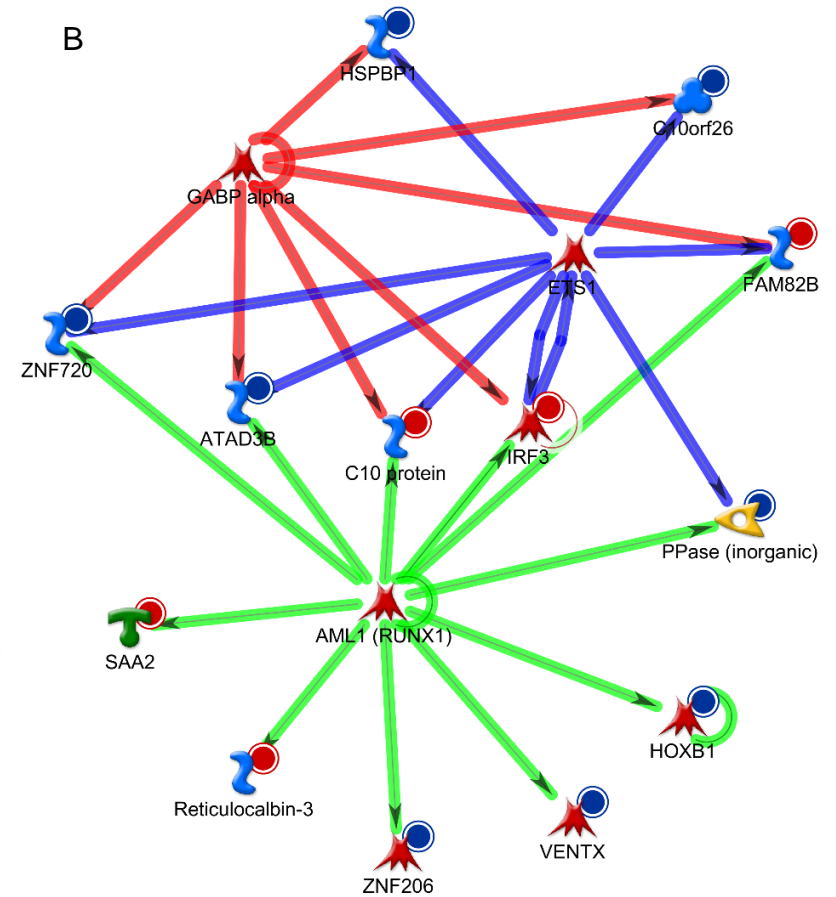


Figure 6 – Major potential upstream regulators based on differentially expressed proteins at the blood in D0 (A) and D28 (B).

For validation, we chose the proteins transthyretin and interferon-gamma (a protein originated from IRF3 activation), since both represent new information in B-ALL biology. Our data showed that the PB/BM ratio for IFN- γ was reduced at D28 (1.2 ± 0.1 at D0 and 0.65 ± 0.05 at D28, Figure 7A, $p < 0.05$), while transthyretin was augmented at D28 (0.85 ± 0.05 at D0 and 1.25 ± 0.02 at D28, Figure 7B, $p < 0.05$). Individual values for both transthyretin and IFN- γ measurements in PB and BM, at D0 and D28, are displayed in 7C (means \pm standard errors of the means and min-max values). Finally, the individual comparison of data shown a significant augment of IFN- γ in BM at D28 ($p < 0.05$).

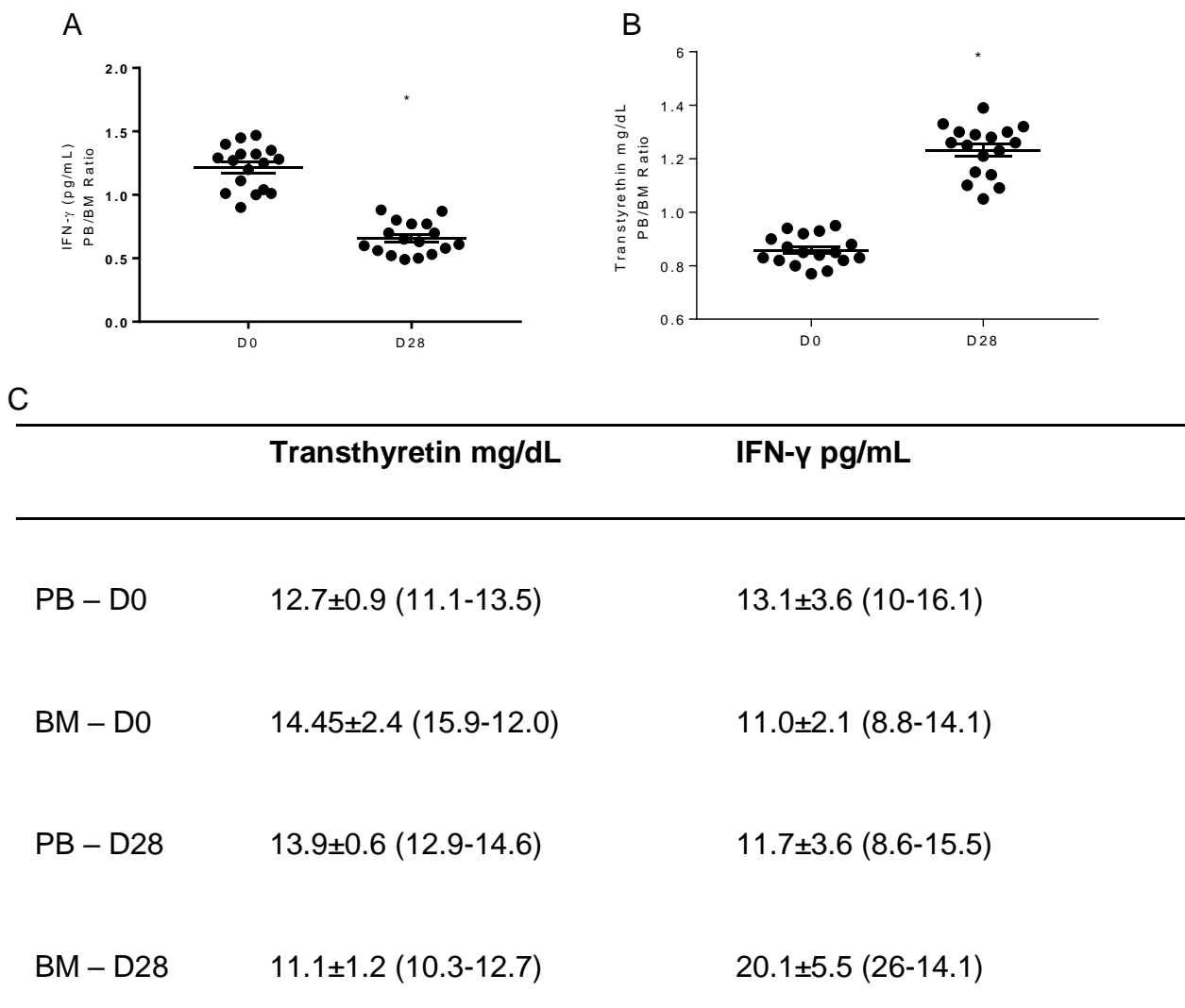


Figure 7 – Validation of transthyretin and interferon gamma (IFN- γ) levels in plasma samples from B-ALL patients. Peripheral blood (PB)/bone marrow (BM) ratio for A) interferon gamma and B) transthyretin levels. In C, specific levels for each protein at diagnosis (D0) and at the end of the treatment (D28), represented as mean \pm standard error of the mean (min-max). * indicates statistical significance, $p < 0.05$.

To reinforce the relationship between the proteins discovered, we performed a word cloud study (Figure 8). The group of proteins present in each time point and at different levels of expression returned frequencies of different terms in a search in PubMed. Four searches were carried out with the term leukemia and proteins in each analyzed condition (A - D0 down, B - D28 down, C - D0 up, and D - D28 up), returning the 10 most recent works. The abstracts of the works were concatenated and organized as a term corpus (analyzed by the Natural Language Toolkit package - NLTK 3.4 and Word Cloud 1.6.0 for Python). The size of the word represents the frequency in the corpus and highlighted the interferon axis at the D28.

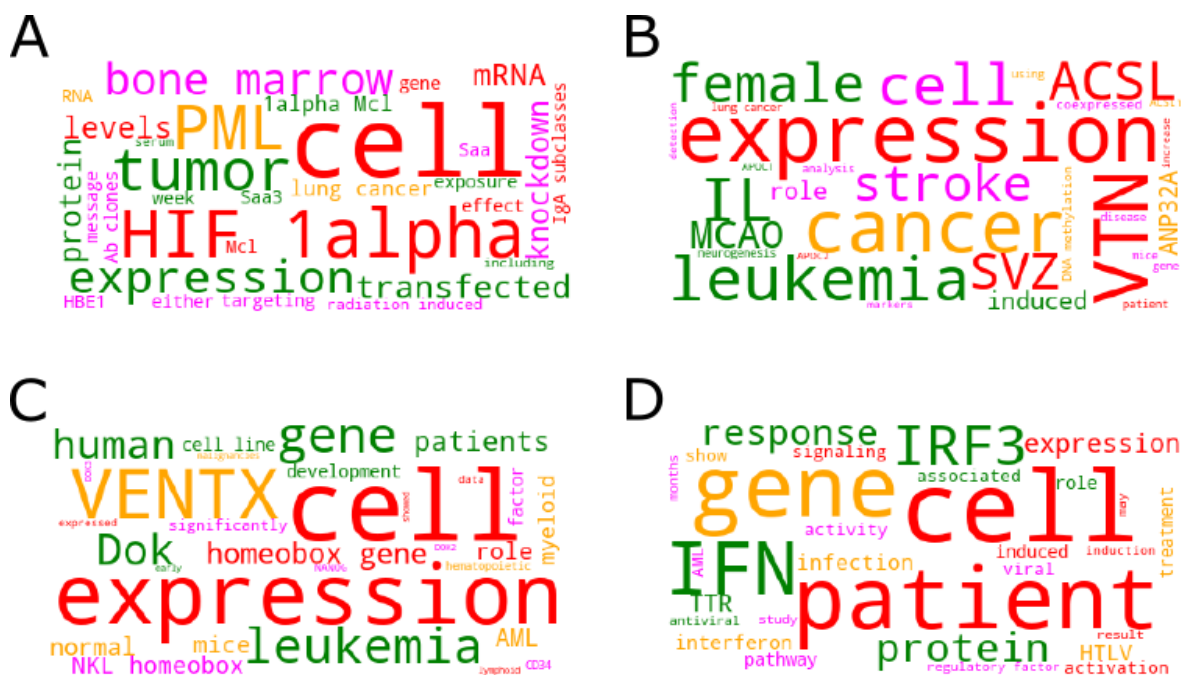


Figure 8 - The group of proteins present in each timepoint and at different levels of expression, return frequencies of different terms in Pubmed search. Word cloud generated by the frequency of the terms present in the abstracts return as a result of the search in the Pubmed. Four searches were carried out with the term leukemia and proteins in each analyzed condition (A - D0 down, B - D28 down, C - D0 up and D - D28 up), returning the 10 most recent works. The abstracts of the works were concatenated and organized as a term corpus, analyzed by the Natural Language Toolkit package - NLTK 3.4 and WordCloud 1.6.0 for Python. The size of the word represents the frequency in the corpus.

Discussion

Proteomic-based strategies are powerful tools to identify new information in tumor biology studies, by using designs that are of relevance to clinical practice (18,19). In the present study, the comparative analysis of the proteomic profile between the systemic (blood) and tumor (bone marrow) microenvironments provided a picture regarding the main proteins and processes that are present at diagnosis(D0) and triggered by the induction chemotherapy (D28) in the blood from ALL-B patients. The comparison performed between D0 and D28

allowed to describe the cumulative effect of cytotoxic treatment, understand the main processes present in ALL-B at diagnosis, and to know the main proteins differentially expressed that are relevant in each compartment before and after chemotherapy.

At diagnosis, before any treatment starting (D0), the blood was characterized as a pro-inflammatory environment, where some redox processes might be occurring. Further, it was identified that proteins that are classically viewed as coagulation players can also participate in different signaling pathways and processes in B-ALL. The involvement of coagulation proteins as KNG, plasmin, and plasminogen, that were found in our study as downregulated in the blood at diagnosis (D0), was suggested by *in silico* analysis as far beyond than clotting. The participation of such proteins in pivotal processes as wound healing and extracellular matrix remodeling has not yet been discussed in B-ALL biology.

The four main processes highlighted by the *in silico* analysis at D0 are cross-linked and display the systemic movement for tissue remodeling headed by coagulation proteins in the context of B-ALL. Protein folding processes refer to the tissue remodeling-driven events triggered by the exposure of tissue factors, in which coagulation cascade plays a crucial role. The extracellular matrix (ECM) is a broadly dynamic tissue structure that changes to allow processes as cell proliferation, migration, and differentiation (20). Therefore, at B-ALL diagnosis, it seems to exist a battle between pro and anti-ECM remodeling, headed by different proteins.

The downregulation of the coagulation proteins identified here could represent a tentative protective mechanism since the inhibition of wound healing processes could result in reduced cell proliferation and impair migration, both necessary in leukemia biology. It is known that dysregulation of ECM composition can critically support cancer progression and the malignant behavior of the cells by changing the interplay between the tumor microenvironment and the cells who reside there (21). Bradykinin, for example, can have its availability affected negatively by metalloproteinases (22), while the inhibition of plasminogen activation attenuates the metastatic behavior of breast cancer cells (23). Therefore, the downregulation of these proteins could be positive for tumor establishment.

On the other hand, vitronectin seems to act here as a pro-ECM protein, since its up-regulation could affect positively the reorganization of the cytoskeleton by matrix metalloproteinases (24), favoring cell organization to spread. On cancer stem cells, it has been shown that vitronectin is the component present in human serum that drives stem cell differentiation through an integrin-dependent mechanism, responsible for tumor formation (25).

At the end of the induction phase (D28), which represents the cumulative effect of all drugs administered in patients for B-ALL shutdown, we found that the main processes and networks were related to the immune-mediated inflammatory response. We have previously reported that chemotherapy can regulate negatively the systemic acute-phase proteins in breast cancer patients, as coagulation proteins, by using the same analytical strategy (26). The downregulation of thrombin found in our patients should be important for their remission since this protein is connected with angiogenesis, tumor growth, and metastasis (27).

Another important chemotherapy-induced event reported here refers to the super expression of the transcription factor IRF3 in the blood of B-ALL-patients, induced by chemotherapy. From the best of our knowledge, this is the first report that describes the presence of IRF3 in the blood of B-ALL patients. Despite the role of IRF3 in B-ALL is little known, it seems to be linked to B-cell differentiation in the presence of the TEL-AML1 fusion protein, the most common genetic rearrangement reported in B-ALL patients (28).

Considering this, IRF3 could represent a positive mechanism induced by chemotherapy in the present study, since after killing the malignant clones of B-ALL, the main systemic signaling changed to cell differentiation. To understand the impact of chemotherapy on IRF3 activation and B-ALL dynamics during induction, we measured the levels of IFN- γ , a type I interferon, that can both regulate (37) and be regulated by IRF3 (38). The axis IRF3/IFN- γ has been described as a pivotal immune mechanism in anti-tumor responses (38). Our data have shown that, at the end of the treatment, there was a considerable reduction in the PB/BM ratio of IFN- γ . In this context, the possibilities are i) the IFN- γ consumption by immune cells against B-ALL, since at D28 the tumor cells were cleared from BM by chemotherapy (as shown in Table 1, mean tumor cells counting in bone marrow aspirate under 7%) and ii) that IRF3 super expression at D28 was enough to induce the production of IFN- γ by cells from BM niche, more than those in the PB (as demonstrated in the box of Figure 7).

This reasoning takes our discussion to another super expressed protein found in the blood of our patients, the transthyretin. This protein has a role in normal cell differentiation by providing adequate levels of thyroxin, a hormone requested for B-cell maturation (29). Transthyretin has been reported as low at B-ALL diagnosis, but progressively augments in ALL patients during the induction phase of treatment (30), suggesting that this protein can be induced by chemotherapy. Investigation of transthyretin levels at D28 shown that its PB/BM ratio is significantly higher than at D0, corroborating this hypothesis. Considering this, it could be suggested that transthyretin super expression after induction treatment could represent a positive factor associated with B-ALL eradication. High transthyretin observed at D28 was concomitant with the elimination of the immature malignant clones in both PB and BM in all patients, suggesting that its augment could represent an additional marker for tumor cell elimination during the B-ALL induction phase treatment.

Therefore, D28 proteomic profiling called attention to proteins that are enrolled in the resolution of B-ALL by regulating cell proliferation and differentiation homeostasis.

The *in silico* analysis evidenced the possible TFs related to disease (D0) and to the induction treatment (D28). This because (1) most of the shared TFs among the different endpoints (D0 versus D28) do not have the same representativeness, suggesting that their regulation is altered with treatment. As shown from our data, AML1 (RUNX1) exhibited different targets and crosstalk to other TFs, despite being a TF present in both D0 and D28 analysis. This TF is mostly in AML due to the ETV6/RUNX1 translocation and its relevance has been recently discussed in B-ALL (31,32). However, the RUNX1 role is still not investigated for non-translocated tumors. Secondly, the "exclusive" TFs from each data may account for the more specific molecular changes in B-ALL before and after treatment. TAL1 (TAL BHLH Transcription Factor 1, Erythroid Differentiation Factor) has been described classically as associated with ALL-T and enrolled with MAPK-Erk Pathway (33) and NF-kappaB Signaling (34). However, it has been reported as methylated in specific cohorts (patients aged >9 years and in patients showing relapse), suggesting its potential prognostic value (35). Our proteomic data together with bioinformatics analysis corroborates this hypothesis.

Proteomics has been used as a valuable tool to understand B-ALL biology and propose putative new markers of clinical relevance. A study from Cavalcante et al conducted in B-ALL patients after induction chemotherapy using mass spectrometry reported proteins shared to those that we highlighted in the present study, including components from the coagulation pathway, pointed out as candidates to follow up favorable responses after induction therapy (39). Moreover, substantial advances are being reached with this approach regarding determinant clinical features of B-ALL, as the relation between surface proteins expression

and disease risk stratification (40), highlighting proteomics as a complementary tool that can help to guide decision making.

In conclusion, our proteomic study added to understanding B-ALL biology at diagnosis and highlighted some important proteins and processes that may contribute to our understanding of the mechanisms concerning the impact of chemotherapy on disease resolution. Our findings highlight the relevance of IRF3-IFN γ axis induction as a possible mechanism enrolled in disease resolution, and point out transthyretin as an upregulated protein induced by the induction phase of chemotherapy.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico (CNPq), INCT para o Controle do Câncer and Fundação Araucária for providing the financial support of the study.

References

1. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* (2017) 35(9):975-983.
2. Singh N, Frey NV, Grupp SA, Maude SL. CAR T Cell Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia and Potential for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* (2016) 17(6):28.
3. Batista CR, Lim M, Laramée AS, Abu-Sardanah F, Xu LS, Hossain R et al. Driver mutations in Janus kinases in a mouse model of B-cell leukemia induced by deletion of PU.1 and Spi-B. *Blood Adv.* (2018) 2(21):2798-2810.
4. Polak R, de Rooij B, Pieters R, den Boer ML. B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their microenvironment. *Blood.* (2015) 126(21):2404-14.
5. Luna-Aguirre CM, de la Luz Martinez-Fierro M, Mar-Aguilar F, Garza-Veloz I, Treviño-Alvarado V, Rojas-Martinez A, et al. Circulating microRNA expression profile in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biomark.* (2015) 15(3):299-310.
6. Koskenvuo M, Ekman I, Saha E, Salokannel E, Matomäki J, Ilonen J, et al. Immunological Reconstitution in Children After Completing Conventional Chemotherapy of Acute Lymphoblastic Leukemia is Marked by Impaired B-cell Compartment. *Pediatr Blood Cancer* (2016) 63(9):1653-6.
7. Garza-Veloz I, Martinez-Fierro ML, Jaime-Perez JC, Carrillo-Sanchez K, Ramos-Del Hoyo MG, Lugo-Trampe A, et al. Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. *Dis Markers.* (2015) 2015:828145.

8. Yu R, Zhang J, Zang Y, Zeng L, Zuo W, Bai Y, et al. iTRAQ-based quantitative protein expression profiling of biomarkers in childhood B-cell and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Manag Res.* (2019) 11:7047-7063.
9. Schroeder MP, Bastian L, Eckert C, Gökbüget N, James AR, Sanchez JO, et al. Integrated analysis of relapsed B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia identifies subtype-specific cytokine and metabolic signatures. *Sci Rep.* (2019) 9(1):4188.
10. Dehghan-Nayeri N, Eshghi P, Pour KG, Rezaei-Tavirani M, Omrani MD, Gharehbaghian A. Differential expression pattern of protein markers for predicting chemosensitivity of dexamethasone-based chemotherapy of B cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* (2017) 80(1):177-185.
11. Calderon-Rodríguez SI, Sanabria-Salas MC, Umaña-Perez A. A comparative proteomic study of plasma in Colombian childhood acute lymphoblastic leukemia. *PLoS One.* (2019) 14(8):e0221509.
12. Corrêa S, Panis C, Binato R, Herrera AC, Pizzatti L, Abdelhay E. Identifying potential markers in Breast Cancer subtypes using plasma label-free proteomics. *Proteomics* (2017) 151, 33.
13. Liu H, Finch JW, Luongo JA, Li GZ, Gebler JC. Development of an online two-dimensional nano-scale liquid chromatography / mass spectrometry method for improved chromatography performance and hydrophobic peptide recovery. *J. Chromatograph.* (2006) 1135, 43.
14. Pizzatti L, Panis C, Lemos G, Rocha M, Cecchini R, Souza HG, et al. Label-free MSE Proteomic Analysis of Chronic Myeloid Leukemia Bone Marrow Plasma: disclosing New Insights From Therapy Resistance. *Proteomics* (2012) 12, 2618.
15. Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, et al. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal. Chem.* (2005) 77, 2187.
16. Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ, Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol. Cell. Proteomics* (2006) 5, 144.
17. Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, Forslund K, Heller D, Huerta Cepas J, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* (2015) 43, D447.
18. Panis C, Pizzatti L, Abdelhay E. How can Proteomics Reach Cancer Biomarkers? *Current Proteomics.* (2013) 10:136-149.
19. Panis C, Pizzatti L, Souza GF, Abdelhay E. Clinical proteomics in cancer: Where we are. *Cancer Lett.* (2016) 382(2):231-239.
20. Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014) 15(12): 786–801. doi: 10.1038/nrm3904.
21. Cameron W, Mojares E, Hernandez A. Role of Extracellular matrix in Development and Cancer Progression. *Int J Mol Sci.* (2018) 19(10): 3028.
22. Mark D, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2001) 17: 463–516.
23. Bazzi Z, Lanoue D, El-Youssef M, Romagnulo R, Tubman J, Cavallo-Medved D, et al. Activated thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFIa) attenuates breast cancer cell

metastatic behaviors through inhibition of plasminogen activation and extracellular proteolysis. *BMC Cancer*. (2016) 16: 328.

24. Malik R, Lelkes PI, Cukierman E. Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol*. (2015) 33(4): 230–236.

25. Hurt EM, Chan K, Serrat MAD, Thomas SB, Veenstra TD, Farrar WL. Identification of Vitronectin as an Extrinsic Inducer of Cancer Stem Cell Differentiation and Tumor Formation. *Stem Cells*. (2010) 28(3): 390–398. doi: 10.1002/stem.27

26. Panis C, Pizzatti L, Bufalo AC, Herrera AC, Victorino VJ, Cecchini R, et al. Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. *Tumour Biol*. (2016) 37(3):3775-83. doi: 10.1007/s13277-015-4203-7. Epub 2015 Oct 15.

27. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost*. (2004) 30(1): 63-9.

28. Laurentiis A, Hiscott J, Alcalay M. The TEL-AML1 fusion protein of acute lymphoblastic leukemia modulates IRF3 activity during early B-cell differentiation. *Oncogene*. (2015) 34(49):6018-28. doi: 10.1038/onc.2015.50. Epub 2015 Apr 20

29. Bloise FF, Oliveira FL, Nobrega AF, Vasconcellos R, Cordeiro A, Paiva LS, et al. High levels of circulating triiodothyronine induce plasma cell differentiation. *J Endocrinol*. (2014) 220(3):305-17. doi: 10.1530/JOE-13-0315. Print 2014 Mar.

30. Koskelo EK, Saarinen UM, Siimes MA. Low levels of serum transport proteins indicate catabolic protein status during induction therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. (1991) 8(1):53-9.

31. Vijayakrishnan J, Qian M, Studd JB, Yang W, Kinnersley B, Law PJ, et al. Identification of four novel associations for B-cell acute lymphoblastic leukaemia risk. *Nat Commun*. (2019) 10(1):5348. doi: 10.1038/s41467-019-13069-6.

32. Chatterton Z, Morenos L, Mechinaud F, Ashley DM, Craig JM, Sexton-Oates A, et al. Epigenetic deregulation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Epigenetics*. (2014) 9(3):459-67. doi: 10.4161/epi.27585. Epub 2014 Jan 6.

33. Panepucci RA, Oliveira LH, Zanette DL, Viu Carrara Rde C, Araujo AG, Orellana MD, et al. Increased levels of NOTCH1, NF-kappaB, and other interconnected transcription factors characterize primitive sets of hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev*. (2010) 19(3):321-32. doi: 10.1089/scd.2008.0397.

34. Zhou RQ, et al. Transcription factor SCL/TAL1 mediates the phosphorylation of MEK/ERK pathway in umbilical cord blood CD34⁺ stem cells during hematopoietic differentiation. *Blood Cells Mol Dis*. (2014) PMID 24405580.

35. Musialik E, Bujko M, Kober P, Wypych A, Gawle-Krawczyk K, Matysiak M, et al. Promoter methylation and expression levels of selected hematopoietic genes in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res*. (2015) 50(1):26-32. doi: 10.5045/br.2015.50.1.26.

36. Brandalise, SR, Pinheiro VR, Lee, MLM. Protocolo de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda da Criança e do Adolescente GBTLI LLA-2009. Grupo Sociedade Brasileira de Oncologia pediátrica , São Paulo: Campinas 2011. Pages 1-347.
37. Guinn ZP, Petro TM. Interferon regulatory factor 3 plays a role in macrophage responses to interferon- γ . *Immunobiology* (2019) 224(4):565-574.
38. Guinn Z, Brown DM, Petro TM. Activation of IRF3 contributes to IFN- γ and ISG54 expression during the immune responses to B16F10 tumor growth. *Int Immunopharmacol.* (2017) 50:121-129.
39. Cavalcante Mde S, et al. A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Res.* 2016;4:1.
40. Mirkowska P, et al. Leukemia surfaceome analysis reveals new disease-associated features. *Blood.* 2013;121(25):e149–e159.

ARTIGO 2

Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Current Research in Immunology

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/current-research-in-immunology

Impact of the induction phase chemotherapy on cytokines and oxidative markers in peripheral and bone marrow plasma of children with acute lymphocytic leukemia

G.E. Broto^a, P.R.B. Silva^a, F.C. Trigo^b, V.J. Victorino^c, K.L. Bonifácio^a, W.R. Pavanelli^f, F. Tomiotto-Pelissier^{f,g}, M.R. Garbim^d, S.T. Oliveira^d, J.J. Jumes^{d,e}, C. Panis^{d,e,f,1,*}, D. S. Barbosa^{a,1}

RESEARCH ARTICLE

Impact of the induction phase chemotherapy on cytokines and oxidative markers in peripheral and bone marrow plasma of children with acute lymphocytic leukemia.

Broto GE^a, Silva PRB^a, Trigo FC^b, Victorino VJ^c, Bonifácio KL^a, Pavanelli, WR^f, Tomiotto-Pelissier F^{f,g}, Garbim MR^d, Oliveira ST^d, Jumes JJ^{d,e}, Panis C^{d,e,f*} and Barbosa DS^{a*}.

^a Health Sciences Postgraduate Program, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil.

^b Londrina Cancer Institute, Londrina, Paraná, Brazil

^c Federal Institute of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^d Laboratory of Tumor Biology, State University of Western Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão, PR, Brazil

^e Health Sciences Postgraduate Program, State University of Western Paraná (UNIOESTE), Francisco Beltrão, PR, Brazil

^f Experimental Pathology Postgraduate Program, State University of Londrina (UEL), Londrina, PR, Brazil.

^g Carlos Chagas Institute, Curitiba, Paraná, Brazil.

***These authors equally contributed to the study**

Corresponding Author:

Carolina Panis, Ph.D

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

Keywords: acute lymphocytic leukemia, oxidative stress, hydroperoxides, lipid peroxidation, minimal residual disease.

Abbreviations list: B-ALL - B-cell acute lymphocytic leukemia, PB - Peripheral blood, BM- Bone marrow, NOx: nitric oxide products, SH- sulfhydryl groups, TRAP- total radical-trapping antioxidant parameter, D0 - At diagnosis, D8 - Day 8 after treatment starting, D15 - Day 15 after treatment starting, D22 - Day 22 after treatment starting, D28 - Day 28 after treatment starting, GBTLI - Brazilian Childhood Leukemia Treatment Group, LOOH - Lipid hydroperoxides, ANOVA - One-way analysis of variance, MRD - minimal residual disease, ROS - reactive oxygen species.

DECLARATIONS

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflicts of interest/Competing interests: None to declare.

Availability of data and material: Datasets of this study are available from the corresponding author upon request.

Ethics approval: CAAE number 24498213.0.0000.5231 – Plataforma Brasil.

Consent to participate: All participants have consent forms signed by their parents or guardians.

Consent for publication: All data presented in the manuscript was obtained after authorization for publication by parents or guardians of patients.

Authors contribution: All authors contributed to conceptualization, methodology and investigation, data curation and writing. Carolina Panis is the guarantor for the article.

ABSTRACT

B-cell acute lymphocytic leukemia (B-ALL) is the main neoplasia affecting children worldwide, in which cytotoxic chemotherapy remains the main treatment modality. In this study, we analyzed the profile of inflammatory markers concerning oxidative stress and cytokines in 17 B-ALL patients. Peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) samples were collected and evaluated for the pro-oxidative status (nitric oxide products-NO_x and hydroperoxides), antioxidants (sulfhydryl groups-SH and total radical-trapping antioxidant parameter-TRAP), and cytokines (TNF- α , IFN- γ), at diagnosis (D0) to and the end of the induction phase (D28). At D28, hydroperoxides were higher in PB, concomitant to TNF- α levels. IFN- γ was increased in the BM at D28. Hydroperoxides were higher in patients presenting malignant cells in BM and/or PB after treatment, a condition named minimal residual disease (MRD) when compared to those without MRD at D28. These findings suggest that oxidative stress and cytokines vary across the B-ALL induction phase, and lipid peroxidation is a potential marker associated with MRD status.

Keywords: B-cell Acute lymphocytic leukemia; cytokines; Oxidative stress; prognosis; minimal residual disease; hydroperoxides.

INTRODUCTION

The occurrence of pro-inflammatory events, as oxidative stress, is known as a pivotal event in physiological processes occurring during hematopoiesis [1], especially during stem cell differentiation [2]. The participation of oxidative stress has been documented in some aspects of hematological neoplasia, including leukemia [3,4]. Cancer cells are usually under higher oxidative stress than normal cells [5], which requires adaptation to counter the continuous impairment in the pro-oxidant environment. Since oxidative stress is necessary for the normal functioning of the bone marrow in hematopoiesis, this environment might exhibit altered redox balance in cancer patients and impaired hematopoiesis in certain instances.

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common malignant neoplasia among children worldwide. Notwithstanding its relatively good prognosis, a small

percentage of patients present poor clinical outcomes [6], and the underlying reasons are partly reflected through the clinical aspects of the disease. ALL chemoresistance occurs when circulating cancer cells are detected, a condition known as minimal residual disease (MRD). In this context, certain cellular and molecular factors may contribute to disease progression in both the tumor microenvironment and the systemic level. Therefore, it is essential to understand the molecular mechanisms underlying the response to the initial phases of treatment.

Bone marrow stromal cells can mediate redox adaptation in ALL by increasing its mitochondrial oxidative stress, which has been associated with drug resistance and disease recurrence [7]. Furthermore, enhanced oxidative stress has been reported as a possible cause of systemic injury during disease treatment [8,9]. ALL treatment is based on 3-step chemotherapy targeting the billion continuously proliferating cells. One-month induction eliminates approximately 99.9% of cancer cells, achieving ALL remission in more than 90% of patients, and the responsiveness to this phase of treatment will determine the long-term prognosis of ALL. To attain this goal, this phase comprises the administration of combinatorial chemotherapy comprising vincristine, L-asparaginase, anthracyclins, methotrexate, and steroids, all known to generate oxidative stress [6]. Induction alters the antioxidant capacity and malondialdehyde levels in serum of children with ALL, causing redox imbalance when comparing patients at diagnosis and those at the end of treatment [10].

Few studies have focused on the clinical relevance of oxidative stress profile, as well as its relationship with other inflammatory mediators as cytokines, especially considering the bone marrow environment. Hence, it is essential to characterize the inflammatory profile of both the systemic and bone marrow microenvironments in B-ALL patients to determine whether oxidative mediators and cytokines could help explain disease behavior during chemotherapy.

Although the recent overall survival rates for B-ALL are very high in developed countries, access to promising therapies as the CD19 CAR-T is not a reality in developing ones. Therefore, B-ALL treatment imposes a great challenge in poor countries due to the high cost of such personalized therapies, becoming cytotoxic chemotherapy the main modality of treatment. The response to chemotherapy in the induction phase is a determinant of treatment success, but the mechanisms underlying MRD are not clear in the context of inflammation.

In this context, the present study aimed to characterize the inflammatory scenario of B-ALL patients by evaluating their peripheral blood/bone marrow oxidative profiles and cytokine levels, comparing them at the start and the end of the induction phase of treatment.

Methods

Study design

This study has a longitudinal observational design and was approved by the Institutional Ethics Board (24498213.0.0000.5231). Pediatric patients diagnosed with B-ALL with ages between 0-18 years were recruited from January 2015 to January 2016, after signed consent forms. All patients were from the Institute of Cancer in Londrina, Paraná-Brazil, and were ongoing the chemotherapeutic schedules recommended by the Brazilian Childhood Leukemia Treatment Group (GBTLI, 2009). Since we aimed to compare the oxidative stress and cytokine profiles of patients through induction phase treatment, whole blood samples were obtained from patients at diagnosis (D0, no treatment) and the end of the treatment, at the twenty-eighth day (D28). Following the routine sample collection employed by the GBLTI protocol, D0 started with corticoid (prednisone), then the following drugs were introduced: vincristine, prednisone, daunorubicin and asparaginase. The drug schedule adopted was the following (Figure 1): Prednisone 60 mg/m² orally from D1 to D7, then 40 mg/m² / day orally, divided into 2-3 doses for 3 weeks (D8-29), suspending regressively in 3 to 4 days. If necessary, Prednisolone can be administered intravenously, divided into 3 doses. Vincristine: 1.5 mg / m²/ week intravenously , maximum dose of 2 mg) administered in days 8, 15, 22 and 29. Daunorubicin: 40 mg/m²/week intravenously, administered in days 8, 15 and 22. L-Asparaginase: 10,000 IU/m² intramuscular or intravenous (if thrombocytopenia <75000 / mm³) every 3 days, from day 8 of treatment, for a total of 9 doses. Cyclophosphamide: 500 mg/m² intravenously on days 22 and 23 of induction for patients in the slow response subgroup. Intrathecal medication (ITM): triple therapy with Methotrexate, Ara-C and Dexamethasone will be administered at age-adjusted doses, on days 15 and 29 of induction (> 1 <3 years: 10mg/m² and 20mg/m², for Methotrexate and Ara-C respectively; > 3 <9 years: 12 mg / m² and 24 mg/m², respectively; > 9 years: 15mg/m² and 30mg/m², respectively. The dose of Dexamethasone is uniform (2 mg/m². Max. 2 mg dose).

Medical records were assessed to obtain clinicopathological data. For risk categorization were considered as low-risk children between 1 and 9 years, white cells $< 50000/\text{mm}^3$. The others were high risk. MRD assessment was determined in PB and BM samples by flow cytometry following the Recommendations from the MRD Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation [11]. Patients were considered MRD positive when this analysis detected cells bearing leukemia-associated immunophenotypes, such as asynchronous antigen expressions or cross-lineage markers considering a multiparametric panel composed by CD20, CD45, CD38, CD10, CD66c/CD123, CD19, CD34, CD73, CD304, and CD81 antibodies.

All samples (peripheral blood and bone marrow) were centrifuged to obtain plasma (3500 x g, 5 minutes) and stored at -80°C until oxidative stress analyses. Aiming to compare the results, only plasma samples (not cells) were included.

Investigation of oxidative status

To determine the oxidative status of samples, we quantified the following parameters:

a) Sulfhydryl groups (SH): Sulfhydryl groups from proteins were evaluated by the method adapted by Taylan and Resmi (2010) [12]. SH method is based on the reaction of 5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) with sulfhydryl groups. Determination was conducted in a microplate reader, Perkin Elmer®, model EnSpire (Waltham, MA, USA) at 412nm. Results are expressed as μM of sulfhydryl.

b) Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP): TRAP was evaluated according to the method described by Repetto et al. (1996) [13] in microplate reader Victor X-3, Perkin Elmer® ([Waltham](#), MA, USA). Experimental conditions were: running time of 25 minutes, response range from 300 to 620 nm and a temperature of 30°C . This method detects hydro and/or liposoluble antioxidants present in serum. The results were expressed as μM trolox.

c) Nitric oxide metabolites (NOx): NOx levels were assessed indirectly by determining the

plasma nitrite concentration using an adaptation of the technique described by Navarro-González et al. (1998) [14]. This method is based on the reduction of the nitrate present in the sample to nitrite by oxidation-reduction reactions mediated by the system cadmium-copper reagent. Thereafter, Griess reagent was added to induce diazotization, forming a colored complex and subsequent detection at 540 nm. The quantification of NO_x was made in a microplate reader Asys Expert Plus, Biochrom[®] (Holliston, MA, USA). The nitric oxide metabolites concentration was expressed as μM nitrite.

d) Lipid hydroperoxides - chemiluminescence assay (LOOH): LOOH were determined according to an adaptation of the technique described by Gonzales-Flecha et al (1991) [15] and Panis et al. (2012) [16]. This method uses the compound tert-butyl hydroperoxide to start a lipid chain reaction that can be detected by photon emission during the formation of lipid hydroperoxides. Readings were performed in a Glomax luminometer (TD 20/20 Turner Designers, E.U.A.) over 1h at 1 readings/s. Results were expressed as relative units of light (RLU).

Cytokine measurement

Considering that TNF- α and IFN- γ are relevant pro-inflammatory cytokines in the B-ALL context, we chose to measure its levels in the collected samples. To reach this goal, we used enzyme immunoassay kits (e-Biosciences, USA) following the manufacturer's instructions, with internal controls. Results were calculated in pg/mL by fitting the data to a standard curve obtained using each human recombinant cytokine.

Statistical analysis

Comparisons were performed according to the normal distribution of data in the Shapiro-Wilk test, as well as the homogeneity by Levene's test. Differences were evaluated by comparing D0 x D28 from PB and D0 x D28 from BM by Student's T-test (parametric

data) or Mann-Whitney's test (non-parametric data). Graphs are presented as dot plots and medians. All analyses were performed in the software GraphPad Prism 7.0 (GRAPHPAD Software, San Diego, CA). A $p < 0.05$ value was considered significant.

RESULTS

Clinicopathological data of patients are shown in Table 1. Seventeen patients (52.95% male, 88.23% Caucasian; mean age, 7.8 years) were included in this study; most being categorized into the low-risk group.

Table 1 – Clinicopathological characterization of patients.

Number of patients	N=17
Mean age at diagnosis (years)	7.8±0.95
Mean BMI (kg/m²)	16.46±0.6
Ethnicity	
<i>Caucasian</i>	88.23%
<i>African</i>	11.77%
Gender	
<i>Female</i>	47.05%
<i>Male</i>	52.95%
Risk categorization	
<i>Low risk at D28</i>	N=9
<i>High risk at D28</i>	N=8

Table 2 shows the oxidative status of PB and BM at D0 and D28. For PB, none of the evaluated parameters (NO_x, SH, TRAP, and LOOH) varied significantly. For BM, a significant augment in LOOH levels was detected at the end of treatment. Specific median, minimum and maximum values are described in this Table.

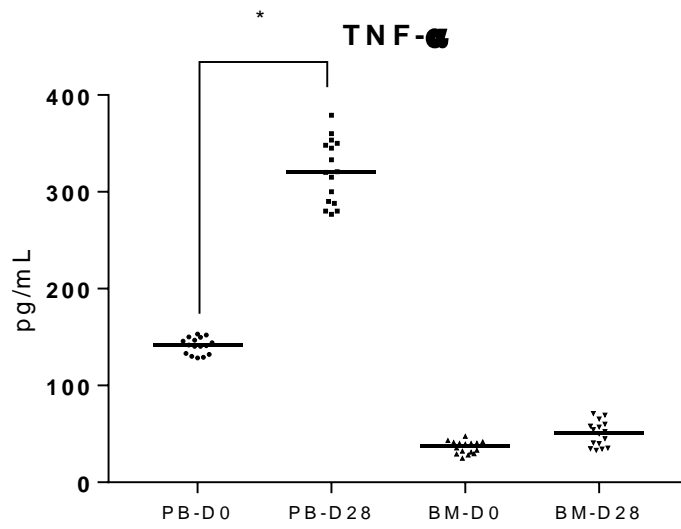
Table 2. Oxidative status of peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) plasma in patients with B-LLA at D0 and D28 during the induction phase of treatment.

PERIPHERAL BLOOD	NOx (μM)	SH (μM)	TRAP (μM)	LOOH (R.L.U)
D0	6.54 (2.50 – 16.16)	354.95 (148.81 – 436.29)	907.98 (690.24 – 1,390.30)	966 x 10³ (690 x 10 ³ – 398 x 10 ⁴)
D28	8.54 (5.19 - 24.73)	308.56 (205.32 - 403.68)	691.35 (574.56 – 1,234.0)	1740 x 10³ (799 x 10 ³ – 467 x 10 ⁴)
BONE MARROW				
D0	5.13 (3.17- 17.41)	330.75 (72.70 – 418.33)	857.17 (619.64 – 1,291.9)	243x10⁴ (948x10 ³ – 531x10 ⁴)
D28	8.03 (4.38 – 27.47)	294,06 (238.96 – 324.80)	775,16 (496.80 – 1,114.90)	2200x10^{4*} (105x10 ³ – 771x10 ⁵)

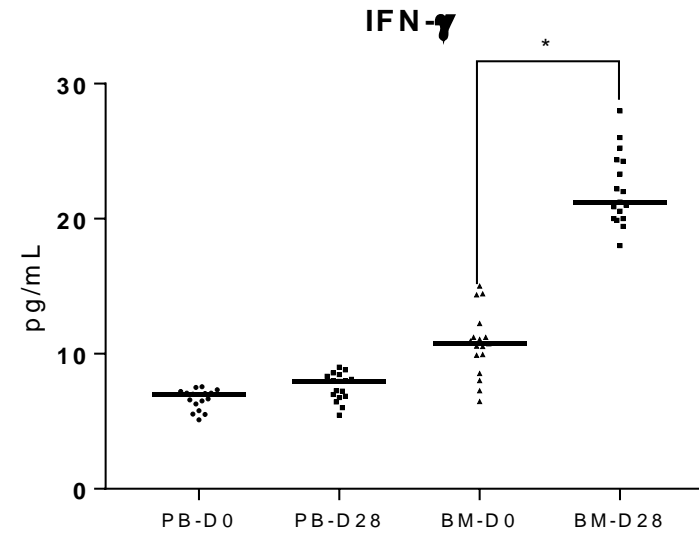
Legend: The results are presented as median (min-max). Statistics – Wilcoxon completed with Spearman test. PB = peripheral blood plasma; BM = bone marrow plasma; B-LLA = Acute lymphocytic leukemia B; D = day of treatment; NOx (nitric oxide products); SH (sulfhydryl groups); TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter); LOOH (hydroperoxides); R.L.U = relative light unities. Symbols indicates p<0.05: • D0 vs D28.

Cytokine levels for TNF-α and IFN-γ are displayed in Figure 1. TNF-α levels showed a significant augment at D28-PB about D0-PB (p = 0.0286, Figure 1A), and did not vary in the other groups (141.7±5.04 pg/mL for PB-D0, 276.6±379.1 pg/mL for PB-D28, 35.97±5.5 pg/mL for BM-D0, and 49.32±9.23 pg/mL for BM-D28). For IFN-γ, a significant augment was observed in BM-D28 when compared to BM-D0 (p = 0.0002, Figure 1B), without any change for the other groups (6.7±0.46 pg/mL for D0-PB, 7.71±0.75 pg/mL for D28-PB, 10.63±1.61 pg/mL for D0-BM and 23.72±4.2 pg/mL for 23.72±4.27 pg/mL).

A



B



80

Figure 1- Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interferon gamma (IFN- γ) levels in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) plasma at diagnosis (D0) and in the end (D28) of the induction phase chemotherapy. * indicates statistical significance ($p < 0.05$). Dots represents cytokine level for each individual.

On investigating whether the evaluated parameters affected disease outcome, we compared the presence of minimal residual disease (MRD+) or not (MRD-) at D28 in both PB and BM plasma compartments (Figure 3). Based on MRD status, patients were equally distributed (about 50% of patients for each group).

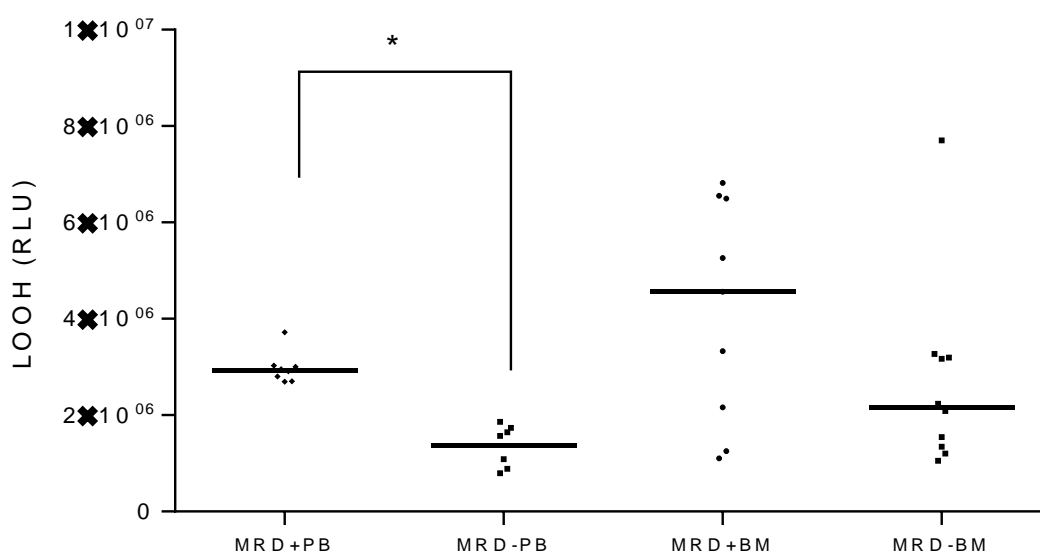


Figure 3- Comparative analysis of oxidative stress markers in peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) plasma concerning the minimal residual disease status (MRD) at D28. MRD= minimal residual disease, PB= peripheral blood, BM= bone marrow, RLU= relative light unities.+ = positive, - = negative, LOOH (hydroperoxides); R.L.U = relative light unities; * indicates $p < 0.05$. Dots represents LOOH level for each individual.

From all parameters analyzed, only LOOH was significantly altered regarding MRD status, showing augmented in the PB of MRD+ patients at D28 ($p = 0.0006$), concerning DRM - group (min-max intervals: 2694258- 3724906 RLU for MRD+PB, 1104889- 6824291 RLU for MRD+ BM, 799447- 1861685 RLU for MRD – PB, and 1052169 – 7708277 RLU for MRD – BM). NO_x, SH, TRAP, and cytokines did not vary statistically according to MRD status (data not shown).

DISCUSSION

The present study establishes a comparative landscape between the analysis of plasma samples from two different sources, representing systemic (PB) versus local tumor (BM) microenvironments in B-ALL patients at the light of inflammatory mediators. To reach this goal, we analyzed the levels of proinflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ) and oxidative stress parameters (NO_x, anti, and pro-oxidants) in both compartments, at the start (D0) and the end (D28) of induction chemotherapy. Our findings indicate that cytokines and oxidative

stress mediators are differentially produced by both compartments, depending on the moment of the chemotherapy challenge. Further, these findings indicated a relevant meaning for lipid peroxides (LOOH) in the context of the minimal residual disease, which is the main challenge to solve in B-ALL management. Therefore, to the best of our knowledge, this information is a novelty.

Cytokine production and oxidative stress generation are intrinsically linked processes, which can regulate each other levels. Oxidative stress is the result of the imbalance generated by the pro-oxidants (as LOOH and NO_x) and antioxidants (as SH and TRAP) reactions. It is well known that normal hematopoiesis depends on low oxidative stress levels [2] and is negatively affected by an increase in reactive oxygen species (ROS) levels, thereby leading to defective cell proliferation and possibly tumorigenesis [2,17]. ROS production is a crucial phenomenon that can directly affect cellular components like lipids, proteins, and DNA. Therefore, characterization of the oxidative status from both systemic (PB) and tumor microenvironment (BM) in B-ALL may help to understand the dynamics of oxidative stress mediators and their behavior concerning chemotherapy-induced changes and disease behavior.

In this context, analysis of PB samples based on oxidative stress parameters revealed a significant increase in LOOH levels on D28 of the induction phase of treatment. In this phase, an intensive bone marrow hypocellularity and consequently, systemic pancytopenia, reflecting a common side effect of non-target-specific chemotherapeutic drugs [18]. This phase mainly comprises the sequential use of corticosteroids, methotrexate, vincristine, doxorubicin, and L-asparaginase. The latter 4 drugs are known to generate oxidative stress and are used in high doses to rapidly eradicate tumor cells [19,20]. Corticosteroids play a crucial role in potentially promoting tumor cell apoptotic gene expression [21]. ALL response to prednisone only (exclusively used from D0 to D8) is an important prognostic factor and is defined by a positive blast count on D8 [22].

LOOH was augmented in PB on D28 concerning the diagnosis. Peripheral changes may reflect systemic catabolism and/or stress. LOOH are intermediate metabolites generated by lipid peroxidation in redox reactions, persisting from oxidative cellular damage to apoptosis induction. In leukemia, systemic LOOH has been reported as either normal [25] or augmented [26] during treatment. The present data indicate that LOOH increased in PB during treatment, probably reflecting the cumulative free radicals generated by ALL-related chemotherapy, since most of the drugs used here are known pro-oxidants [27,28]. This observation is following a previous finding [29], wherein oxidative stress was higher at the

end of the induction phase of treatment in acute leukemia patients regarding their diagnostic status.

A comparative analysis of PB and BM revealed that LOOH status is completely different at diagnosis, suggesting an oxidative lipid-rich environment in BM. The intensity of the induction phase of treatment is crucial for reducing the number of tumor cells; however, it also affects normal blood precursors present in the BM niche [30]. On further analysis of total lipid content from all BM samples, no difference was detected among groups during treatment (data not shown), despite the potential replacement of cellular lipids in BM cells during treatment. These data suggest that lipid peroxidation in B-ALL is possibly dependent on both lipoproteins in PB and cell membrane in BM.

Regarding the hematopoietic cytokine environment observed in B-ALL biology, it is known that some of them are significantly modified by induction chemotherapy, especially IFN- γ and TNF- α [34]. We found increased levels of IFN- γ in the BM and augmented TNF- α in the PB at the end of induction treatment (D28 vs D0). This finding indicates that the cytokine dynamics between both compartments change distinctly in response to induction chemotherapy. At D0, the predominant cell phenotype is malign, which is progressively replaced by healthy cells as treatment advances. It seems that corticotherapy is responsible for TNF- α reduction and INF- γ increase in ALL, and these changes are reported as accompanied by neutrophil count increase and augmented G-CSF and GM-CSF [35]. It may be associated with the recovery of the normal bone marrow observed at the end of the induction phase. Further, TNF- is a pro-inflammatory cytokine that regulates oxidative stress production, as observed by the high LOOH in PB detected in our patients.

Concerning the clinical impact of our findings, it was observed that MRD+ patients at the end of the treatment presented significant changes in LOOH levels. On D28, MDR+ patients presented higher LOOH levels in PB and no significant fluctuations in BM. These findings suggest that positive MRD status, i.e., the presence of residual treatment-resistant tumor cells at the end of the treatment may be required for the production of lipoperoxides observed in this study. MRD occurs significantly in some cases of ALL [31] and its assessment is primordial to classify the risk of patient relapse at this stage [32]. An in vitro study [33] identified that oxidative stress generation in mitochondria is linearly correlated with chemotherapeutic resistance in acute lymphoblastic leukemia, which allows for redox adaptation and an increase in MRD in patients. This information reinforces our finding regarding LOOH in MRD+ patients since lipid peroxidation metabolites can contribute substantially to promote and sustain oxidative stress. As far as we know, this is the first time

that oxidative stress products are pointed as putative markers associated with MRD in the B-ALL context.

Our study has limitations. First, the sample size was limited, since the study was initiated at the diagnosis stage and the same patients were followed up through the induction phase of treatment. Second, there was a lack of healthy controls to evaluate changes in both PB and BM parameters. Further studies with larger sample sizes and appropriately matched healthy controls are demanded.

CONCLUSIONS

Our data indicate that distinct inflammatory mediators are produced in response to induction chemotherapy from diagnosis to the end of treatment and showed LOOH as a potential marker with clinical meaning in children with MRD. Such findings could have clinical implications in the future, suggesting that the measurement of lipid peroxides at diagnosis and the end of the induction phase could help clinicians predict patients who will not respond to ALL-B treatment and present MRD.

REFERENCES:

- [1] Gaman AM, Buga A-M, Gaman M-A, Popa-Wagner A. The role of oxidative stress and the effects of antioxidants on the incidence of infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2014:158135. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4212632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [2] Hole PS, Darley RL, Tonks A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? *Blood* 2011; 117: 5816–26.
- [3] Er T-K, Tsai S-M, Wu S-H, Chiang W, Lin H-C, Lin S-F, et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. *Clin Biochem* 2007; 40: 1015–9.
- [4] 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.
- [5] Cramer SL, Saha A, Liu J, Tadi S, Tiziani S, Yan W, et al. Systemic depletion of L-cyst(e)ine with cyst(e)inase increases reactive oxygen species and suppresses tumor growth. *Nat Med.* 2017; 23: 120 - 127. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27869804>
- [6] Hockenberry MJ, Taylor OA, Gundy PM, Ross AK, Pasvogel A, Montgomery D, et al. F2-isoprostanes: a measure of oxidative stress in children receiving treatment for leukemia. *Biol Res Nurs.* 2014; 16: 303 – 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23956352>
- [7] Liu J, Masurekar A, Johnson S, Chakraborty S, Griffiths J, Smith D, et al. Stromal cell-mediated mitochondrial redox adaptation regulates drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget.* 2015; 6: 43048 -68. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26474278>
- [8] Ki Moore IM, Gundy P, Pasvogel A, Montgomery DW, Taylor OA, Koerner KM, et al. Increase in oxidative stress as measured by cerebrospinal fluid lipid peroxidation during treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2015; 37: 86 – 93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25222054>
- [9] Cole PD, Finkelstein Y, Stevenson KE, Blonquist TM, Vijayanathan V, Silverman LB, et al. Polymorphisms in Genes Related to Oxidative Stress Are Associated With Inferior Cognitive Function After Therapy for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J clin Oncol.* 2015; 33: 2205 – 11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25987702>
- [10] Al-Tonbary Y, Al-Hasan SA, Zaki M, Hammad A, Kandil S, Fouda A. Impact of anti-

- oxidant status and apoptosis on the induction phase of chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology* [Internet].2011; 16: 14–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269562>
- [11] Ikoma-Colturato MRV, Beltrame MP, Furtado FM, et al. Minimal residual disease assessment in acute lymphoblastic leukemia by 4-color flow cytometry: Recommendations from the MRD Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 2020; S2531-1379(20)31289-X.
- [12] Taylan E, Resmi H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulfhydryl Measurement in Biological Samples. *Turk. J. Biochem.* 2010; 35: 275-278.
- [13] Repetto M, Reides C, Carretero MLG, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clin. Chim. Acta.* 1996; 255: 107-117.
- [14] Navarro-gonzález JA, García-benayas C, Arenas J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.* 1998; 44: 679-681.
- [15] Flecha BG, Ilesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. *Free Radical Biology and Medicine.* 1991; 10: 93-100.
- [16] Panis C, Herrera ACSA, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 33: 89-97.
- [17] De Cavanagh EM V, Honegger AE, Hofer E, Bordenave RH, Bullorsky EO, Chasseing NA, et al. Higher oxidation and lower antioxidant levels in peripheral blood plasma and bone marrow plasma from advanced cancer patients. *Cancer.* 2002; 94:

- 3247–51.
- [18] Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 2013; 18: 1349–83. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- [19] Babiak RMV, Campello AP, Garnieri EGS, Oliveira MBM. Metotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell biochem funct.* 1998; 16: 283 – 93.
- [20] Vagace JM, Gervasini G. Chemotherapy Toxicity in Patients with Acute Leukemia. *Acute Leuk - Sci Perspect Chall.* 2011; 391–414.
- [21] Tissing WJE, Boer ML Den, Meijerink JPP, Menezes RX, Swagemakers S, Spek PJ Van Der, et al. Genomewide identification of prednisolone-responsive genes in acute lymphoblastic leukemia cells. *Gene.* 2007; 109: 3929–35.
- [22] Meissner B, Stanulla M, Ludwig W-D, Harbott J, Möricke a, Welte K, et al. The GSTT1 deletion polymorphism is associated with initial response to glucocorticoids in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2004; 18: 1920–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15457183>
- [23] Tapia-Limonchi R, Cahuana GM, Caballano-Infantes E, Salguero-Aranda C, Beltran-Povea A, Hitos AB, et al. Nitric Oxide Prevents Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation Through Regulation of Gene Expression, Cell Signaling, and Control of Cell Proliferation. *J Cell Biochem.* 2016; 2078–88.
- [24] Saul G, Matthias M, Rose H, Pradel I. Excretion patterns of alkylating metabolites in urine following cyclophosphamide treatment of tumor patients: Influence of application route, dosage, liver and kidney function. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1979; 94: 277–86.

- [25] Devi GS, Prasad MH, Saraswathi I, Raghu D, Rao DN, Reddy PP. Free radicals antioxidant enzymes and lipid peroxidation in different types of leukemias. *Clin Chim Acta*. 2000; 293: 53–62.
- [26] Battisti V, Maders LDK, Bagatini MD, Santos KF, Spanevello RM, Maldonado P a., et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Biochem*. 2008; 41: 511–8.
- [27] Sentürker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Hamza Müslümanoğlu, Gedikoglu G, et al. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett*. 1997; 416: 286–90.
- [28] Sarmiento-Ribeiro AB, Proença MT, Sousa I, Pereira A, Guedes F, Teixeira A, et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leuk Res*. 2012; 36: 1041–8.
- [29] Naz A, Shamsi TS, Sattar A, Mahboob T. Oxidative stress and total antioxidant status in acute leukemia at diagnosis and post remission induction phase. *Pak J Pharm Sci*. 2013; 26: 1123–30.
- [30] El-Sabagh ME, Ramadan KS, El-slam IMA, Ibrahim AM. Antioxidants Status in Acute Lymphoblastic Leukemic Patients. *Am J Med Med Sci* [Internet]. 2011; 1: 1–6. Available from: <http://article.sapub.org/10.5923.j.ajmms.20110101.01.html>.
- [31] Ozcicek A, Cetin N, Keskin Cimen F, Tumkaya L, Malkoc I, Gulaboglu M, et al. The Impact of Resveratrol on Oxidative Stress Induced by Methotrexate in Rat Ileum Tissue: Evaluation of Biochemical and Histopathological Features and Analysis of Gene Expression. *Med Princ Pract*. 2016; 25: 181 – 6.
- [32] Li N, Lu X, Zhao X, Xiang F-L, Xenocostas A, Karmazyn M, et al. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells*. 2009;

- 27: 961–70.
- [33] Reddy MM, Fernandes MS, Salgia R, Levine RL, Griffin JD, Sattler M. NADPH Oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. *Leukemia*. 2011; 25: 281 – 289.
- [34] Broto GE, Corrêa S, Trigo FC, Santos EC, Tomiotto-Pelissier F, Pavanelli WR, Silveira GF, Abdelhay E, Panis C. Comparative Analysis of Systemic and Tumor Microenvironment Proteomes From Children With B-Cell Acute Lymphocytic Leukemia at Diagnosis and After Induction Treatment. *Front Oncol*. 2020; doi: 10.3389/fonc.2020.550213. eCollection 2020.
- [35] Tuncer AM, Hiçsönmez G, Gümruk F, Sayli T, Güler E, Cetin M, Okur H. Serum TNF-alpha, gamma-INF, G-CSF and GM-CSF levels in neutropenic children with acute leukemia treated with short-course, high-dose methylprednisolone. *Leuk Res*. 1996; 20(3):265-9. doi: 10.1016/0145-2126(95)00140-9.

7 CONCLUSÃO

De fato a LLA-B é a neoplasia mais frequente na infância e é decorrente de múltiplos fatores, como alterações genéticas e a exposição aos desencadeadores citados. A quimioterapia citotóxica continua sendo a principal alternativa de tratamento e, embora tenha bons resultados, uma parcela de pacientes não consegue a remissão completa da doença com a negatividade da DRM e ainda se torna resistente ao tratamento. As pesquisas em relação à LLA-B são muito escassas na literatura, sendo assim acreditamos que todo resultado é muito significativo.

A proteômica, desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa revelou que o sangue periférico no D0 é pró-inflamatório e tem diminuídas as proteínas de coagulação. Outro achado importante foi a alteração da transtiretina e IFN- γ , proteínas ainda não descritas na literatura para LLA-B, sendo a primeira aumentada e a outra diminuída. Com esses dados pode-se concluir e destacar o papel dessas proteínas na resolução da doença.

Adicionado a isso, verificamos que os hidroperóxidos e TNF $-\alpha$ estavam aumentados no D28 no sangue periférico. IFN $-\gamma$ aumentado também no D8, porém na medula óssea. Nos pacientes com DRM positiva os hidroperóxidos estavam aumentados quando comparados aos pacientes sem DRM no D28. Poucos estudos focam em entender de fato o que acontece no ambiente medular, sendo de grande significância esses achados, uma vez que a doença tem início na medula óssea. Além disso, esses achados sugerem que as citocinas e o estresse oxidativo variam durante a fase de indução e que a peroxidação lipídica é um potencial marcador associado com a DRM.

Os dados clínicos laboratoriais nos permitiu correlacionar com os desfechos obtidos caso a caso, sendo a presença da DRM um indicativo de má resposta e é um parâmetro avaliado no percurso do tratamento.

Mais estudos precisam ser desenvolvidos com o intuito de entender o real impacto da quimioterapia no organismo dos pacientes. Todos esses achados podem contribuir e abrir novos caminhos para esclarecer a quimiorresistência e a persistência da DRM em alguns pacientes.

REFERÊNCIAS

- A DE LAURENTIIS, J.; HISCOTT; ALCALAY, M. The TEL-AML1 fusion protein of acute lymphoblastic leukemia modulates IRF3 activity during early B-cell differentiation. **Oncogene**. V. 34, p. 6018–6028, 2015. doi:10.1038/onc.2015.50
- AHN, H.S. et al. Serum biomarker panels for the diagnosis of gastric adenocarcinoma. **Br J Cancer**. V.106, p. 733 e739, 2012.
- AHMED, M. KABEL. Relationship between Cancer and Cytokines. **Journal of Cancer Research and Treatment**. v. 2, n. 2, p. 41-43, 2014 doi: 10.12691/jcrt-2-2-3.
- AKIN-BALI, D.F. et al. Identification of novel Nrf2/Keap1 pathway mutations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Pediatr Hematol Oncol**. V. 37, n.1, p.58-75, Feb, 2020.
- ANDO, Y.; NAKAMURA, M.; ARAKI, S. Transthyretin-related familial amyloidotic polyneuropathy. **Arch. Neurol**. 62, 1057–1062, 2005.
- ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. V.127, n. 20, p.2391-405, 2016.
- ASLAM et al. Proteomics: Technologies and Their Applications. **Journal of Chromatographic Science**. V. 55, N. 2, 182–196, 2017. doi: 10.1093/chromsci/bmw167
- BAO, E.L.; CHENG, A.N.; SANKARAN, V.G. The genetics of human hematopoiesis and its disruption in disease. **EMBO Molecular Medicine**, july, 2019. DOI 10.15252/emmm.201910316.
- BARGOU, R.C. et al. High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4340–4347, 1996.
- BATTISTI, V. et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 511–518, 2008.
- BELSON et al., Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review . **Environmental Health Perspectives**. V.115, N. 1, Jan., 2007.
- BENTO, R. M. A.; DAMASCENO, L. M. P.; AQUINO NETO, F. R. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Rev Bras Med Esporte**, v. 9, n. 3, mai/jun, 2003.
- BIONDI, A. et al. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. **Blood**, v.96, p. 24–33, 2000.
- BOTELHO, M. C. M. et al. Childhood leukemia and its socioeconomic level relationship: a comparison between the epidemiological profile of Norte de Minas and

other brazilian regions. **Revista Unimontes Científica**, Agosto, 2017.

BRUNETO, R.V. et al. Anticorpos monoclonais no tratamento oncológico: revisão de literatura para o atendimento ao paciente e manejo das reações infusionais. **Arch. Health. Sci.** V. 26, n. 3, p. 173-178, out, 2019.

BURT, R. et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress. **Blood.** V. 24, n. 134, p. 1415-1429, Oct, 2019.

CAREW, J.S. et al. Mitochondrial DNA mutations in primary leucemia cells after chemotherapy: clinical significance and therapeutic implications. **Leukemia**, v. 17, p. 1437–1447, 2003.

CASTELLS, M. et al. Implication of Tumor microenvironment in Chemoresistance: Tumor-Associated Stromal Cells Protect Tumor Cells from Cell Death. **Int. J. Mol. Sci.**, v.13, p. 9545-9571, 2012. doi:10.3390/ijms13089545

CAZÉ, M.O.; BUENO, D.; SANTOS, M.E.F.S. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Rev HCPA.** N. 30, v.1, p.5-12, 2010.

CHIARETTI, S.; ZINI, G.; BASSAN, R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mediterr J Hematol Infect Dis.**, v.6, n. 1, 2014. Disponível em: <http://www.mjhid.org/article/view/2014.073>.

COX, J., MANN, M.; Is proteomics the new genomics? **Cell.** V. 130, n. 3, p. 395–398, 2007.

DEMIR, S. et al. Therapeutic targeting of mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica.** V. 105, n.1, p. 170-181, Jan, 2020.

DEVAKONDA, A. et al. Transthyretin as a marker to predict outcome in critically ill patients. **Clin Biochem.** 41, p. 1126 e1130, 2008.

DIGIUSEPPE, A; WOOD, B.L. Applications of flow cytometric immunophenotyping in the diagnosis and posttreatment monitoring of B and T lymphoblastic leucemia/ lymphoma. **Clinical cytometry.** V. 96, ed.4. p. 256 – 265. June, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21833>

DUTRA, R. A. et al., A importancia do hemograma no diagnóstico precoce da leucemia. **REAS/EJCH.** V.12, n.7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e3529.2020>

DYER, M.J. et al. Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? **Blood.** v. 115, p. 1490-9, 2010.

ER, T.-K. et al. Antioxidant status and superoxide anion radical generation in acute myeloid leukemia. **Clinical biochemistry**, v. 40, p. 1015–1019, 2007.

ESFAHANI, A. et al. Prealbumin/CRP based prognostic score, a new tool for predicting metastasis in patients with inoperable gastric cancer. **Gastroenterol Res Pract.**, 2016.

FATIMA, I. et al. CD5 molecule-like and transthyretin as putative biomarkers of chronic myeloid leukemia - an insight from the proteomic analysis of human plasma. **Nature.**, 2017. DOI: 10.1038/srep40943

FAYAD L, et al. Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. **Blood.** V. 97, p. 256–263, 2001.

FELDING P, FEX G. Cellular origin of prealbumin in the rat. **Biochim Biophys Acta.** V. 716, p. 446–9, 1982.

FELICIANO, S.V.; SANTOS, M.O.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. Incidência e Mortalidade por Câncer entre Crianças e Adolescentes: uma Revisão Narrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 64, n. 3, p. 389-396, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.32635/2176-9745>.

FERREIRA, J.D. et al. Exposições ambientais e leucemias na infância no Brasil: uma análise exploratória de sua associação. **R. Bras. Est. Pop.** V. 29, n.2, p.477-492, 2012.

FIDANZA, M. et al. IFN- γ directly inhibits murine B-cell precursor leukemia-initiating cell proliferation early in life. **Eur. J. Immunol.**, v.47, p. 892-899, 2017.

FLECHA, B.G.; ILESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, Liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v.10, p. 93-100, 1991.

FIDYT, K. et al. Targeting the thioredoxin system as a novel strategy against B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Mol Oncol.** V.13, n.5, p.1180-1195, May., 2019. doi: 10.1002/1878-0261.12476.

GBTLLA-2009, Grupo brasileiro de tratamento da Leucemia da infância, Instituto Boldrini, Campinas-SP.

GILHAM C. et al. Day care in infancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: findings from UK case-control study. **BMJ.** V. 330, n. 7503, p.1294, 2005. DOI:10.1136/bmj.38428.521042.8F

GRAUX, C. Biology of acute lymphoblastic leucemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. **Transfusion and apheresis Science.** V. 44, p. 183-189, 2011.

Greaves M. Childhood leukaemia. **BMJ.** V. 324, n. 7332, p. 283-7, 2002. DOI:10.1136/bmj.324.7332.283

GROARKE, E.M.; YOUNG, N. Aging and Hematopoiesis. **Clin Geriatr Med**, n. 35, p. 285–293, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.03.001>

GUZMÁN-ORTIZ, A.L. et al. Proteomic changes in a childhood acute lymphoblastic leukemia cell line during the adaptation to vincristine. **Bol Med Hosp Infant Mex.**, v.74, n.3, p.181---192, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmhix.2017.03.005>

HAMERSCHLAK, N. Leukemia: genetics and prognostic factors. **Jornal de pediatria**, v. 84, p. S52–S57, 2008.

HANAHAN, D. WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. N. 144, v.5, p. 646-74, març., 2011.

HOOKE, M.C. et al. The Longitudinal Parallel Process Analysis of Biomarkers of Oxidative Stress, Symptom Clusters, and Cognitive Function in Children With Leukemia. **J Pediatr Oncol Nurs**. V. 37, n.4, p. 244-254, Jul., 2020.

HU, M.L. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. In: Abelson JN, Simon MI (eds) *Methods in Enzymology*. California: **Academic Press**. p. 380-82, 1994.

HUSSAIN, S.P.; HOFSETH, L.J.; HARRIS, C.C. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer**. V. 3, p. 276–285, 2003.

INCA – condutas do INCA. Leucemias agudas na infância e adolescência. **Revista Brasileira de Cancerologia**. V. 47, n.3, p. 245-57, 2001.

IRWIN, M.E.; RIVERA-DEL VALLE N.; CHANDRA, J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxid Redox Signal** [Internet]. V. 18, n. 11, p. 1349–83, 2013. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3584825&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

JEYAKUMAR, D.; O'BRIEN, S. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. Disponível em: jamaoncology.com. acesso em 13/06/2021.

JIN, F. et al. The anti-tumor role of NK cells *in vivo* pre-activated and re-stimulated by interleukins in acute lymphoblastic leucemia. **Oncotarget**, Vol. 7, n. 48, 2016.

JOHNSTON, W.T. et al. Childhood cancer: Estimating regional and global incidence. **Cancer Epidemiology**, disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2019.101662>.

JORGENSON, T.C.; ZHONG, W.; OBERLEY, T.D. Redox Imbalance and Biochemical Changes in Cancer. **Cancer Res**, v. 73, n. 20, October, 2013. doi: 10.1158/0008-5472.

- KAWAI, H. OTA, H. Low perioperative serum prealbumin predicts early recurrence after curative pulmonary resection for nonsmall-cell lung cancer. **World J Surg.** V. 36, p. 2853 e 2857, 2012.
- KELLY, P. et al. Pre-treatment plasma proteomic markers associated with survival in oesophageal cancer. **Br J Cancer.** 106, p. 955 e 961, 2012.
- KRAWCZYK, J. et al. The Role of Inflammation in Leukaemia. In: B. B. Aggarwal et al. (eds.), *Inflammation and Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology* 816, DOI: 10.1007/978-3-0348-0837-8_13, © Springer Basel 2014.
- KRUSE, A. et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Int. J. Mol. Sci.**, v.21, p.1054, 2020.
- LIU, J. et al. Stromal cell-mediated mitochondrial redox adaptation regulates drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Oncotarget.** V. 6, n.40, p. 43048-64, Dec., 2015.
- LUSKIN, M.R. et al. Targeting minimal residual disease: a path to cure? **Nat Rev Cancer.** V.18, n.4, p. 255-263, April, 2018. doi:10.1038/nrc.2017.125.
- MAHONEY, M.C. et al., The Chenorbyl childhood leukemia study: background & lessons learned. **Environ health.** V. 3, n. 1, p. 12, 2004.
- MARRERO, Y. T et al. Leucemia linfocítica crónica de células B: revisión de sus aspectos etiopatogénicos, moleculares y pronósticos. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.** V. 35, n. 1, p. 927, 2019.
- MARTINS, S. et al. Factors Associated with the Detection of Childhood and Adolescent Cancer in Primary Health Care: A Prospective Cross-Sectional Study. **Journal of Multidisciplinary Healthcare,** v. 13, 2020.
- MATUTES, E. et al. Mixed-phenotype acute leukemia: clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. **Blood,** v. 117, p.3163-171, 2011.
- MEADS, M.B.; GATENBY, R.A.; DALTON, W.S. Environment-mediated drug resistance: A major contributor to minimal residual disease. **Nat. Rev. Cancer.** V. 9, p. 665–674, 2009.
- MILLER O. **Laboratório para o clínico.** 8th ed. São Paulo: Editora Atheneu; 1999.
- Ministério da Saúde (BR). Instituto Nacional de Câncer José Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2021.
- MULLER U, et al. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. **Science.** V. 264, p. 1918–1921, 1994.
- MURRE, C. Intertwining proteins in thymocyte development and cancer. **Nat Immunol,** v. 1, p 97-8, 2000.

NC-IUB. NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY. Enzyme nomenclature. Recommendations 1978. Supplement 2: Corrections and additions. **Eur J Biochem**. V. 116, n. 423–35, 1981..

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J.A., GARCÍA-BENAYAS, C., ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clin. Chem**. V.44, p.679-681, 1998.

OLIVEIRA, M.M. et al. Children and adolescents cancer incidence, mortality and survival a population-based study in Midwest of Brazil. **Cancer epidemiology**, v. 68, 2020.

PANIS, C. et al. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**. V.33, p.89-97, 2012.

PANTEL, K.; ALIX-PANABIÈRES, C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. Disponivel em: <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>

PENG, B. et al. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. **Cell Death and Disease**, v. 11, n. 79, 2020.

PÉREZ-FIGUEROA, E. et al. Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. **Oncol Rep**. v.35, n.5, p.2699-706, may., 2016. doi: 10.3892/or.2016.4657.

PLANTÉ-BORDENEUVE, V. & SAID, G. Familial amyloid polyneuropathy. **Lancet Neurol**. 10, 1086–1097, 2011.

PLANTE-BORDENEUVE, V. Update in the diagnosis and management of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. **J. Neurol**. 261, 1227–1233, 2014.

POYTON, R.O.; BALL, K.A.; CASTELLO, P.R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol Metab**. V.20, p. 332–340, 2009. [PubMed: 19733481].

PROBST, L. et al. Lipoygenase inhibitors protect acute lymphoblastic leukemia cells from ferroptotic cell death. **Biochem Pharmacol**. V. 15, n. 140, p. 41-52, Sep., 2017. doi: 10.1016/j.bcp.2017.06.112.

PUI, C.H.; ROBISON, L.L. A Thomas Look. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, v. 371, p. 1030-43, 2008.

RAMBOD, M. et al. Association of serum prealbumin and its changes over time with clinical outcomes and survival in patients receiving hemodialysis. **Am J Clin Nutr**. 88, p. 1485 e1494, 2008.

REPETTO, M. et al. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. **Clin. Chim. Acta**. V. 255, p.107-117, 1996.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

ROUCE, R.H. et al. The TGF- β /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia**, v. 30, n. 4, p. 800-811, april, 2016.

SAMIMI, A. et al. Oxidative stress in normal hematopoietic stem cells and leukemia. **APMIS**, v.126, p. 126: 284–294, 2018.

SANCHEZ-CORREA, B. et al. 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, p. 885-891, 2013.

SARMENTO-RIBEIRO. et al. A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. **Leuk Res**. V. 36, p.1041–8, 2012.

SHENG, X. et al. Adipocytes cause leukemia cell resistance to daunorubicin via oxidative stress response. **Oncotarget**. V. 8, n. 7, p. 73147-73159, Nov., 2016.

SHIMURA, T. et al. Serum transthyretin level is associated with prognosis of patients with gastric câncer. **Journal of surgical research**. 227, p. 145 a 150, 2018.
doi.org/10.1016/j.jss.2018.02.035

SMITH FR, GOODMAN DS. The effects of diseases of the liver, thyroid, and kidneys on the transport of vitamin A in human plasma. **J Clin Invest**. V. 50, p. 2426–36, 1971.

SMITH, O.P.; HIM. Clinical features and treatment of lymphoblastic leukemia. In: Arceci RJ HISO. **Pediatric Hematology**. P. 450-481. Massachusetts, 2006.

SOSSELA FR, et al. Leucemia Mieloide Crônica: aspectos clínicos, diagnóstico e principais alterações observadas no hemograma. **Rev.Bras. Análises Clínicas**. V. 49, n. 2, p. 127, 2017.

SWERDLOW, S.H. et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, v. 127, n. 20, MAY 2016.

TAMASSIA N, et al. IFN-beta expression is directly activated in human neutrophils transfected with plasmid DNA and is further increased via TLR-4-mediated signaling. **J Immunol**. V. 189, p 1500–1509, 2012.

TAYLAN, E.; RESMI, H. The Analytical Performance of a Microplate Method for Total Sulfhydryl Measurement in Biological Samples. **Turk. J. Biochem**. V.35, n. 3, p. 275-278, 2010.

TUDEK, B. et al. Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes. **Free Radic Biol Med**. V.107, p.77-89, Jun., 2017.

URAO, N.; USHIO-FUKAI, M. Redox Regulation of Stem/Progenitor Cells and Bone Marrow Niche. **Free Radic Biol Med** [Internet]. V. 54, p.26–39, 2014. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3637653/pdf/nihms-415447.pdf>

[VARDMAN et al.](#), The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, 30 July. V. 114, N. 5, [2009](#).

VIEIRA, M., SARAIVA, M.J. Transthyretin: a multifaceted protein. **Bio Mol. Concepts**. N.5, v.1, p. 45-54, 2014. DOI 10.1515/bmc-2013-0038

YEE, A.W. A molecular mechanism for transthyretin amyloidogenesis. **Nature Communication**. V. 10, n. 925, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08609-z>

VISCONTI, R.; GRIECO, D. New insights on oxidative stress in cancer. **Curr Opin Drug Discov Devel**. V. 12, p. 240–245, 2009.

VIVARELLI, S. et al. Nitric Oxide in hematological Cancers: Partner or Rival? **Antioxidants and Redox Signaling**. DOI: 10.1089/ars.2019.7958.

W.-L. TIAN, et al., IRF3 is involved in human acute myeloid leukemia through regulating the expression of miR- 155, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.08.080>.

WU, S. et al. Cytokine/Cytokine Receptor Gene Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **CANCER**. V. 103, n. 5, 2005.

YANG, X.; WONG, M.P.; NG, R.K. Aberrant DNA Methylation in Acute Myeloid Leukemia and Its Clinical Implications. **Int. J. Mol. Sci**. V. 20, p. 4576, 2019.

YSEBRANT DE LENDONCK L, MARTINET V, GORIELY S. Interferon regulatory factor 3 in adaptive immune responses. **Cell Mol Life Sci**. V. 71, p. 3873–3883, 2014.

ZAHRA, K.F. et al. The Involvement of the Oxidative Stress Status in Cancer Pathology: A Double View on the Role of the Antioxidants. **Oxid Med Cell Longev**. Aug, 2021.

ZHANG Z-X. et al. IRF-3 gene polymorphisms are associated with the susceptibility to and the survival in chronic lymphocytic leukemia and could also serve as an auxiliary index. **Leukemia & Lymphoma**, 2016. DOI: 10.1080/10428194.2016.1193858

ZHAO, H et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduct Target Ther**. V. 6, n. 1, p. 263, 2021. doi: 10.1038/s41392-021-00658-5.

ZHOU, F. et al. The changes of oxidative stress and human 8-hydroxyguanine glycosylase1 gene expression in depressive patients with acute leukemia. **Leukemia**

Research, v. 31, p. 387–393, 2007.

ZHOU, J. et al. Role of prealbumin as a powerful and simple index for predicting postoperative complications after gastric cancer surgery. **Ann Surg Oncol**. 24, p. 510 e 517, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Aprovação 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



