



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**



PPGIBA

**MICROVESÍCULAS CIRCULANTES DERIVADAS DE CÉLULAS
T REGULATÓRIAS E SUA INFLUÊNCIA NA IMUNOSSUPRESSÃO CELULAR EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS B SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

FLAVIO SOUZA DA SILVA

MANAUS - AM

2024

FLAVIO SOUZA DA SILVA

**MICROVESÍCULAS CIRCULANTES DERIVADAS DE CÉLULAS
T REGULATÓRIAS E SUA INFLUÊNCIA NA IMUNOSSUPRESSÃO CELULAR EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS B SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

Orientador: Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA

Coorientadoras: Dra. ADRIANA MALHEIRO ALLE MARIE

Dra. ANDRÉA TEIXEIRA DE CARVALHO

MANAUS - AM

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586m Silva, Flavio Souza da
Microvesículas circulantes derivadas de células T regulatórias e sua influência na imunossupressão celular em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos a quimioterapia de remissão / Flavio Souza da Silva . 2024
121 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa
Coorientadora: Adriana Malheiro Alle Marie
Coorientadora: Andréa Teixeira de Carvalho
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Leucemia infantil. 2. Linfócitos Tregs. 3. Vesículas extracelulares. 4. Mediadores imunossupressores. 5. Imunossupressão celular. I. Costa, Allyson Guimarães da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FLAVIO SOUZA DA SILVA

**MICROVESÍCULAS CIRCULANTES DERIVADAS DE CÉLULAS
T REGULATÓRIAS E SUA INFLUÊNCIA NA IMUNOSSUPRESSÃO CELULAR EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE
CÉLULAS B SUBMETIDOS A QUIMIOTERAPIA DE REMISSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

APROVADO EM: 05/02/2024

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa, Presidente
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Prof^a. Dra. Aya Sadahiro, Membro Titular Interno do Programa
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Leticia Gomes de Pontes, Membro Titular Externo ao Programa
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

*A **Deus**, por todas as suas direções em minha vida.*

*A minha avó **Raimunda Rocha (in memorian)**, pelo apoio e amor incondicional.*

*A minha mãe **Carolina Pereira de Souza (in memorian)**, Por toda sua dedicação, ensinamentos, amizade, incentivos, companheirismo, conselhos, amor, força e apoio para comigo e meus irmãos em nosso crescimento de vida. Obrigado Deus por ter me dado uma mãe tão maravilhosa. Te amo, saudades eternas minha princesa.*

*Ao meu pai Carlos Augusto e meus irmãos **Luiz Carlos, Luiz Augusto, Ana Caroline e Ana Cláudia**.*

*Aos meus orientadores **Dr. Allyson Guimarães, Dra. Adriana Malheiro e Dra. Andréa Teixeira**, pela oportunidade e toda confiança em minha pessoa.*

Dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a **Deus** por me ajudar a chegar até aqui, em meio a tantas dificuldades, sempre ter me sustentado e me permitir viver tantos momentos bons com tantas pessoas maravilhosas. Obrigado Pai.

À família por todo apoio em todos os momentos dessa trajetória, especialmente a minha mãe **Carolina Pereira (in memorian)** e minha avó **Raimunda Rocha (in memorian)**, minhas protetoras guerreiras e rainhas da minha vida, saudades infinitas e amor eterno. Minha vida foi agraciada por seus ensinamentos, conselhos, carinhos e afetos.

Ao meu pai **Carlos Augusto**, por sempre acreditar em mim e me apoiar nos momentos que precisei. Te amo meu pai. Aos meus irmãos **Luis Carlos, Luis Augusto, Ana Caroline e Ana Cláudia**, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando e me ajudando na realização de meus sonhos. Amo vocês sem limites!

Agradeço a todos os amigos que tornaram essa árdua caminhada muito mais empolgante e que somaram muito em minha vida. Em especial **Amanda Lima, Mateus Barros, Regiane Oliveira, Fábio Magalhães e Juliana Neves** pelo espírito de equipe, irmãos que me deram forças ao longo desse trabalho, através de conversas, sorrisos agradáveis e parcerias. **Fábio Magalhães e Juliana Neves**, obrigado por seus importantes conhecimentos que me ajudaram no crescimento acadêmico. Serei eternamente grato a vocês!

Ao meu orientador **Allyson Guimarães da Costa**, por sempre acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de fazer pesquisa com dedicação e por incentivar a sempre fazer o meu melhor desde a minha época de aluno de iniciação científica. Orientador que merece todas as coisas boas desse mundo, um ser de luz para mim.

Aos integrantes do grupo de pesquisa **Amazon InterScience** e do projeto de **Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (BCM-LLA)**. Agradeço por todas as reuniões e discussões, que passamos juntos e que foram importantes para alcançarmos êxitos em muitos aspectos.

*As minhas coorientadoras **Dra. Adriana Malheiro** e **Dra. Andréa Teixeira**, por toda ajuda e conhecimentos a mim acrescentados para aprendizado e evolução ao longo do mestrado.*

*A **Dra. Aya Sadahiro**, por todo o conhecimento passado ao longo da pós-graduação. Agradeço pela oportunidade de cumprir o Estágio de Docência ao seu lado, onde pude obter experiências valiosas dos ensinamentos práticos do ensino em sala de aula e o amor pelo ensino.*

*Ao **Edson Brazão, Magda Rabelo e Ana Paula**, por toda paciência e ajuda ao longo do mestrado de quando mais precisei e não mediram esforços, sempre disponíveis.*

*Ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)** e **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**, pela excelente oportunidade de qualificação que muito me acrescentou e somou em minha vida.*

*A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, pela concessão da bolsa de mestrado, financiamento do projeto e, pelo apoio e incentivo para a realização desse trabalho.*

*A **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** e a **Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD)**, por ceder a estrutura e equipamentos necessários para a execução desse projeto de pesquisa.*

*Ao **Departamento de Ensino e Pesquisa e Laboratório de Genômica da Fundação HEMOAM**, por todo suporte fornecido para esta pesquisa.*

*A todos os **Pacientes** do estudo, e seus **Responsáveis**, por permitirem a utilização das amostras biológicas para esse trabalho de pesquisa. Suas Participações foram muito importantes.*

*À todas as demais pessoas que contribuíram positivamente **para a realização dessa pesquisa**.
Muito obrigado!*

"A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais escuras, se alguém se lembrar de acender a luz."

Albus Dumbledore

RESUMO

As microvesículas (MVs) são importantes mediadores da comunicação intercelular e podem desempenhar um papel importante tanto no microambiente hematopoiético quanto circulação sanguínea. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que MVs derivadas de células T regulatórias (Treg) podem estar associadas à promoção de um microambiente imunossupressor com repercussões na periferia, contribuindo para a progressão tumoral. Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil de microvesículas circulantes derivadas de células T regulatórias (MVs-Treg) e citocinas imunossupressoras em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) submetidos a quimioterapia de remissão. Foi realizado um estudo descritivo, do tipo longitudinal prospectivo, com 20 amostras de sangue periférico de pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B coletadas em quatro momentos da terapia de indução da remissão, referidos como: dia do diagnóstico (D0), dia 8 (D8), dia 15 (D15) e final da terapia de indução da remissão (D35). Em adição, foram incluídas amostras de 20 crianças sem leucemia, que compuseram o grupo controle (GC). Posteriormente, foi realizado a imunofenotipagem dos linfócitos Treg, bem como a caracterização imunofenotípica das MVs-Treg, utilizando os citômetros FACSCalibur (BD Biosciences) e CytoFLEX (Beckman Coulter), respectivamente. Em paralelo, foi realizada a quantificação das citocinas TGF- β e IL-10 com os kits ProQuantum e Cytometric Bead Array (CBA), respectivamente. Nossos resultados demonstraram que os pacientes com LLA-B apresentam ao D0, aumento de IL-10 e diminuição de TGF- β , em conjunto com uma tendência de aumento de MVs-CD152⁺ (CTLA-4). Além disso, observou-se diminuição de linfócitos Treg no D8 e D15. Por fim, notou-se diminuição de IL-10, MVs-CD25⁺ e CD152⁺, com aumento de TGF- β e linfócitos TCD4⁺ e Tregs. Em conclusão, nossos achados demonstram um processo imunossupressor ao D0, possível transição do perfil reposta imunológica durante o tratamento. Além disso, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve a cinética de linfócitos Treg, MVs-Tregs (CD4⁺, CD25⁺ e CD152⁺) e das citocinas IL-10 e TGF- β durante todo o período da terapia de indução da remissão nos pacientes pediátricos com LLA-B.

Palavras-chave: leucemia infantil; linfócitos Tregs; vesículas extracelulares; mediadores imunossupressores; imunossupressão celular.

ABSTRACT

Microvesicles (MVs) are important mediators of intercellular communication and can play an important role in both the hematopoietic microenvironment and blood circulation. Furthermore, recent studies have demonstrated that MVs derived from regulatory T cells (Treg) may be associated with the promotion of an immunosuppressive microenvironment with repercussions in the periphery, contributing to tumor progression. Thus, the present study aimed to characterize the profile of circulating MVs derived from regulatory T cells (MVs-Treg) and immunosuppressive cytokines in pediatric patients with B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) undergoing remission chemotherapy. A descriptive, prospective longitudinal study was carried out with 20 peripheral blood samples from pediatric patients diagnosed with B-ALL collected at four moments of remission induction therapy, referred to as: day of diagnosis (D0), day 8 (D8), day 15 (D15) and end of remission induction therapy (D35). In addition, samples from 20 children without leukemia were included, who made up the control group (CG). Subsequently, immunophenotyping of Treg lymphocytes was performed, as well as immunophenotypic characterization of MVs-Treg, using the FACSCalibur (BD Biosciences) and CytoFLEX (Beckman Coulter) cytometers, respectively. In parallel, the quantification of the cytokines TGF- β and IL-10 was carried out with the ProQuantum and Cytometric Bead Array (CBA) kits, respectively. Our results demonstrated that patients with B-ALL present, on D0, an increase in IL-10 and a decrease in TGF- β , together with a trend towards an increase in MVs-CD152+ (CTLA-4). Furthermore, a decrease in Treg lymphocytes was observed on D8 and D15. Finally, a decrease in IL-10, MVs-CD25+ and CD152+ was noted, with an increase in TGF- β and CD4+ T lymphocytes and Tregs. In conclusion, our findings demonstrate an immunosuppressive process at D0, a possible transition of the immunological response profile during treatment. Furthermore, to our knowledge, this is the first study that describes the kinetics of Treg lymphocytes, MVs-Tregs (CD4+, CD25+ and CD152+) and the cytokines IL-10 and TGF- β during the entire period of remission induction therapy in pediatric patients with B-ALL.

Keywords: childhood leukemia; Treg lymphocytes; extracellular vesicles; immunosuppressive mediators; cellular immunosuppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Comprometimento de progenitores de linfócitos B.....	20
Figura 2. Distribuição e ocorrência de LLA no Estado do Amazonas.....	23
Figura 3. Populações de VEs.....	28
Figura 4. Transferência de RNAs por VEs (MVs e EXOs)	29
Figura 5. Biogênese e cargas de MVs.....	31
Figura 6. Diferentes mecanismos de imunossupressão mediado pelos linfócitos Treg.....	35
Figura 7. Efeitos da IL-10 no microambiente da leucemia	40
Figura 8. Fluxograma de trabalho do estudo	51
Figura 9. Identificação dos Linfócitos Treg (CD4+CD25+FoxP3+)	52
Figura 10. Identificação das MVs-Treg (Anex V ⁺ CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD152 ⁺)	54
Figura 11. Perfil de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B ao diagnóstico	68
Figura 12. Perfil de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes com DRM ⁽⁻⁾ e DRM ⁽⁺⁾	70
Figura 13. Cinética de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B	71
Figura 14. Redes Integrativas de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B ao diagnóstico	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T.....	24
Tabela 2. Classificação da LLA, conforme a OMS.....	25
Tabela 3. Painel para imunofenotipagem de linfócitos Treg	52
Tabela 4. Painel para imunofenotipagem de MVs-Treg	53
Tabela 5. Dados demográficos hematológicos da população do estudo.....	66
Tabela 6. Características clínicas da população estudada	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AR	Alto Risco
ARF1	Fator 1 de ribosilação de ADP
ARF6	Fator 6 de ribosilação de ADP
BFM	Grupo Alemão Berlim-Frankfurt-Munique
BR	Baixo Risco
Ca ²⁺	Cálcio
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CCL2	Ligante 2 de quimiocina
CCL5	Ligante 5 de quimiocina
CDs	Cluster of Differentiation – Cluster de Diferenciação
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEs	Células Endoteliais
CLs	Células Leucêmicas
CTHs	Células-Tronco Hematopoéticas
CTLA-4	Antígeno-4 associado ao Linfócito T Citotóxico
CTMs	Células-Tronco Mesenquimais
D0	Dia do Diagnóstico
D15	Dia 15 da terapia de indução a remissão do protocolo de tratamento
D35	Dia 35 da terapia de indução a remissão do protocolo de tratamento
D8	Dia 8 da terapia de indução a remissão do protocolo de tratamento
D84	Dia 84 da terapia de consolidação da remissão do protocolo de tratamento
DCs	Células Dendríticas
DRM	Doença Residual Mensurável
EMMPRIN	Indutor de metaloproteinase de matriz extracelular
EXOs	Exossomos
FAB	Grupo Francês-Americano-Britânico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Infantil
GIPB	Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRR	Instituto René Rachou
iTr35	Linfócitos T reguladores induzidos e secretor de IL-35
iTregs	Linfócitos T reguladores induzidos
LAG-3	Gene 3 de ativação de linfócitos
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
LMA	Leucemia Mieloblástica Aguda

LTCs	Linfócitos T citotóxicos
MHC-I	Classe de histocompatibilidade principal I
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve
MO	Medula Óssea
MT1-MMP	Metaloproteinase de Matriz Tipo 1 da Membrana
MVs	Microvesículas
MVs-Treg	Microvesículas circulantes derivadas de linfócitos T reguladores
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NK	Natural Killer
NSCLC	Câncer de pulmão de células não pequenas
nTregs	Células T regulatórias naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
RCC	Remissão Clínica Completa
SAME	Setor de Atendimento Médico e Estatístico
SCF	Fator de célula estaminal
SG	Sobrevida Geral
SIVE	Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Sangue Periférico
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TANs	Neutrófilos associados a tumores
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento transformante beta
Th	Linfócitos T helper / auxiliar
Th 1	Linfócitos T helper 1
Th 17	Linfócitos T helper 17
Th 2	Linfócitos T helper 2
Tregs	Linfócitos T regulatórios
VEs	Vesículas Extracelulares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B.....	20
2.1.1. Etiopatogenia.....	20
2.1.2. Epidemiologia da Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B.....	22
2.1.3. Diagnóstico	24
2.1.4. Tratamento quimioterápico	25
2.2. COMPARTIMENTO MEDULAR	26
2.2.1. Microambiente em homeostase.....	26
2.2.2. Microambiente Leucêmico.....	27
2.3. MICROVESÍCULAS	28
2.3.1. Biogênese das MVs.....	30
2.3.2. Transporte de carga e comunicação intercelular	32
2.4. RESPOSTA IMUNE TUMORAL	32
2.5. LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS.....	34
2.6. CITOCINAS IMUNOSSUPRESSORAS	38
2.6.1. TGF- β	38
2.6.2. IL-10	39
2.7. LINFÓCITOS Treg, MVs E CITOCINAS COMO BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS	41
3. RELEVÂNCIA DO ESTUDO.....	45
4. OBJETIVOS	47
4.1. Objetivo geral.....	47
4.2. Objetivos Específicos.....	47
5. MATERIAL E MÉTODOS	49
5.1. Aspectos éticos.....	49
5.2. Tipo e Área de estudo.....	49
5.3. População de estudo	49
5.4. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão	49
5.5. Obtenção e seleção das amostras	50
5.6. Imunofenotipagem de linfócitos T regulatórios	51
5.7. Imunofenotipagem de MVs-Treg.....	53
5.8. Quantificação de citocinas imunossupressoras	54
5.9. Obtenção dos dados clínicos e hematológicos	55
5.10. Análise descritiva e estatística.....	55
6. RESULTADOS	57
6.1. CAPÍTULO I - Publicação do Artigo de revisão	57

6.2. CAPÍTULO II - Dados obtidos através dos experimentos do estudo.....	66
6.2.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	75
8. CONCLUSÃO	77
9. REFERÊNCIAS	80
10. ANEXOS	113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é a neoplasia pediátrica de maior ocorrência no mundo, representando 25% de todas as neoplasias infantis entre crianças menores de 15 anos. Dentre os subtipos de LLA, destaca-se a Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B), correspondendo a 80% de todos os casos (1). A LLA-B é uma neoplasia maligna hematológica caracterizada por um bloqueio na diferenciação hematopoiética, levando a superprodução de linfócitos B imaturos na medula óssea (MO), com liberação no sangue periférico (SP) e locais extramedulares. Esse aumento no número de linfócitos reflete em um quadro de pancitopenia, sendo dessa forma as manifestações clínicas mais comuns, fadiga, dispnéia, febre, infecções, sangramentos ou hematomas, relacionadas à supressão funcional da MO (2,3).

No compartimento medular ósseo, especificamente no microambiente hematopoiético, as células estromais compõem a maior fonte de citocinas e fatores de crescimento, proporcionando uma rede de sinalização essencial para a homeostase do microambiente da MO (4,5). No entanto, na leucemia, é observado que as células leucêmicas (CLs) podem secretar estruturas vesiculares originadas a partir de membrana celular, denominadas vesículas extracelulares (VEs), que induzem alterações nos nichos do microambiente medular, resultando na transformação de nichos saudáveis em "leucêmicos" (6,7).

Dentre as populações de VEs que participam da reprogramação dos nichos da MO, encontram-se as MVs, também conhecidas como micropartículas ou ectossomos. Essas estruturas correspondem a vesículas liberadas no espaço extracelular por brotamento externo e fissão da membrana plasmática (8). Estas, representam atualmente um novo mecanismo de comunicação celular, especialmente por sua capacidade de transferir seu conteúdo biológico composto por um repertório de informações genéticas, incluindo sequências de DNA e RNAs, como RNAs mensageiros, RNAs não codificantes e principalmente micro RNAs, capazes de reprogramar as células-alvo, exercendo atividades importantes em processos fisiológicos e patológicos (8–12).

Embora a liberação de MVs ocorra em condições fisiológicas, durante processos patológicos como o câncer, a liberação dessas vesículas apresenta-se consideravelmente aumentada (13). Além disso, a quantidade de vesículas derivadas especificamente de células cancerosas demonstrou estar correlacionado com a malignidade da neoplasia (14). Por outro

lado, os diferentes tipos celulares da imunidade inata e adaptativa, também são capazes de liberar MVs, que atuam no sistema imunológico como importantes mensageiros parácrinos (15,16).

Dentre as células liberadoras de MVs, estão os linfócitos T regulatórios (Linfócitos Tregs), que desempenham um papel chave na regulação ou supressão de outras células do sistema imunológico, tais como linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Estas são essenciais na regulação da resposta imune e auto tolerância, controlando a expansão e ativação de células T efectoras e autos reativas, além de evitar respostas exacerbadas e o surgimento de doenças autoimunes (17). No entanto, um crescente número de evidências tem demonstrado que as Treg podem ser recrutadas por CLs, como forma de evasão do sistema imunológico no câncer (18,19).

Os linfócitos Tregs podem mediar a imunossupressão celular através da intensa produção de TGF- β e IL-10, sendo esta última sua citocina chave e principal regulador para modular a intensidade e a duração das respostas imunes (17,20). Descoberta em 2007, a IL-35 é outra importante citocina secretada por Treg, com sua liberação ocorrendo em resposta à estimulação por IFN- γ ou via receptores do *Toll-like* (TLR), atuando de forma antagonista as funções pró-inflamatórias de outras citocinas membros da família IL-12 (20,21). Além disso, essas células podem induzir uma regulação negativa da resposta imune através de interação célula a célula, mediada através do antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4), inibindo o reconhecimento e eliminação de células cancerosas pelo sistema imunológico (22).

Recentemente, estudos demonstraram que os linfócitos Treg também são capazes de regular a resposta imune através da reprogramação de células efectoras, a partir da liberação de VEs (23). No entanto, uma melhor compreensão da contribuição das MVs-Treg na imunotolerância é necessária, uma vez que números elevados de linfócitos Tregs são frequentemente observados no microambiente tumoral de neoplasias sólidas e hematológicas, e são correlacionadas a um pior prognóstico em muitos tipos de câncer, incluindo em leucemias (24,25).

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B

2.1.1. Etiopatogenia

As leucemias abrangem um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas, que podem ser classificadas em leucemias linfoblásticas ou mieloides e divididas em agudas e crônicas (26). Com isso, as leucemias podem variar a depender do tipo celular afetado, estágio de maturação e contagem de blastos, respectivamente (26). Nisso, as leucemias agudas são caracterizadas por um bloqueio profundo na diferenciação hematopoiética e resultam em uma superprodução de blastos imaturos, enquanto as leucemias crônicas são caracterizadas pela produção excessiva de células diferenciadas parcialmente maduras (27,28).

Dentre as leucemias agudas, a Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) destaca-se por ser a neoplasia pediátrica de maior ocorrência no mundo. Sua etiologia ainda permanece desconhecida, porém sabe-se que é uma doença com causa multifatorial que pode envolver a interação de fatores genéticos/ambientais. Entre os riscos de exposição relatados para o desenvolvimento da LLA em um indivíduo, estão o uso de pesticidas, alto peso ao nascer, poluição ambiental, exposição materna à tinta caseira, fumo durante a gravidez, exposição à radiação ionizante, síndromes congênitas e histórico de leucemia na família (29–32).

Em 2006, Mel Greaves propôs uma hipótese relacionando infecções tardias com respostas imunes anormais a agentes infecciosos após a ausência de estimulação e modulação imune durante a primeira infância (33). Greaves propõe que presença de clones pré-leucêmicos frente às respostas imunológicas/inflamatórias mediadas por infecção podem fornecer um meio seletivo para clones pré-leucêmicos. Em que uma resposta desregulada das células T à infecção pode resultar em uma resposta inflamatória exacerbada, com um perfil de liberação de citocinas e quimiocinas que, pelo menos transitoriamente, pode suprimir a hematopoiese e/ou induzir a apoptose. Neste contexto, o clone pré-leucêmico pode ter uma vantagem distinta de sobrevivência e/ou proliferação, facilitando assim o surgimento de CLs (33–35).

Curiosamente, Chang e colaboradores em seus achados sugerem que crianças que desenvolvem LLA durante a primeira infância podem apresentar uma função imunológica anormal, em função de uma expressão constitutivamente menor de IL-10 ao nascimento e uma propensão a reagir a infecções normais de uma maneira hipersensível (36). Nisso, a IL-

10 é uma citocina fundamental na regulação de respostas inflamatórias, evitando respostas hiperativas em infecções patogênicas (37). Em adição, investigações do United Kingdom Childhood Cancer Study (UKCCS) relataram que crianças diagnosticadas com LLA tiveram significativamente mais episódios infecciosos no primeiro ano de vida (38).

Nesse contexto, a LLA apresenta-se com uma neoplasia geneticamente heterogênea que acomete os progenitores linfoides, podendo ser classificadas em Leucemia Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B) e células T (LLA-T), sendo a primeira responsável por aproximadamente 85% dos casos (39). A LLA-B é uma neoplasia hematológica caracterizada por um bloqueio na diferenciação de progenitores ou precursores de linfócitos B, que se proliferam e se acumulam na MO. Este sequestro do sistema hematopoiético por CLs resulta no comprometimento da produção de outros tipos de células sanguíneas essenciais para o transporte de oxigênio ou coagulação, como eritrócitos e plaquetas, respectivamente (40) (Figura 1).

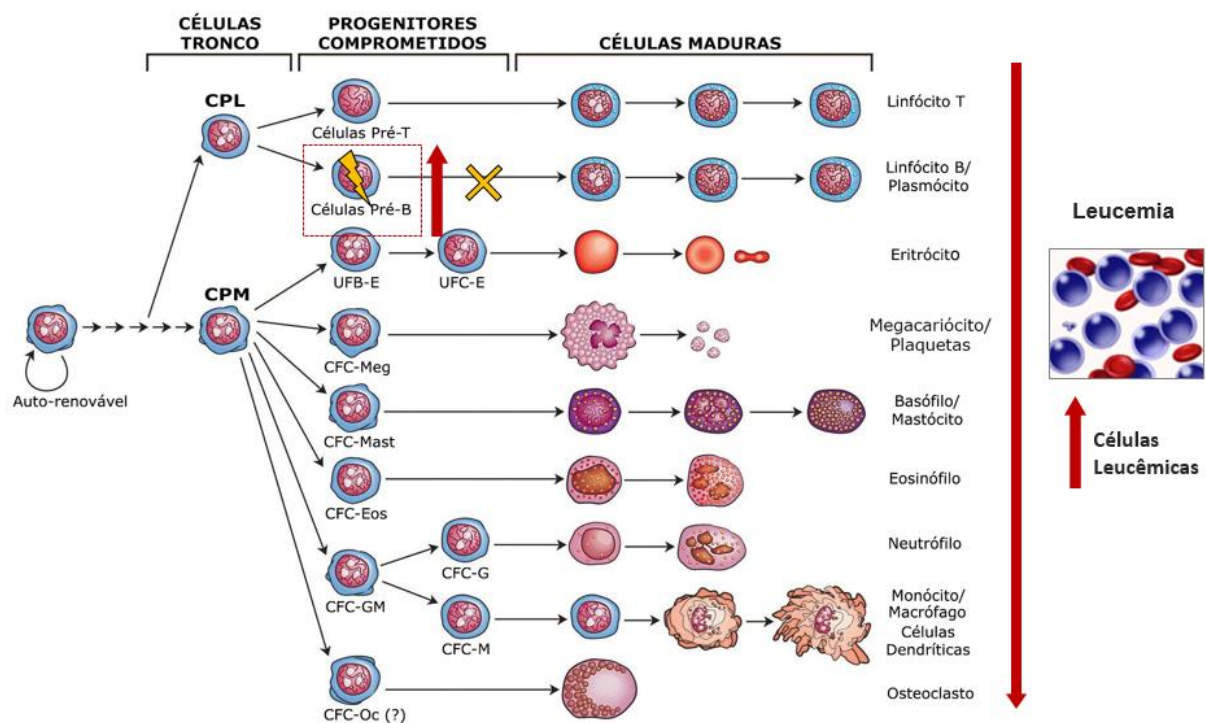


Figura 1. Comprometimento de progenitores de linfócitos B. Em condições normais ocorre a diferenciação celular. Na leucemia linfoblástica aguda de células B ocorre uma falha na diferenciação de progenitores de linfócitos B levando a uma superprodução de linfócitos B imaturos na medula óssea (MO), com liberação no sangue periférico (SP) e locais extramedulares. Fonte: Adaptado de mountnittanyhealth.org

Dessa forma, as principais manifestações clínicas dos pacientes com LLA-B, provém de duas principais implicações que a proliferação leucêmica acarreta, sendo elas: a insuficiência da MO e infiltração de órgãos (41). A insuficiência da MO, é responsável pela tríade da leucemia, caracterizada por anemia, granulocitopenia e trombocitopenia, refletindo em sintomas como palidez, fadiga, dispneia, febre, infecções graves, sangramentos ou hematomas (3,4). Por outro lado, a infiltração leucêmica pode ocorrer no sistema nervoso central (SNC), testículo, ovário, rim, ossos, articulações, olhos, gânglios, fígado, baço, pele e em locais menos frequentes, o coração e pulmão por exemplo (42).

2.1.2. Epidemiologia da Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B

Entre os tipos de câncer infantojuvenil em todo o mundo, a leucemia é o câncer mais comum, representando cerca de 25% a 35% de todos os casos novos de câncer dessa categoria (43). Nos últimos anos no Brasil, houve um aumento significativo na incidência de leucemia, chegando ao 9º câncer mais comum (44). Dentre os subtipos de leucemia linfoblástica aguda (LLA), a LLA de células B (LLA-B) representa 80% de todos os casos (45). Em 2020, no Brasil, foram registrados 6.738 óbitos por leucemia, representando uma taxa de 3,18 óbitos a cada 100 mil pessoas (46). Para o triênio de 2023 a 2025, estima-se que haverá cerca de 7.930 novos casos de câncer infantojuvenil no Brasil, o que equivale a uma taxa estimada de 134,81 casos por um milhão de crianças e adolescentes (46).

A proporção de casos de indivíduos com leucemia entre as regiões do Brasil é variável e tem aumentado desde o último relatório do Instituto Nacional do Câncer (INCA) (43,44). A região Norte foi identificada como a região com o segundo maior número casos de leucemia, tendo o Amazonas, particularmente sua capital Manaus, classificada em 2010 como a capital com a segunda maior taxa de incidência ajustada à idade (abaixo de 14 anos) de leucemia em crianças e adolescentes (47–49). Em 2011, teve a maior taxa de incidência no país, com 76,8 casos de leucemia por milhão de habitantes (50,51).

Estudo realizado na Fundação HEMOAM, demonstrou que entre os anos de 2005 a 2015 houve 459 indivíduos diagnosticados com LLA-B no Estado do Amazonas (52). Estes estavam principalmente na faixa etária ≤ 10 anos (325 casos) e maior número de casos ocorreu em indivíduos do sexo masculino. Na figura 2 pode-se observar a incidência de LLA nos municípios do Amazonas ao longo desses anos.

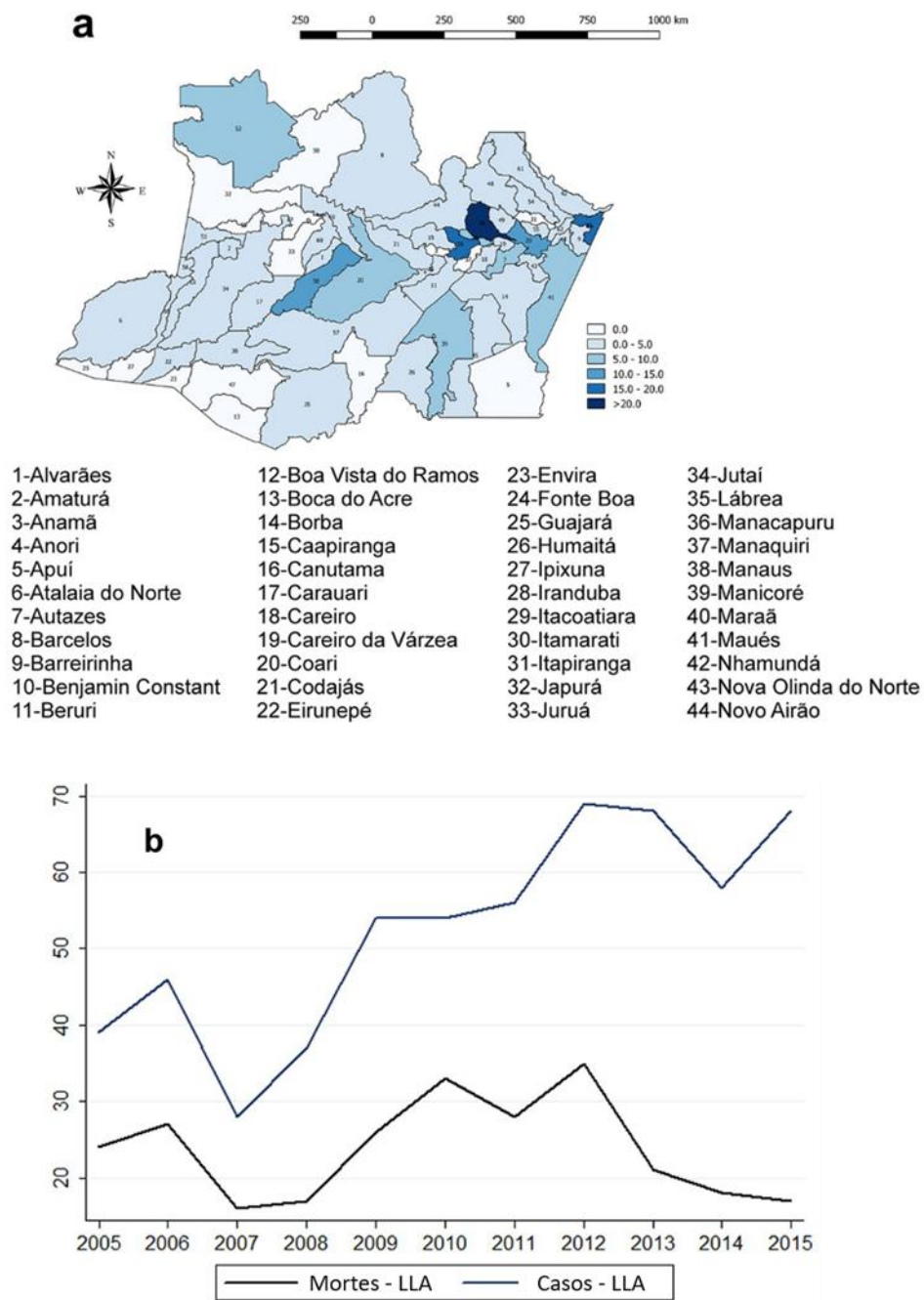


Figura 2. Distribuição e ocorrência de LLA no Estado do Amazonas. A) Distribuição espacial dos pacientes com LLA. **B)** Número de casos e óbitos de pacientes com LLA entre 2005 e 2015. Fonte: Adaptado de Silva-Junior et al., 2019 (52).

2.1.3. Diagnóstico

A Organização Mundial da Saúde (OMS) e o Grupo Francês Americano Britânico (FAB) estabelecem que as leucemias são classificadas com base nas características citomorfológicas, expressão de antígenos de superfície celular, além de alterações genéticas e moleculares as quais estão relacionadas com o prognóstico da doença (53,54). Além disso, a morfologia e citoquímica fornecem informações sobre os blastos, sendo importantes na triagem, diagnóstico e na definição do tipo de leucemia (55,56).

A LLA se subdivide fenotipicamente em linhagem B (LLA Pró-B, LLA B Intermediário/Comum, LLA Pré-B, LLA B Madura) e T (LLA Pró-T, LLA Pré-T, LLA T Cortical e LLA T Medular), conforme observado na Tabela 1 (57). Assim, para identificar a diferenciação de células progenitoras linfoides, utiliza-se a técnica de imunofenotipagem celular, que consiste na identificação imunológica de antígenos de superfície, citoplasmáticos e nucleares, também conhecidos como Cluster of differentiation (CD) que estão presentes nos blastos leucêmicos (56,58).

Tabela 1. Imunofenotipagem para progenitores de linfócitos B e T.

Linhagem B	CD10	CD19	CD22	CD79a	Tdt	Ig
Pró-B	-	+	+	+	+	-
B Comum	+	+	+	+	+	-
Pré-B	±	+	+	+	+	C-mu
B Madura	±	+	+	+	±	+
Linhagem T	CD1a	CD2	CD3	CD4	CD7	CD8
Pró-T	-	-	C	-	+	-
Pré-T	-	+	C	-	+	-
T Cortical	+	+	C	+	+	+
T Medular	-	+	C,S*	±	+	±

Abreviações: Tdt, desoxinucleotidil transferase terminal; Ig, imunoglobulina; C, citoplasmático; S, superfície; +, expressão do antígeno; ±, expressão variável, frequentemente positiva; -, ausência de expressão do antígeno; *Linfócitos T medular são positivos apenas para CD4 ou CD8, mas não ambos. Fonte: Adaptado de McGregor et al., 2012 (59).

Digno de nota, a LLA-B e LLA-T foram subclassificadas no ano de 2008 pela OMS conforme as alterações genéticas, sendo realizada em 2016 a mais atual revisão (Tabela 2). A classificação da LLA-B possui vários subtipos geneticamente caracterizados, que abrangem as translocações t (9;22) ou t (12;21), rearranjos no gene *MLL* ou alterações no número de

cromossomos (aneuploidia). Com isso, o subtipo da LLA é um importante fator a ser levado em consideração para que a abordagem do protocolo de tratamento e prognóstico sejam adequados (41).

Tabela 2. Classificação da LLA, conforme a OMS.

Leucemia Linfoblástica B
Leucemia Linfoblástica B, NES
Leucemia Linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia Linfoblástica B com t (9; 22) (q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
Leucemia Linfoblástica B com t (v; 11q23); <i>MLL</i> rearranjado
Leucemia Linfoblástica B com t (12; 21) (p13; q22); <i>TEL-AML1</i> (ETV6-RUNX1)
Leucemia Linfoblástica B com hiperdiploidia
Leucemia Linfoblástica B com hipodiploidia (LLA hipodiploide)
Leucemia Linfoblástica B com t (5; 14) (q31.1; q32.3); <i>IL3-IGH</i>
Leucemia Linfoblástica B com t (1; 19) (q23; p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
<i>Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica B, semelhante a BCR-ABL1</i>
<i>Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica B com iAMP21</i>
Leucemia Linfoblástica T
<i>Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica precursora de células T precoce</i>
<i>Entidade provisória: Leucemia Linfoblástica de células natural killer</i>

Abreviações: NES, não especificada separadamente. Fonte: Adaptado de Arber et al., 2016 (54).

2.1.4. Tratamento quimioterápico

O tratamento convencional da LLA envolve uma combinação de drogas quimioterápicas, que tem por finalidade alcançar a eliminação das CLs e por conseguinte, o reestabelecimento da hematopoese normal. Atualmente na Fundação HEMOAM, os tratamentos quimioterápicos utilizados para LLA-B podem ser baseados no protocolo GBTLI-2009 e BFM-2009, sendo o primeiro o mais utilizado. O protocolo GBTLI LLA-2009, é um protocolo do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia Infantil, distribuído em 6 fases: Terapia de Pré-fase; Terapia de Indução da Remissão; Terapia de Consolidação da Remissão; Fase de Intensificação; Fase da Consolidação Tardia; Fase de Manutenção (60).

A terapia de indução da remissão tem como objetivo alcançar a remissão clínica completa em 4 semanas e, essa etapa leva em consideração critérios como estratificação de risco ao diagnóstico, a idade, contagem leucocitária, acometimento do SNC e análise

citogenética de anormalidades cromossômicas, para a identificação da melhor dosagem da combinação das drogas a serem utilizadas por exemplo. Posteriormente, inicia-se a terapia de consolidação da remissão que tem por objetivo eliminar possíveis células leucêmicas residuais que permanecem após início da terapia de indução. Por fim, na fase de manutenção, o objetivo consiste em prevenir a recaída da doença após as etapas anteriores (58,60).

Em paralelo, as avaliações laboratoriais são realizadas e têm por objetivo avaliar a resposta do paciente ao tratamento quimioterápico. Se o paciente não estiver respondendo aos medicamentos quimioterápicos, podem ocorrer alterações no grupo de risco e protocolo de tratamento, além de possíveis estratégias terapêuticas visando melhorar a sobrevida livre de doença (58). Dessa forma, durante a quimioterapia de remissão, a análise de doença residual mensurável (DRM) apresenta-se como principal parâmetro de avaliação de resposta terapêutica, consistindo na mensuração de CLs residuais sobreviventes à quimioterapia, capazes de resultar em episódios de recaída da doença (61).

Com isso, o prognóstico de recaída pode ser determinado mensurando os níveis de DRM em amostras de sangue e, especialmente partir de aspirados de MO do paciente, que são obtidos em períodos específicos ao longo do regime de tratamento (62). Por conseguinte, as contagens de DRM celular com valor prognóstico no nível de corte de 0,01% (10^{-4}) podem ser detectadas por citômetros de fluxo de 3 a 4 cores. Estudos verificaram que quando um paciente apresenta níveis de DRM celular $\geq 0,01\%$ o risco de recaída de leucemia é significativamente maior do que níveis de DRM inferiores a 0,01% (63–65). Além disso, quanto maior o valor de DRM (por exemplo, DRM > 1%) ao final da fase de indução da quimioterapia, maior o risco de recaída e menor a taxa de sobrevida (66).

2.2. COMPARTIMENTO MEDULAR

2.2.1. Microambiente em homeostase

O microambiente medular é constituído por tecidos fisiológicos que incluem o estroma com fibroblastos, vasos sanguíneos e glóbulos brancos, principalmente linfócitos T e macrófagos. As células-tronco hematopoéticas (CTHs) atuam na medula óssea em áreas especializadas chamadas de nichos, que são locais onde diferentes tipos de células controlam

o número, quiescência, autorrenovação, diferenciação e distribuição de CTHs (67). Os nichos são divididos em duas áreas distintas, mas igualmente conectadas: a primeira na qual o osteoblasto desempenha um papel primordial, chamado de nicho osteoblástico; a segunda onde predominam as células endoteliais, sendo denominado nicho vascular (67–69).

Em particular, no nicho vascular, as células endoteliais sinusoidais favorecem a sobrevivência, proliferação e diferenciação de progenitores mieloides e megacariocíticos. As CTHs no nicho vascular são expostas a hormônios, fatores de crescimento, oxigênio e nutrientes, para detectar sinais e estímulos da circulação periférica. Isso favorece a automanutenção, proliferação e/ou diferenciação (70,71). Ao contrário, o nicho osteoblástico favorece a manutenção do estado de quiescência que corresponde um estado em que as CTHs não estão em fase de proliferação, apesar de continuarem metabolicamente ativas (72).

2.2.2. Microambiente Leucêmico

As células leucêmicas (CLs), assim como as CTHs, dependem da interação com o microambiente ou do nicho para sua própria auto-renovação e manutenção. Os tumores têm uma pequena subpopulação de células responsáveis pela iniciação e recaídas do câncer (73–75). A interação das CLs com outras células localizadas na MO, tem papel preponderante nesses fenômenos e contribui decisivamente para o desenvolvimento da doença e para os mecanismos de resistência aos medicamentos (76).

As células células-tronco progenitoras mesenquimais derivadas da MO, constituem uma população que suportam o nicho das CTHs normais e leucêmicos (77,78). Os mecanismos de quimiorresistência e recaída são impulsionados por um conjunto de células iniciadoras de leucemia raras. Essas células são capazes de escapar dos quimioterápicos e estão envolvidas principalmente na auto-renovação e na geração de novas CLs. Além disso, esta classe celular tem em comum várias propriedades com as CTHs, o que normalmente leva à formação de uma célula CTHs idêntica à célula-mãe, além de uma célula progenitora parcialmente diferenciada incapaz de autorrenovação (portanto, não células-tronco), mas com um grande potencial replicativo (79,80).

2.3. MICROVESÍCULAS

As vesículas extracelulares (VEs) correspondem a um grupo heterogêneo de estruturas membranosas derivadas de células, e podem ser divididas em três tipos: exossomos (EXOs), microvesículas (MVs) e corpos apoptóticos, conforme visualizado na Figura 3 (81–83). Neste contexto, as MVs, também conhecidas como ectossomos ou micropartículas, são produzidos a partir do brotamento e fissão da membrana plasmática, apresentando um diâmetro que varia de 100 a 1000 nm (81,84–86). Fisiologicamente, as MVs são secretadas nos fluidos corporais e desempenham papéis importantes na coagulação, inflamação, expansão e renovação de células-tronco por exemplo (87–91). Por outro lado, as MVs possuem papéis importantes no desenvolvimento e progressão da doenças por meio da regulação da sinalização intercelular (92).

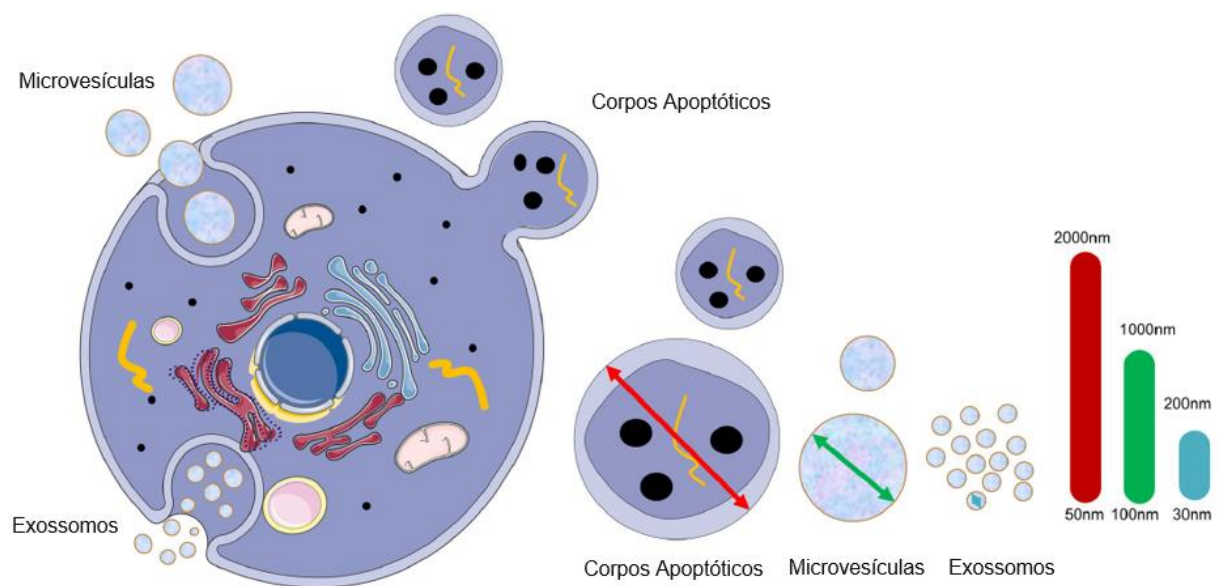


Figura 3. Populações de VEs. As células liberam populações heterogêneas de VEs com tamanhos variados. Corpos apoptóticos são liberados por células em apoptose. Microvesículas são derivados diretamente da membrana plasmática. Exossomos são derivados de compartimentos endossomais intracelulares. Fonte: Adaptado de Qin et al, 2021 (87).

Embora as pesquisas sobre VEs representem um campo de investigação em evidência, historicamente, os primeiros estudos datam a década de 60. Em 1967, Peter Wolf identificou vesículas derivadas de plaquetas, mencionadas como “pó de plaquetas”, sendo este achado considerado por muitos autores um marco nos estudos sobre VEs (88). Em 1980, Poste e

Colaboradores descobriram MVs secretadas espontaneamente por células B16 de melanoma, que tendiam a aumentar o potencial metastático para o pulmão (89). Esta pesquisa pioneira estabeleceu uma base sólida para inúmeros estudos futuros, que demonstraram os papéis cruciais desempenhados por MVs na imunomodulação e progressão tumoral (90).

Atualmente as VEs podem ser isoladas da maioria dos tipos celulares e fluidos biológicos, como saliva, urina, líquido de lavagem nasal e brônquico, líquido amniótico, leite materno, plasma, soro e fluido seminal (91–96). Recentemente, verificou-se que EXOs e MVs são capazes de transportar e transferir material genético (DNA e RNAs) como demonstrado na Figura 4, destacando a importância dessas vesículas e abrindo espaço para novas investigações sobre o seu papel como mediadores de comunicação celular (97,98).

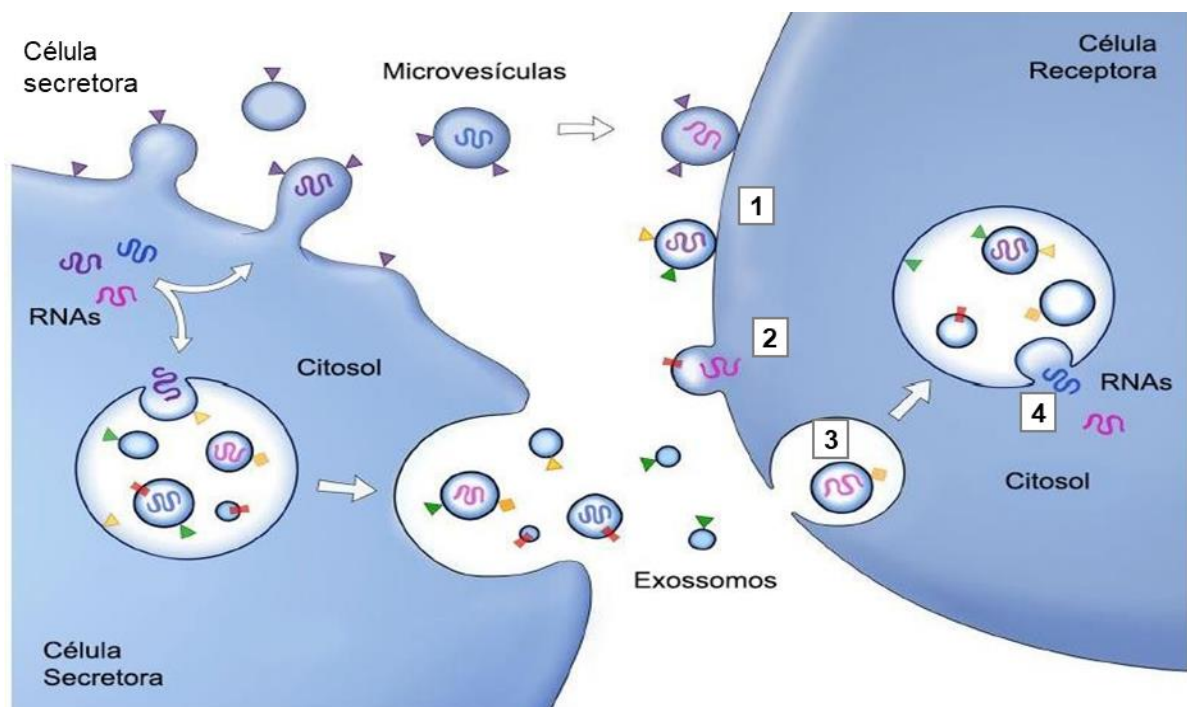


Figura 4. Transferência de RNAs por VEs (MVs e EXOs). Proteínas associadas à membrana (triângulos) e transmembrana (retângulos) e RNAs (símbolos curvos) são incorporados seletivamente na vesícula intraluminal do endossomo multivesicular ou em MVs que brotam da membrana plasmática. Os MVEs se fundem com a membrana plasmática para liberar EXOs no meio extracelular. (1) MVs e EXOs podem ancorar na membrana plasmática de uma célula-alvo. (2) As vesículas ligadas podem se fundir diretamente com a membrana plasmática ou ser (3) endocitadas. (4) As vesículas endocitadas podem então se fundir com a membrana delimitadora de um compartimento endocítico. Ambas as vias resultam na entrega de proteínas e RNA na membrana ou citosol da célula alvo. Fusão e endocitose são representadas apenas para vesículas exossomais, mas MVs derivadas da membrana plasmática podem ter destinos semelhantes. Abreviações: RNAs, Ácido ribonucleico; MVs, Microvesículas. Fonte: Adaptado de Raposo, 2013 (99).

Um progresso importante no conhecimento das VEs foi resultante de trabalhos colaborativos concebidos pelos membros da Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (SIVE), que tiveram por objetivo padronizar a nomenclatura e metodologias utilizadas nos estudos. Já em 2014, a SIVE divulgou um documento sobre requisitos experimentais para a caracterização das VEs e suas funções, expondo etapas básicas de pesquisa necessárias para obtenção de resultados precisos (100,101).

2.3.1. Biogênese das MVs

Atualmente é bem aceito que as MVs se originam da brotação externa e da fissão da membrana celular e são amplamente distribuídas em vários fluidos corporais, incluindo urina, sangue periférico e efusões peritoneais. As funções e componentes das MVs estão associados às suas células de origem, que incluem células tumorais, células-tronco, células imunes e células progenitoras endoteliais (102). Curiosamente, o processo de abscisão está relacionado a rearranjos moleculares da membrana plasmática, que são afetados pela composição proteica e lipídica, bem como pelos níveis de Ca^{2+} (103). Um aumento no Ca^{2+} intracelular leva a alterações na distribuição da estrutura de fosfolipídios da membrana plasmática, como demonstrado na figura 5. A fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão localizadas no lado do folheto interno da bicamada celular (104). A assimetria é mantida por enzimas dependentes de Ca^{2+} , incluindo translocases de aminofosfolipídios, flippases, disquetes e calpaína (105).

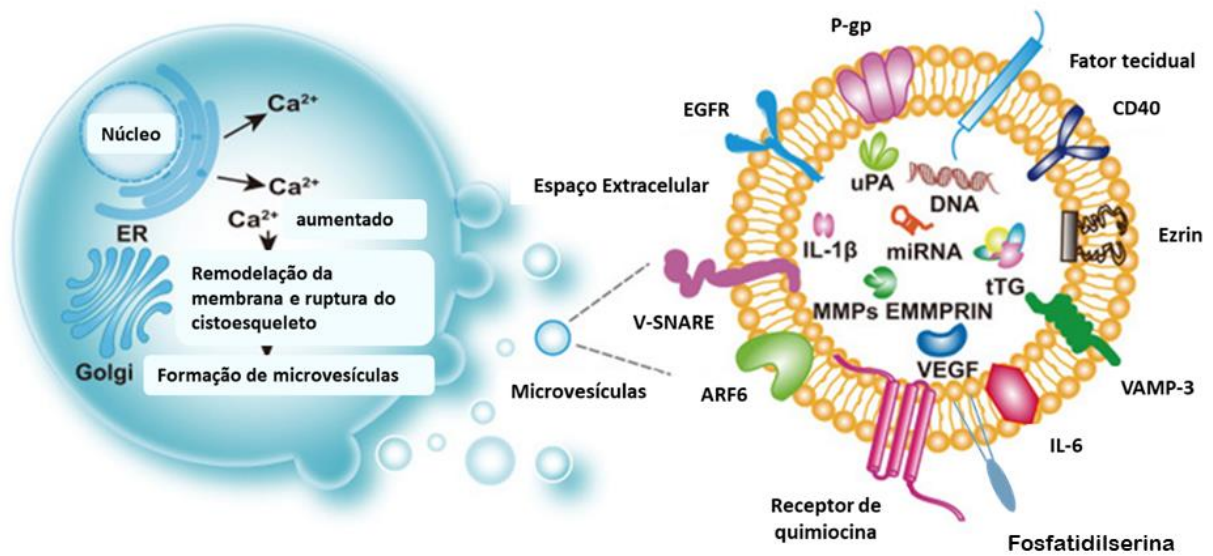


Figura 5. Biogênese e cargas de MVs. Os MVs são produzidos via desprendimento da membrana plasmática. O aumento de Ca^{2+} intracelular pode ativar enzimas dependentes de Ca^{2+} , levando à despolimerização do citoesqueleto de actina e remodelação da membrana, promovendo então a liberação de MV. Cargas representativas de MVs são mostradas: P-gp, TF, EGFR, v-SNARE, ARF6, receptor de quimiocina, IL-6, IL-1 β , VAMP-3, Ezrin, CD40, uPA, DNA, microRNA, tTG, EMMPRIN, MMPs e VEGF. Abreviações: TF, fator tecidual; EGFR, receptor do fator de crescimento epidérmico; v-SNARE, receptor de proteína de ligação de fator sensível a N-etilmaleimida solúvel vesicular; ARF6, fator 6 de ADP-ribosilação; IL-6, interleucina 6; IL-1 β , interleucina 1 β ; VAMP-3, proteína de membrana 3 associada à vesícula; CD40, agrupamento de diferenciação 40; uPA, ativador de plasminogênio uroquinase; tTG, transglutaminase tipo tecido; EMMPRIN, indutor de metaloproteinase de matriz extracelular; MMPs, metaloproteinases de matriz; VEGF, fator de crescimento epitelial vascular. Fonte: Adaptado de Shuangli Zhu, 2021 (106).

Níveis aumentados de Ca^{2+} intracelular ou liberação de Ca^{2+} pelo retículo endoplasmático podem ativar Ca^{2+} e enzimas dependentes, levando à inibição de translocases e ativação de *scramblase*, proteína responsável pela translocação de fosfolípidos entre duas monocamadas de uma bicamada lipídica da membrana celular. Como resultado, a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina anteriormente localizadas no lado interno da citomembrana são realocados para o lado externo, e o citoesqueleto de actina permanece despolimerizado, promovendo a liberação de MVs (107,108). Além disso, a degradação de MVs é controlada por pequenas GTPases, incluindo fatores de ADP-ribosilação (ARFs), Rab22a (também conhecido como Rab22) e Rho (109,110). Por exemplo, ARF6 é um membro da família ARF de pequenas proteínas de ligação ao GTP, e sua ativação é relevante para a reciclagem de MVs e remodelação da actina na camada periférica das células (111).

Outra molécula, denominada *Rab22a*, foi relacionada com a formação de MVs e está associado ao tráfego de MVs regulado por ARF6 (110,112). As GTPases da família Rho

também são importantes mediadoras da produção de MV (113). A ativação de RhoA é particularmente eficaz para promover a formação de MVs, e a ativação de RhoA demonstrou regular positivamente o gene a jusante *ARF6* ou *ARF1* (114,115). Assim, RhoA pode acelerar indiretamente a ativação de MLCK, levando à liberação de MVs no espaço extracelular (114). RhoA também pode ativar quinases contendo bobina enrolada associada a Rho e quinase LIM, que promove a contração baseada em actina-miosina para a formação de MVs (113,114). Em geral, a inibição do ARF6 ou de seus alvos reduz a liberação de MVs (109).

2.3.2. Transporte de carga e comunicação intercelular

MVs podem transportar várias proteínas, algumas das quais estão presentes em suas superfícies, como por exemplo CD40, MMPs, ARF6, indutor de metaloproteinase de matriz extracelular (EMMPRIN), membros da família Rho, integrina beta 1, proteína de membrana 3 associada à vesícula (VAMP-3) (103,116–120). As cargas de MVs incluem enzimas proteicas de membrana, receptores de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, lipídios e ácidos nucleicos, incluindo miRNAs, DNA genômico e genes oncogênicos conforme demonstrado na figura 5 (121–123).

Adicionalmente, ressalta-se que as MVs são importantes mediadores da comunicação intercelular, realizando essa função das seguintes maneiras: 1) entregam proteínas, moléculas bioativas e mRNAs às células-alvo; 2) elas se fundem com células-alvo para transferir receptores de superfície, além de realizar funções biológicas por meio da ligação entre receptores e ligantes; e 3) estimulam células-alvo via ligantes de superfície, funcionando como um complexo de sinalização (124). Por exemplo, Melzani e colaboradores, descobriram que MVs liberados de melanoma podem expressar FasL em sua superfície, permitindo que eles induzam apoptose ligando-se a CD95 em linfócitos T (125). Este pode ser um mecanismo pelo qual as células cancerosas escapam dos linfócitos que se infiltram no tumor.

2.4. RESPOSTA IMUNE TUMORAL

As respostas imunes antitumorais em modelos animais e pacientes com câncer contribuíram para o ressurgimento da teoria da imunovigilância (126). Um tumor altamente

imunogênico em um indivíduo imunocompetente resultará em estimulação ideal do sistema imune inato, levando à produção de citocinas estimuladoras, inflamação aguda, ativação de muitas células T e B e eliminação imediata do tumor. Por outro lado, com um tumor com menor poder imunogênico e/ou indivíduo pouco responsivo ou imunodeficiente, pode não atingir a eliminação completa das CLs e levar à sobrevivência das células cancerígenas que, no entanto, permanecem sob vigilância imunológica (127).

Durante um período prolongado de tempo, o crescimento lento do tumor seria acompanhado por ativação repetida do sistema imunológico e eliminação de algumas células tumorais, seguido por outros ciclos de crescimento tumoral e destruição imunomediada (127). Até o momento, a maioria dos estudos de interações tumor/sistema imunológico foi realizada após o diagnóstico do câncer, ou seja, na fase de escape da imunovigilância. Esta fase particular é caracterizada pelo aumento de linfócitos Tregs e células supressoras derivadas de mieloides (MDSCs), citocinas imunossupressoras, células tumorais, células T efetoras pouco funcionais e células que expressam moléculas capazes de inibir a ativação de células T (128–130).

Durante a homeostase imunológica, um mecanismo crucial de tolerância periférica é a regulação da resposta de células T efetoras por meio de pontos de controle imunológico em linfócitos T citotóxicos (LTCs) e células T CD4⁺ ativadas, visando proteger o tecido de danos inflamatórios (131,132). Células T CD4⁺ que expressam o antígeno CD25 e o Foxp3, conhecidas como linfócitos Tregs, inibem as respostas imunes adaptativas principalmente por meio da interação com outras subpopulações de células T e células apresentadoras de antígenos (133). As duas moléculas de checkpoint mais bem descritas, CTLA-4 e PD-1, atuam como reguladores negativos da função das células T e foram associadas à evasão imune no câncer (134).

O envolvimento de PD1 com seu co-receptor, PDL-1 (expresso por outras células imunes, células mesenquimais, células vasculares e células cancerosas), resulta na regulação negativa da atividade das células T, que inibe suas atividades antitumorais como migração de células T, proliferação, secreção de mediadores citotóxicos e restrição da morte celular (135). Nos últimos anos, o uso de inibidores de checkpoint imunológico, como anti-PD1 (pembrolizumab e nivolumab), anti-PD-L1 (MPDL3280A) e anti-CTLA4 (ipilimumab) teve um sucesso notável aumentando a resposta antitumoral efetora em diferentes malignidades (136).

2.5. LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS

Os linfócitos Tregs foram inicialmente descritas por Gershon e colaboradores no início da década de 1970 e foram chamadas de células T supressoras (137). Cinco anos depois, Sehon e colaboradores sugeriram que os linfócitos Tregs regulavam negativamente a imunidade tumoral e contribuíam para o crescimento tumoral em camundongos (138). Após mais cinco anos, North e colaboradores publicaram uma série de experimentos fornecendo evidências de que as células T $CD4^+ CD25^+$ de camundongos portadores de tumor inibiam a rejeição do tumor, indicando a existência de células T supressoras de tumor (139–141). Esses estudos pioneiros estabeleceram o campo dos linfócitos Tregs na imunologia tumoral.

Ao longo dos últimos anos, várias populações de linfócitos Tregs fenotipicamente distintas foram sugeridas (142–149). Os linfócitos Tregs são amplamente considerados como os mediadores primários da tolerância periférica, sendo responsável por manter a homeostase imunológica, prevenir a autoimunidade e moderar a inflamação induzida por patógenos e antígenos ambientais. Além disso, os linfócitos Tregs também podem ser “induzidos”, “adaptados” ou “convertidos” a partir de células T efectoras durante processos inflamatórios em tecidos periféricos, ou geradas experimentalmente como possível ação terapêutica (150–152).

Os linfócitos Tregs induzidas por TGF- β (iTregs) são células que participam de respostas regulatórias a antígenos ambientais e, portanto, parecem ser uma maneira pela qual o sistema imunológico expande muito seu repertório de células regulatórias. Embora elas não tenham a “assinatura” molecular completa dos linfócitos Tregs naturais (nTregs), são derivadas do timo e diferem funcionalmente destas últimas, por elas demonstrarem ser totalmente capazes de desempenhar sua função reguladora em diferentes cenários de estudo, seja em modelos murinos ou em humanos (153–156). Os nTregs derivadas do timo e iTregs podem se diferenciar na periferia e migrar para o microambiente tumoral. (128).

Os linfócitos Tregs exercem sua ação supressora sobre diversas células do sistema imune inato e adaptativo, incluindo macrófagos, DCs, neutrófilos, células NK, células B, células T $CD4^+$ e células T citotóxicas $CD8^+$ (157,158). Para alcançar a regulação da resposta imune, os Tregs empregam uma variedade de mecanismos imunossupressores, como ilustrado na Figura 6. Esses mecanismos incluem: (A) interação e supressão de APCs; (B) liberação de VEs; (C) produção de citocinas imunossupressoras, tais como TGF- β , IL-10 e IL-35; (D)

indução de citólise das células T efetoras por granzimas e perforinas; (E) perturbações metabólicas envolvendo CD25 (receptor alfa de IL-2) (158–166).

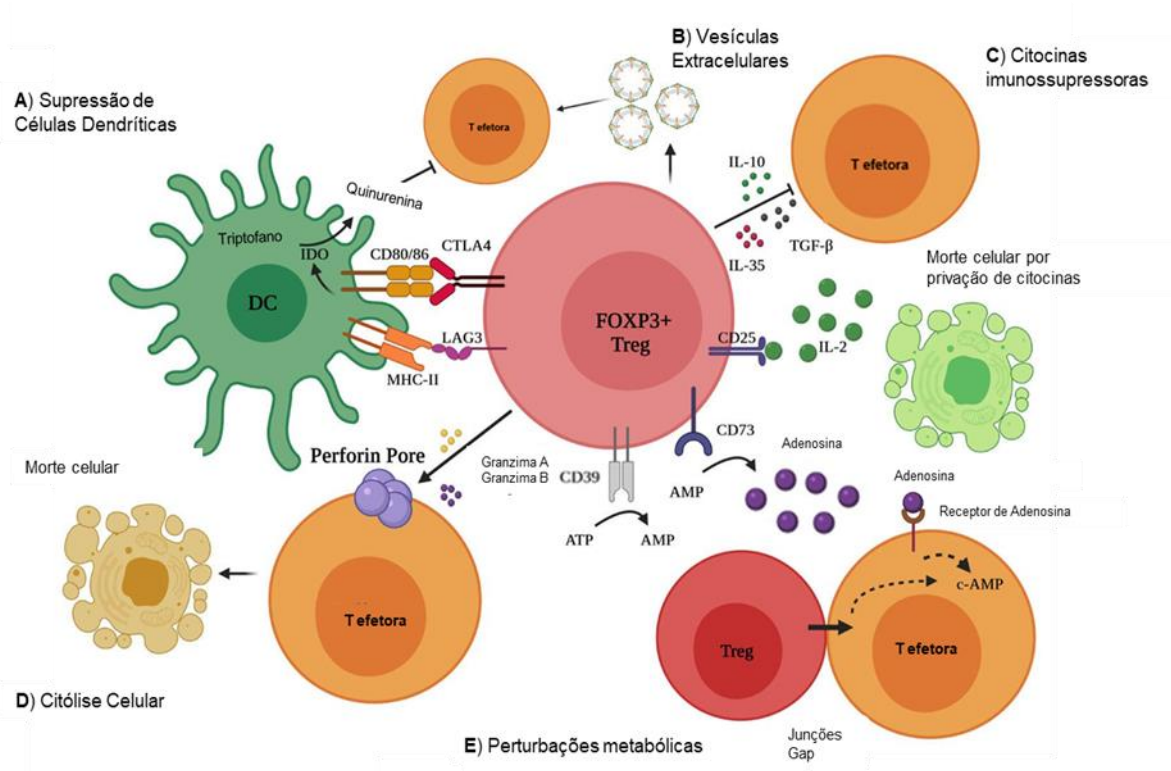


Figura 6. Diferentes mecanismos de imunossupressão pelos linfócitos Treg. Vários mecanismos incluem (A) supressão de células dendríticas (DCs) para modular sua maturação e função via CTLA4 e LAG3, (B) liberação de vesículas extracelulares (EVs), (C) secreção de citocinas imunorreguladoras supressivas, como TGF- β , IL-10 e IL-35, (D) citólise celular mediada por granzima/perforina e (E) perturbações metabólicas envolvendo privação de citocinas dependente de CD25, geração de adenosina pelas ectoenzimas CD39 e CD73 e inibição mediada por c-AMP. Abreviações: CTLA4, proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico; LAG3, gene 3 de ativação de linfócitos; IDO, indolamina 2,3-dioxigenase; ATP, adenosina trifosfato; AMP, adenosina monofosfato. Fonte: Adaptado de Grover; Goel e Greene, 2021 (167).

Adicionalmente, evidências demonstraram que a imunossupressão mediada por linfócitos Tregs é um dos mecanismos cruciais de imunoevasão tumoral e o principal obstáculo para o sucesso da imunoterapia tumoral (168–171). Assim, elas podem limitar a imunidade antitumoral e também podem bloquear respostas benéficas (172). Além do tráfico, diferenciação e expansão dos linfócitos Tregs, estas podem estar presentes em um tumor como resultado da conversão de células T CD4⁺ CD25⁻ (153,173–175). Nesse contexto, três

citocinas inibitórias apresentam-se como mediadores chaves da função dos linfócitos Tregs, que são IL-10, IL-35 e TGF- β (162).

O TGF- β além de um marcador intracelular chave é também um fator crucial de desenvolvimento e funcional para linfócitos Tregs CD4⁺CD25⁺, pois desempenha um papel positivo importante na homeostase dos linfócitos Tregs envolvendo geração e sobrevivência desse subconjunto (174,176,185,186,177–184). Ao mesmo modo, a IL-2 possui função essencial na homeostase e função dos linfócitos Tregs, pois na ausência dessa citocina, os linfócitos Tregs não conseguem sobreviver ou expandir seu número no timo e na periferia, ficando restritas também de suprimir a proliferação de células T (173,187–193).

Além disso, o TGF- β está presente em concentrações elevadas no microambiente tumoral e pode mediar a conversão de células T CD4⁺CD25⁻ (153,174,194). Da mesma forma, a IL-10 é frequentemente encontrada no microambiente tumoral, onde suporta a diferenciação de linfócitos Tregs CD4⁺ IL-10⁺TGF- β ⁺ e induz linfócitos iTregs (142,170,195,196). Estudos demonstraram que estimulando células T CD4⁺ naives na presença de IL-10, IFN- α ou uma combinação de IL-4 e IL-10, um subconjunto de linfócitos iTreg pode ser gerado *in vitro* (142,197). Curiosamente, a MO é o compartimento que abriga a quantidade mais elevada de linfócitos Tregs CD4⁺CD25^{hi}FoxP3⁺ (198). Nisso, os linfócitos Tregs podem ser recrutados e explorados por CLs para evitar a imunovigilância.

Li e colaboradores em 2007 encontraram expressão aumentada de Foxp3⁺ em linfócitos Tregs no sangue periférico de pacientes pediátricos com LLA antes do tratamento quimioterápico, em relação a voluntários saudáveis e pacientes em remissão (199). Além disso, células CD4⁺CD25⁺CD127⁻ aumentadas na circulação foram observados na LLA em pacientes ao diagnóstico e após a remissão em relação ao grupo controle, e curiosamente o número de linfócitos Tregs diminuiu com a ocorrência de remissão (200).

Bhattacharya e colaboradores em 2014, investigaram o papel e a regulação dos linfócitos Tregs em pacientes pediátricos com LLA-B e os resultados indicaram um menor número de células CD4⁺CD25⁺ coexpressando mais FoxP3, IL-10, TGF- β e CD152/CTLA-4 do que nos voluntários saudáveis. Tais propriedades imunorregulatórias elevadas podem potencializar a capacidade supressora das Tregs na LLA, aumentando assim a gravidade da doença (24). Além disso, Darwish e colaboradores em 2015, em estudo avaliando o SP de pacientes com LLA revelaram que o número absoluto de células CD4⁺CD25⁺ elevado após a indução da remissão foi muito menor em comparação ao momento do diagnóstico (201).

Posteriormente em 2016, Idris e colaboradores, observaram em sua pesquisa aumento significativo dos níveis de linfócitos Tregs na circulação e no compartimento medular de pacientes pediátricos e adultos com LLA-B (202). No mesmo ano, estudo realizado por Salem e colaboradores, também encontraram um número elevado de linfócitos Tregs na circulação de pacientes pediátricos com LLA quando comparado ao grupo controle (crianças saudáveis) e, de maneira similar aos estudos anteriores, a contagem de linfócitos Tregs estava mais elevada no momento do diagnóstico, exibindo uma diminuição ao final da quimioterapia (203).

Os linfócitos Tregs demonstraram liberar VEs, em especial MVs e EXOs, que entregam mensagens supressivas para as células-alvo, permitindo a comunicação intercelular independente do contato célula-a-célula (23,204–207). A natureza supressora das VEs derivadas de linfócitos Tregs, tem sido atribuída especialmente ao CD73, uma ectoenzima que catalisa a geração de adenosina, um nucleosídeo altamente imunossupressor (205). EXOs CD73⁺ desempenham funções imunossupressoras através da geração de adenosina e a perda desse marcador demonstrou ser capaz de reverter seu potencial supressor (180,205,208). Além disso, os linfócitos Tregs secretam EXOs com mais moléculas de membrana em comparação com outros subtipos de células T (205). Nisso, os EXOs derivados de linfócitos Tregs desempenham papéis imunossupressores nas células-alvo, transmitindo suas cargas imunossupressoras (209).

Estudo demonstraram que os linfócitos Tregs de ocorrência natural liberam EXOs que suprimem as células patogênicas Th1 na colite murina através da transferência de microRNAs (miRNAs) (23). Além disso, EXOs derivados de linfócitos Tregs reduziram o infarto do miocárdio e reprimiram a apoptose de células miocárdicas em camundongos com infarto agudo do miocárdio, e ao mesmo tempo foram capazes de suprimir a expressão de marcadores de macrófagos M1 promovendo a expressão de marcadores de fenótipo M2 em tecidos miocárdicos e células RAW264 (210). No contexto das leucemias, EXOs isolados de pacientes com LLA demonstraram ser capazes de alterar o perfil das células T em direção a um fenótipo regulatório, aumentando a expressão de FOXP3 e citocinas imunossupressoras, incluindo TGF- β e IL-10 (211).

Estudos recentes também observaram que algumas citocinas estão contidas em EXOs derivados de linfócitos Tregs, como a IL-4, IL-10 e IL-35 (212,213). A IL-35 exossomal é relatada como alvo de células T e B para induzir tolerância periférica (209,214). A ativação

do TCR de linfócitos Tregs resulta na liberação de VEs capazes de suprimir a proliferação de células T e alterar seu perfil de citocinas em favor da secreção de IL-4 e IL-10 (213). VEs-Treg foram capazes de diminuir a concentração de IL-6, enquanto aumentavam a produção de IL-4 e IL-10, ao diminuir a IL-6 é possível que as VEs-Treg impeçam a diferenciação de células Th17 e promovam o desenvolvimento de linfócitos Tregs imunossupressores (213). A IL-6 é conhecida por atuar em conjunto com o TGF- β para causar degradação de FoxP3 e promover a diferenciação de células T CD4⁺ naivas em células Th17 pró-inflamatórias (215,216).

Além disso, as VEs derivados de linfócitos Tregs exercem suas funções supressoras via miRNAs ao inibir a proliferação celular e a liberação de citocinas de células Th1 (217,218). Nesse contexto, os EXOs de linfócitos Tregs foram estudados até certo ponto, todos os quais tem relatado suas funções imunossupressoras (219). Além disso, o miRNA exossomal de linfócitos Tregs inibe fortemente a atividade das células Th1 pela inibição da produção de IFN- γ mediada por COX-2 (217).

2.6. CITOCINAS IMUNOSSUPRESSORAS

2.6.1. TGF- β

O fator de crescimento transformador- β (TGF- β) é uma citocina da família de fatores de crescimento e diferenciação, que é codificado por 33 genes em mamíferos e compreende homo e heterodímeros (220). A superfamília do TGF- β controla vários mecanismos de sinalização que fundamentam todos os processos biológicos, desde o desenvolvimento e homeostase, até a reprodução e o reparo de danos teciduais (221). O TGF- β é necessário para o desenvolvimento e diferenciação de linfócitos iTreg e têm sido o foco de muitos estudos nos últimos anos, especialmente por contribuir para o desenvolvimento de um microambiente tumoral altamente imunossupressor (222,223).

No melanoma, o TGF- β foi capaz de impedir a proliferação e a infiltração intratumoral de células T CD4⁺ e T CD8⁺ efectoras e reduzir a concentração de IFN- γ pela regulação positiva da expressão de PD-1 (224). Yu e colaboradores mostraram que o TGF- β secretado por células tumorais foi inversamente correlacionado com a frequência de células T CD8⁺ no nicho tumoral e está associado a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama

(225). Uma maior expressão de TGF- β também apresentou uma correlação inversa com a infiltração de células T CD8⁺ em pacientes com câncer de pulmão, indicando que a modificação da expressão de TGF- β pode ser um preditor da resposta terapêutica ao medicamento nivolumab (226). O TGF- β não apenas modifica a plasticidade das células T CD8⁺ no microambiente tumoral, mas também as torna mais propensas à imunossupressão, especialmente quando consideramos o aumento da ativação das células T pelo co-receptor CD8 (227).

Curiosamente, estudos realizados em pacientes idosos com Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) demonstraram que concentrações de TGF- β exibiam um papel positivo e importante na supressão de CLs, sendo capaz de reduzir a capacidade de autorrenovação e inibir a proliferação dessas células malignas (228–231). Além disso, em CLs o TGF- β exerce ações inibitórias em uma variedade de fatores de crescimento e sobrevivência, incluindo IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF e SCF (229,232–235). Outro ponto importante é que, uma vez que o TGF- β tem sua expressão reduzida e a sua sinalização desregulada a leucemogênese é intensificada (231,236,237). Por fim, estudos realizados em pacientes com LLA, demonstraram concentrações diminuídas de TGF- β em comparação ao grupo controle (238).

2.6.2. IL-10

A IL-10 é a citocina com propriedades anti-inflamatórias mais importante, sendo considerada o regulador chave da resposta imune (239,240). A IL-10 apresenta uma estrutura de homodímero, composta por dois monômeros ligados de forma não covalente onde dentro do monômero, existem duas pontes dissulfeto (C30-C126 e C80-C132) que são essenciais para manter a estrutura e a atividade biológica desta citocina (239,241). Por conseguinte, a IL-10 é produzida por células imunes ativadas, em particular monócitos/macrófagos e subconjuntos de células T, incluindo linfócitos Tregs e iTreg (242–244).

A atuação da IL-10 ocorre através de um complexo receptor transmembranar (IL-10R), que é composto por IL-10R1 e IL-10R2 com capacidade de regulação das funções de muitas células imunes. Em monócitos/macrófagos por exemplo, a IL-10 diminui a produção de mediadores inflamatórios e inibe a apresentação de antígenos, embora aumente sua captação de antígenos (239). Além disso, a relevância fisiológica especial desta citocina

reside na prevenção e limitação de reações imunes específicas e inespecíficas e consequentemente, de danos nos tecidos (239).

A superexpressão de IL-10 ou seu receptor (IL-10R) foi observada em várias doenças malignas hematológicas, incluindo leucemia (245–248). A IL-10 tem a capacidade de promover a sobrevivência e a evasão imunológica das células leucêmicas, ao mesmo tempo que diminui as respostas antitumorais no microambiente da leucemia, como demonstrado na Figura 7 (246,247,249–254). Além disso, a IL-10 é secretada por células cancerígenas e exerce seus efeitos supressores em outras células imunes efetoras, incluindo células citotóxicas TCD8+ e NK (170,171). Nesse sentido, a ativação da resposta antitumoral através do bloqueio terapêutico da IL-10 demonstrou ter um efeito positivo na resposta imune mediada por células T CD8+ e células NK (172,173).

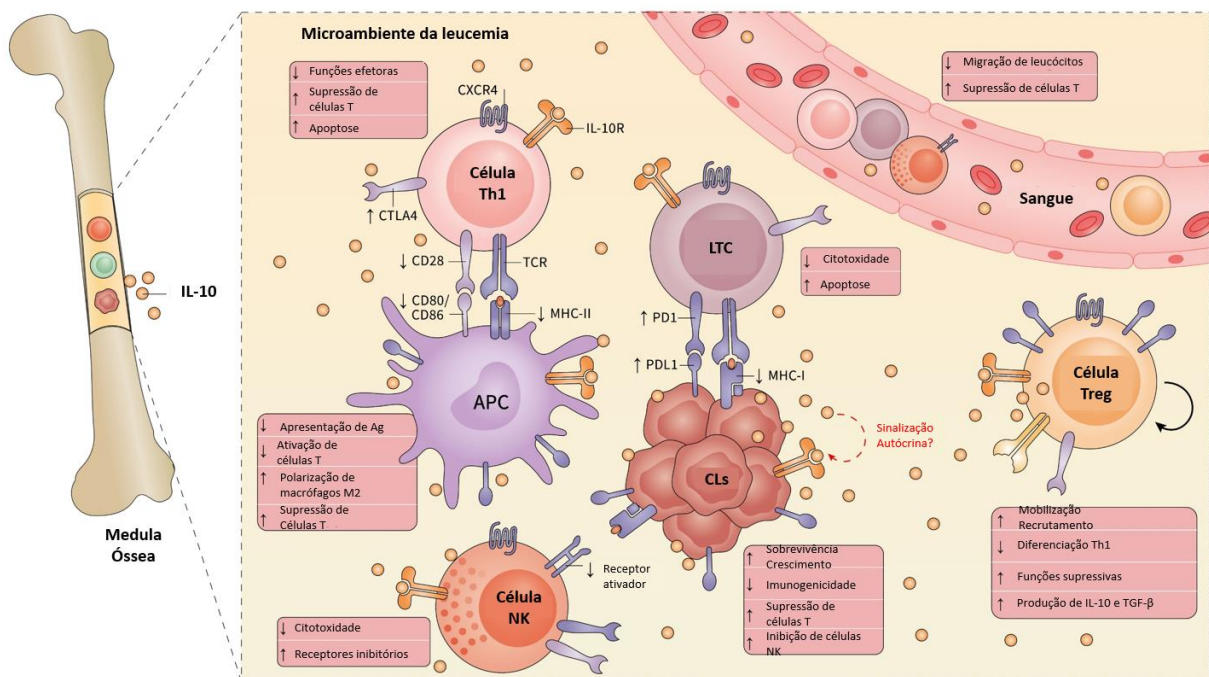


Figura 7. Efeitos da IL-10 no microambiente da leucemia. A IL-10 desempenha um papel importante na proliferação de células leucêmicas, ao mesmo tempo que diminui as respostas citotóxicas. A mediação pela sinalização autócrina de IL-10R, apoia a sobrevivência e o escape imunológico de células leucêmicas (regulação negativa do MHC-I, por exemplo), bem como reduz a capacidade da APC de estimular células T por meio da regulação negativa de moléculas estimuladoras (MHC-II e CD80/CD86, por exemplo). Além disso, as respostas antitumorais são fortemente reduzidas pela regulação positiva de checkpoints imunológicos (como PD-1-PDL1 e CTLA4) que inibem as funções efetoras das células T e NK, levando à apoptose como consequência da alta presença de IL-10, que é fortemente produzida por linfócitos Treg e pelas próprias células leucêmicas. Abreviações: APC - célula apresentadora de antígeno; LTC - linfócitos T citotóxicos; CTLA4 - antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos; CXCR4 - receptor 4 de quimiocina CXC; IL-10R - receptor de interleucina-10; CLs - células leucêmicas; MHC - complexo principal de histocompatibilidade; NK - assassino natural; PD-1 - morte

celular programada 1; PDL1 - ligante 1 de morte celular programada 1; TCR- receptor de células T; Th1 - T ajudante 1. Fonte: Adaptado de Silva et al., 2023 (255).

No câncer de mama, o bloqueio terapêutico da sinalização do receptor de IL-10 contribuiu para o aumento da resposta antitumoral mediada por células T CD8⁺ em pacientes em tratamento quimioterápicos com paclitaxel e carboplatina (174). Alguns estudos demonstraram uma correlação inversa entre células T CD8⁺ e concentrações elevadas de IL-10 no microambiente tumoral, assim como uma associação com um pior prognóstico (175,176). Em pacientes com LMA, observa-se uma elevação da concentração de IL-10 no sangue, o que levanta a questão de seu papel na doença (256). No entanto, as medições da IL-10 foram feitas com a doença já presente. Além disso, a IL-10 pode ser aumentada à medida que o câncer progride, tornando a questão mais complexa (257).

Curiosamente, estudos realizado por Correa e colaboradores, indicaram concentrações elevadas de IL-10 em pacientes com LMA foram associados a maiores taxas de sobrevivência e melhores taxas de resposta à quimioterapia (230). Por outro lado, no sangue periférico de pacientes pediátricos com LLA, a concentração de IL-10 encontra-se elevado quando comparado ao grupo controle, e a partir dessa alta liberação de IL-10, os linfócitos Tregs com alta atividade imunossupressora passam a promover um ambiente anti-inflamatório a favor da progressão da LLA (238,258,259).

2.7. LINFÓCITOS Treg, MVs E CITOCINAS COMO BIOMARCADORES IMUNOLÓGICOS

Os linfócitos T regulatórios (Treg) são células importantes na regulação do sistema imunológico, responsáveis por manter a homeostase, prevenir reações imunológicas autólogas e hiperinflamação causada por patógenos e antígenos ambientais (167). Em pacientes com LLA, foi observado que a frequência de linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺CD127⁻) diminui após a remissão da doença (200). Além disso, estudo realizado por Bhattacharya et al., em pacientes com LLA-B identificaram um menor número de células CD4⁺CD25⁺, no entanto, coexpressando mais FoxP3, IL-10, TGF- β e CD152/CTLA-4 do que o grupo controle (24). Tais dados indicam que as propriedades imunossupressoras dos linfócitos Treg são potencializados na LLA, de maneira a contribuir para a gravidade da doença.

Para modular a resposta imune, os linfócitos Tregs empregam uma variedade de mecanismos imunossupressores incluindo a liberação de vesículas extracelulares (VEs), produção de citocinas imunossupressoras, como TGF- β , IL-10 e IL-35 (163–171). As MVS um subconjunto de VEs tem sido explorados devido à característica de conter um subconjunto de moléculas e antígenos específicos da célula parental, podendo desempenhar um papel como biomarcador (260). Além disso, verifica-se que a liberação de MVs é substancialmente maior durante a progressão do câncer, refletindo em altos níveis em fluidos biológicos, tanto em neoplasias sólidas, como em neoplasias hematológicas (261,262).

Notavelmente, foi demonstrado que o desequilíbrio do sistema imunológico está envolvido na patogênese da LLA (263). Com isso, estudos têm relatado um desequilíbrio nas concentrações de moléculas imunológicas solúveis, incluindo citocinas, que podem contribuir para um estado de imunossupressão celular, contribuindo para sobrevivência e proliferação de células leucêmicas (24,264,265). Magalhães-Gama e colaboradores verificaram que a medula óssea dos pacientes com LLA-B no momento do diagnóstico apresenta um desequilíbrio nas concentrações de quimiocinas e citocinas associado à presença de CLs caracterizado por um perfil anti-inflamatório. Contudo, ao D35 (final da terapia de indução da remissão) com a eliminação ou redução expressiva do número de blastos, observa-se a inclinação para um perfil pró-inflamatório, com aumento de citocinas do perfil Th1 e Th17, indicando a recuperação da resposta imune inflamatória (266).

Por conseguinte, Kerr e colaboradores, demonstraram em seu estudo avaliando o microambiente medular de pacientes pediátricos com LLA-B em terapia de indução, que a concentração aumentada de CCL5, IFN- γ e IL-2 ao diagnóstico foram associados ao subgrupo de baixo risco e doença residual mensurável negativa (DRM⁽⁻⁾), enquanto CCL2 foi identificado como um biomarcador de pior prognóstico, sendo associado aos pacientes estratificados no subgrupo de alto risco e com doença residual mensurável positiva (DRM⁽⁺⁾), sugerindo a necessidade de intervenções terapêuticas alternativas e adjuvantes que aumentem a eficácia da terapia de indução (267).

Assim, a busca por novos biomarcadores é necessária, visando realizar um melhor acompanhamento e monitoramento nos pacientes pediátricos com LLA-B durante a terapia de indução. Com isso, um dos métodos de buscar indicadores prognósticos pode ser realizado através da avaliação de componentes e moléculas associadas a complexa rede imunológica leucêmica, na circulação e, especialmente no compartimento medular, uma vez que podem

estar intimamente associadas a progressão neoplásica e resposta imunológica, refletindo dessa forma a piora ou recuperação do paciente.

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

3. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

Mundialmente a LLA possui grande importância por ser a neoplasia pediátrica de maior ocorrência e com altas taxas de sobrevida geral a longo prazo, sendo importante levar em consideração que uma melhora significativa na taxa de sobrevida ocorreu a partir da classificação dos pacientes em grupos de risco, com base em fatores prognósticos e ajustes no tratamento utilizado (268). Dentre os indicadores prognósticos, a avaliação de DRM durante o tratamento, tem sido muito importante para a melhora e êxito terapêutico em pacientes portadores de LLA-B, servindo como uma ferramenta de preditora de recaídas após a quimioterapia de indução, uma vez que as CLs residuais são capazes de repovoar a MO (269).

Apesar do aumento na taxa de sobrevida, a recaída e a morbidade ocasionada pelo tratamento quimioterápico ainda se apresentam como fatores importantes, por acometer uma parcela significativa de crianças. Nesse sentido, a identificação de biomarcadores preditivos de resposta terapêutica durante a terapia de indução pode contribuir para um tratamento mais assertivo, fornecendo informações importantes que indique a necessidade de possíveis ajustes no regime quimioterápico, resultando em melhores desfechos clínicos.

Nesse contexto, os linfócitos Treg ganham destaque, sendo uma subpopulação com propriedades imunossupressoras. Essas células desempenham um papel crucial na supressão da resposta imune antitumoral, secretando citocinas imunossupressoras e interagindo com outras células do sistema imune. O microambiente tumoral criado por essas interações favorece a progressão do câncer, onde as microvesículas liberadas por essas células atuam como mensageiros intercelulares, com propriedades imunossupressoras que podem moldar o microambiente tumoral e influenciar a resposta imune.

Portanto, a compreensão do papel dessas microvesículas e mediadores imunossupressores dos linfócitos Treg no câncer, representa uma área crucial de pesquisa, abrindo novas possibilidades no desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras, a partir de estudos com foco no comportamento e efeitos desses mediadores nas células do sistema imune. Podendo assim, direcionar o desenvolvimento de estratégias para reverter a imunossupressão associada ao câncer. Sendo essa, uma das abordagens promissoras com potencial efeito de melhorar significativamente os resultados clínicos e a qualidade de vida dos pacientes com LLA.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Caracterizar o perfil de Linfócitos T regulatórios, microvesículas e citocinas imunossupressoras em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

4.2. Objetivos Específicos

- Descrever o perfil clínico-hematológico dos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Avaliar o perfil de Linfócitos T regulatórios dos pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Caracterizar o perfil de Microvesículas circulantes derivadas de Linfócitos T regulatórios em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Quantificar a concentração de TGF- β e IL-10 em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B;
- Investigar a correlação entre o perfil de Linfócitos T regulatórios, microvesículas circulantes, e a concentração de TGF- β e IL-10 com a presença de doença residual mensurável durante a quimioterapia de remissão.

MATERIAL E MÉTODOS

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Aspectos éticos

O presente estudo faz parte de um projeto maior intitulado “*Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica*” aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM, sob número de parecer 4.982.395, CAAE 51257921.2.0000.0009.

5.2. Tipo e Área de estudo

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo longitudinal prospectivo para caracterização do perfil de Linfócitos T regulatórios, microvesículas e citocinas imunossupressoras em pacientes pediátricos recém-diagnosticados com LLA-B. O estudo foi desenvolvido na Fundação HEMOAM em parceria com a Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD).

5.3. População de estudo

A população do estudo foi composta por pacientes atendidos no serviço de hematologia pediátrica na Fundação HEMOAM, com diagnóstico de LLA-B e obtida por demanda espontânea no período de agosto de 2021 a julho de 2023. Além dos pacientes, foram recrutadas crianças (sem leucemia) atendidas na triagem clínica da Fundação HEMOAM, que realizaram o hemograma para investigação de anemia, cujo resultado não apresentou alterações na série leucocitária.

5.4. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão utilizados para o grupo caso foram: pacientes com LLA- B comum *de novo*, admitidos no Serviço de Hematologia Pediátrica da Fundação HEMOAM, com idade inferior a 18 anos, tratados com o Protocolo GBTLI LLA-2009 e BFM-2009. Para o grupo controle foram definidos como critérios de inclusão: idade inferior a 18 anos, sem

alterações no hemograma e sem infecção prévia há menos de 04 semanas. Não foram incluídos no estudo crianças com doença inflamatória aguda e crônica conhecida ou com distúrbio autoimune e recusa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e Termo de Assentimento Livre Esclarecido (TALE), para as crianças alfabetizadas de 6 a menores de 18 anos. Amostras insuficientes para realização dos ensaios foi adotado como critério de exclusão, para ambos os grupos.

5.5. Obtenção e seleção das amostras

Para este estudo, foram utilizadas amostras de sangue periférico (SP) de pacientes com LLA-B e de crianças saudáveis (grupo controle), armazenadas no biorrepositório do laboratório multidisciplinar da Fundação HEMOAM. As quais foram obtidas através de punção venosa (procedimentos de rotina para estes pacientes). As coletas foram realizadas em 4 momentos da terapia de indução da remissão, referidos como: dia do diagnóstico (D0), oitavo dia da terapia de indução (D8), décimo quinto dia da terapia de indução (D15), final da terapia de indução (D35).

A equipe médica da Fundação HEMOAM coletou 3mL de sangue periférico, distribuindo-o em tubos específicos: um contendo EDTA para análise do hemograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo (1 ml), e outro com separador de soro para avaliação das citocinas e microvesículas (2 ml). Além disso, teve-se a coleta de sangue periférico de crianças saudáveis em tempo único para compor o grupo controle. Inicialmente, as amostras foram submetidas a exames de rotina no Laboratório de Marcadores Celulares e depois encaminhadas ao Laboratório Multidisciplinar, onde receberam um código de projeto.

As amostras coletadas em tubo EDTA foram utilizadas para análise de linfócitos Treg, enquanto as coletadas em tubo separador de soro foram destinadas à quantificação de MVs-Treg e citocinas. O soro foi transferido para criotubos e armazenado a -80°C no biorrepositório. A partir das amostras armazenadas no biorrepositório, foram selecionadas amostras de SP (D0, D8, D15 e D35) de 20 pacientes; e amostras de SP (Tempo único) de 20 crianças sem leucemia para compor o grupo de controle, conforme o fluxo demonstrado na figura 8.

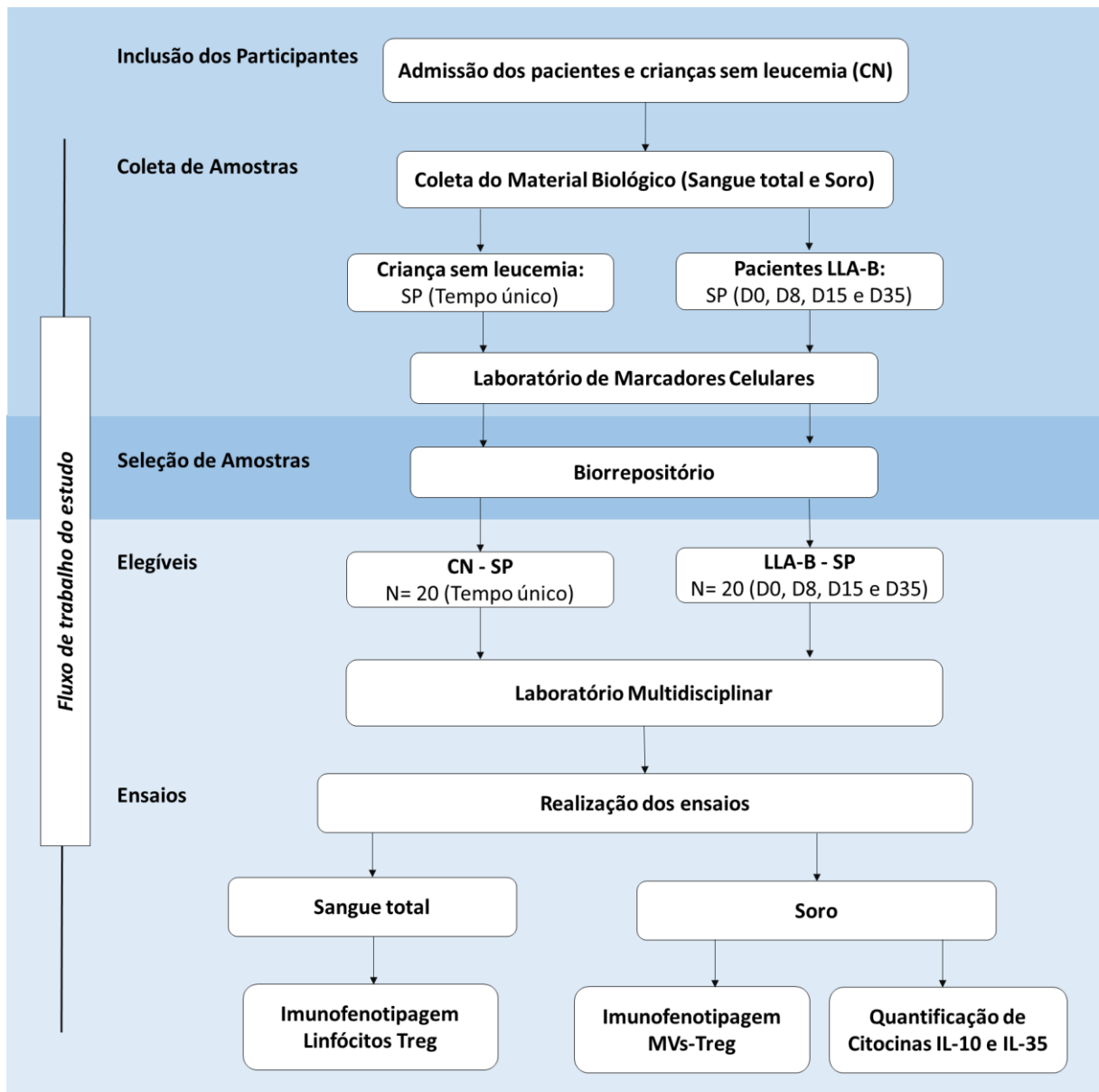


Figura 8. Fluxograma de trabalho do estudo. Demonstração detalhada das etapas de obtenção e seleção das amostras utilizadas para os respectivos ensaios.

5.6. Imunofenotipagem de linfócitos T regulatórios

As amostras dos pacientes e grupo controle foram utilizadas para a realização da imunofenotipagem por citometria de Fluxo, seguindo o protocolo (Anexo II). Os linfócitos Tregs foram marcados com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligam

aos *clusters of differentiation* (CDs), marcadores de superfície e intracelulares específicos expressos pelos linfócitos Tregs, conforme observado na Tabela 3.

Tabela 3. Painel para imunofenotipagem de linfócitos Treg.

Tubo	Parâmetros	FITC	PE	PerCP	APC
1	Controle (-)	-	-	-	-
2	Linfócitos Treg	CD25	CD4	CD3	Foxp3

Posteriormente, a aquisição das amostras foi realizada com Citômetro de Fluxo FACSCalibur da Fundação HEMOAM. Sendo realizado a identificação dos Linfócitos Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$) no programa FlowJo (v9.4) (Figura 9).

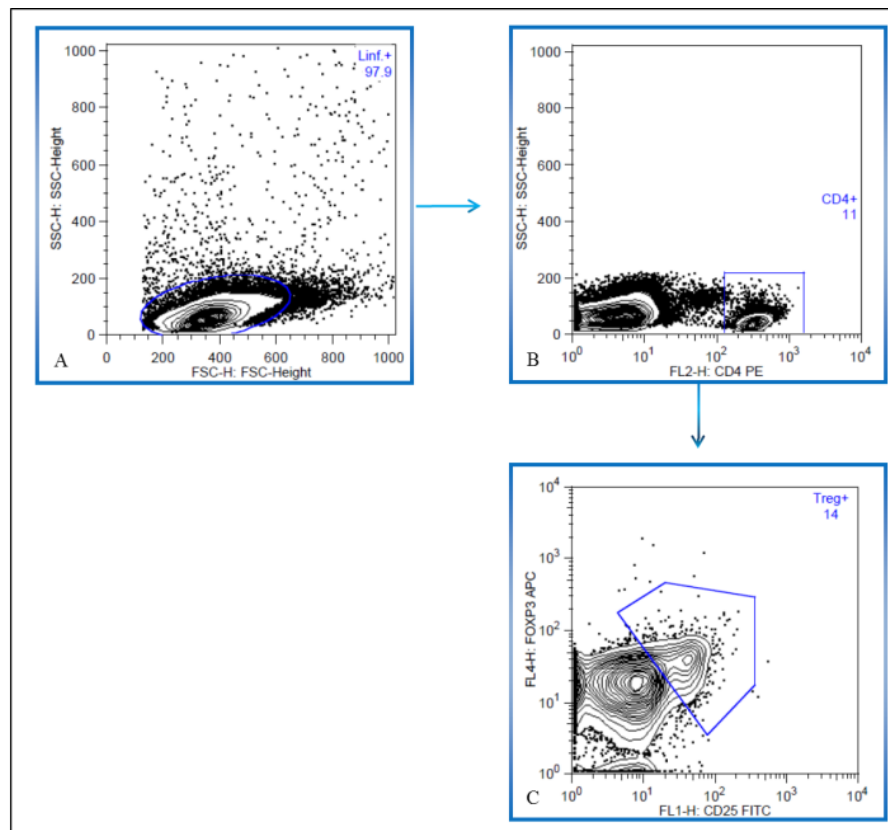


Figura 9. Identificação dos Linfócitos Treg ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$). Para a identificação dos linfócitos T regulatórios (Treg), iniciou-se a análise com um gráfico de SSC x FSC, seguido pela criação de uma "gate" na região correspondente aos linfócitos totais. Em seguida, foi gerado um gráfico de SSC x CD4 PE, seguido pela construção de um gráfico CD25 FITC x FoxP3 AF647 utilizando a população de LTCD4⁺. A população positiva para $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ foi selecionada, conferindo a caracterização precisa dos linfócitos Treg.

5.7. Imunofenotipagem de MVs-Treg

As amostras selecionadas foram utilizadas para a caracterização de MVs, realizada na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), seguindo o protocolo de purificação e imunofenotipagem de microvesículas (Anexo III) que foi padronizado de acordo com o protocolo do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) coordenado pelo Dr. Olindo Assis Martins Filho e Dra. Andréa Teixeira Carvalho.

Inicialmente, as amostras de soro derivadas de SP foram descongeladas em banho-maria a 36°C, e aliquotadas em tubos tipo eppendorfs que foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 minutos em Temperatura Ambiente (TA). Em paralelo, para cada anticorpo presente no painel, foi retirado uma alíquota de 30µl, a qual foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram tratadas com tampão citrato-heparina, e novamente centrifugadas a 15.000 rpm por 90 min a 15°C, por conseguinte o sobrenadante foi retirado, e então os pellets foram ressuspensos em 100 µl de tampão anexina, e distribuídos em tubos tipo eppendorfs contendo os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligam aos marcadores de superfície específicos presentes nas populações de MVs (Tabela 4). Posteriormente, as amostras foram incubadas por 30 minutos ao abrigo de luz em TA. Ao final da incubação, foram aplicados 300 µl de tampão de ligação de anexina.

Tabela 4. Painel para imunofenotipagem de MVs-Treg.

Tubo	MVs	FITC	PE	PerCP	APC
1	Controle (Anexina V)	Anex V	-	-	-
2	MVs-Treg	Anex V	CD152	CD4	CD25

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo CytoFLEX (Beckman Coulter), equipamento altamente sensível que permite a detecção e caracterização de MVs numa escala de 100-900nm através da utilização de microesferas sintéticas de calibração denominadas Gigamix. Estas microesferas possuem tamanhos definidos (100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm) e foram utilizadas como referência para caracterização de MVs (Figura 10).

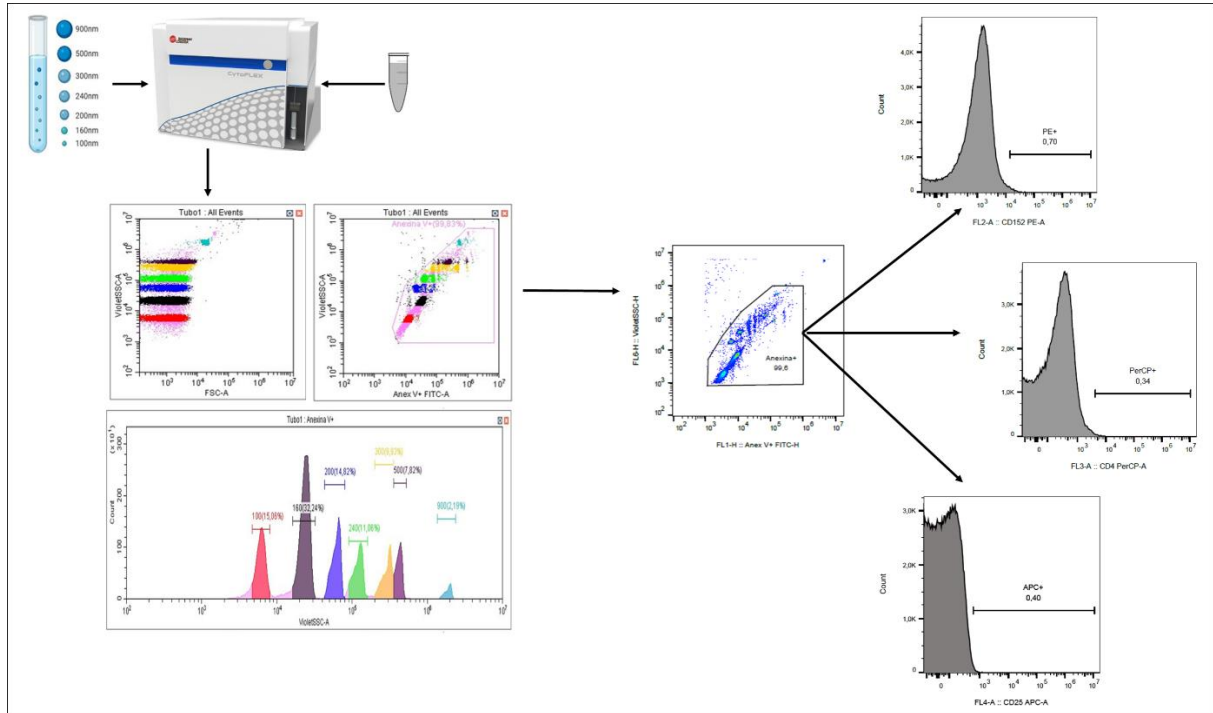


Figura 10. Identificação das MVs-Treg (Anex V⁺CD4⁺CD25⁺CD152⁺). Como estratégia para detecção das MVs-Tregs nas amostras estudadas, foi utilizado as Gigamix (microesferas de 100nm; 160nm; 200nm; 240nm; 300nm; 500nm; 900nm). Em seguida, definimos uma região nomeada MP Gate. Os seguintes histogramas e dotplots foram adicionados na região MP Gate, e partir desta região foram analisadas as MVs-Treg do estudo.

5.8. Quantificação de citocinas imunossupressoras

A quantificação das citocinas imunossupressoras foi realizada ao D0, D8, D15, D35 da quimioterapia de remissão para os pacientes com LLA-B e nas amostras do grupo controle. Para a dosagem da citocina TGF- β , foi utilizado o imunoenensaio com o Kit ProQuantum™ Human LAP/TGF β (Cat. N° A45730, Lot. 360114-002, marca Thermo Fisher Scientific). A quantificação da citocina IL-10 foi realizada através do método Cytometric Bead Array (CBA) com o kit CBA Human Th1/Th2/Th17 Cytokine (Cat. N° 560484, Lot. 5030932, BD® Biosciences, San Diego, CA, USA). Ambas as metodologias seguiram as diretrizes técnicas e protocolos descritos pelos fabricantes.

5.9. Obtenção dos dados clínicos e hematológicos

Os dados clínico-hematológicos foram coletados a partir de registros do laboratório de marcadores celulares e dos prontuários da Fundação HEMOAM, através do Setor de atendimento médico e estatístico (SAME), sistema iDoctor e setor de estatística. As variáveis coletadas, foram: idade, sexo, dados do hemograma e mielograma, avaliação de doença residual mensurável (DRM) e óbito durante a quimioterapia de remissão.

5.10. Análise descritiva e estatística

Os dados clínico-hematológicos dos pacientes foram apresentados em formas de tabelas, elaboradas com o programa Microsoft Excel. Os resultados obtidos na imunofenotipagem celular e de MVs foram analisados através do software FlowJo (v.10). Para elaboração das análises descritivas e estatísticas convencionais foi utilizado o software GraphPad Prism (v.8.0.2). Inicialmente foram realizados testes para verificar normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk. As comparações de valores entre dois grupos de dados foram realizadas com T student ou Mann-Whitney, enquanto para as comparações das variáveis com três ou mais grupos, foi realizada por meio dos testes ANOVA One-way ou Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Tukey ou Dunn's, para múltiplas comparações entre os grupos. Os níveis de significância estatística definidos em ambos os casos foram de $p < 0,05$. Além disso, foram construídas Redes Integrativas para demonstração das interações complexas entre os linfócitos Treg, MVs-Treg e citocinas avaliadas no estudo, utilizando o software Cytoscape (v.3.0.3). As correlações positivas e negativas são consideradas significativas quando $p < 0,05$. O índice de correlação (r) foi utilizado para categorizar a força de correlação como fraca ($r \leq 0,35$), moderada ($r \geq 0,36$ a $r \leq 0,67$) ou forte ($r \geq 0,68$).

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. CAPÍTULO I - Publicação do Artigo de revisão

A dual-role for IL-10: From leukemogenesis to the tumor progression in acute lymphoblastic leukemia. *Cytokine*. 2023 Nov; 171:156371.

DOI: 10.1016/j.cyto.2023.156371

Cytokine 171 (2023) 156371



A dual-role for IL-10: From leukemogenesis to the tumor progression in acute lymphoblastic leukemia

Flavio Souza Silva^{a,b,1}, Amanda Barros-Lima^{a,b,1}, Mateus Souza-Barros^{a,b}, Juniel Assis Crespo-Neto^b, Vitória Giovanna Rodrigues Santos^b, Daniele Sá Pereira^{a,b,c}, Fabíola Silva Alves-Hanna^{a,b}, Fábio Magalhães-Gama^{b,d}, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria^a, Allyson Guimarães Costa^{a,b,c,e,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brasil

^b Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brasil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brasil

^e Escola de Enfermagem de Manaus, UFAM, Manaus, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:

Childhood leukemia
Leukemogenesis
Tumor microenvironment
Immune-suppressive cytokine
Antitumor immunity

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common pediatric cancer in the world, and accounts for 25% of all childhood cancers among children under 15 years of age. Longitudinal studies have shown that children with ALL are born with a deregulated immune response that, together with postnatal environmental exposures, favor the onset of the disease. In this context, IL-10, a key cytokine in the regulation of the immune response, presents itself as a paradoxical mediator, initially influencing the development of ALL through the regulation of inflammatory processes and later on the progression of malignancy, with the increase of this molecule in the leukemia microenvironment. According to the literature, this cytokine plays a critical role in the natural history of the disease and plays an important role in two different though complex scenarios. Thus, in this review, we explore the dual role of IL-10 in ALL, and describe its biological characteristics, immunological mechanisms and genetics, as well as its impact on the leukemia microenvironment and its clinical implications.

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) represents the most common pediatric cancer in the world, though it can also affect individuals in adulthood, with peak incidence in patients between 2 and 5 years of age and after 50 years of age [1,2]. ALL is characterized by the abnormal proliferation of hematopoietic lymphoid precursors, and results in the accumulation of malignant clones in the bone marrow, with release into peripheral blood and extramedullary tissues [3]. During the blood cell formation process, some stimuli can promote genetic alterations, thus deregulating the hematopoietic microenvironment and facilitating

oncogenesis [4–6]. In addition, these mutations directly affect the expression of specific genes that are associated with cell survival and the emergence of ALL [7].

In this context, interleukin-10 (IL-10), a key cytokine in immune regulation, has been shown to play a dual role in the development and progression of ALL [8,9]. It was observed that the decrease in IL-10 levels in the neonatal period increases the susceptibility to the development of ALL [8,10]. On the other hand, high levels of IL-10 were observed at the time of diagnosis, which indicates an immunosuppressive effect on the leukemia microenvironment, thereby decreasing the specific cytotoxic response, and promoting chemoresistance and

Abbreviations: ALL, Acute lymphoblastic leukemia; B-ALL, B-cell acute lymphoblastic leukemia; T-ALL, T-cell acute lymphoblastic leukemia; AML, Acute myeloid leukemia; IL-10, Interleukin-10; TGF- β , Transforming growth factor beta; CTL, Cytotoxic T lymphocyte; Treg, Regulatory T-cell; NK, Natural killer; MRD, Measurable residual disease; HSCs, Hematopoietic stem cells; IL-10R, Interleukin-10 receptor; IL-10R1, Interleukin-10 receptor 1; IL-10R2, Interleukin-10 receptor 2; IL-1 β , Interleukin-1 beta; IL-1 α , Interleukin-1 alpha; IL-6, Interleukin-6; IL-12, Interleukin-12; IL-13, Interleukin-13; GM-CSF, Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL-35, Interleukin-35.

* Corresponding author at: EEM/UFAM, Rua Terezina, 495, Adrianópolis, Manaus, AM CEP 69057-070, Brazil.

E-mail addresses: allyson.gui.costa@gmail.com, allyson@ufam.edu.br (A.G. Costa).

¹ These authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156371>

Received 28 June 2023; Received in revised form 10 September 2023; Accepted 12 September 2023

1043-4666/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

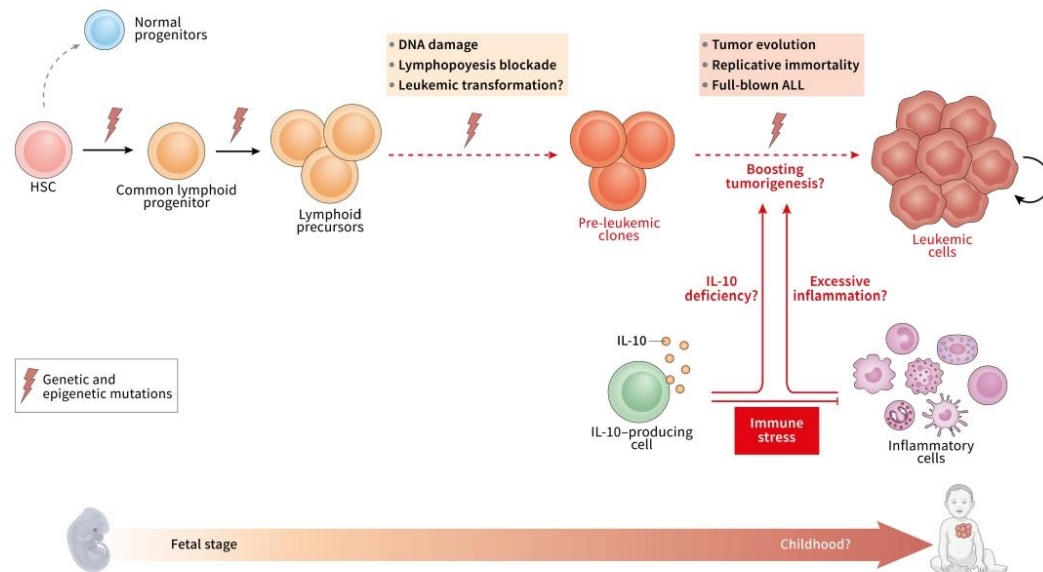


Fig. 1. A model for the role of IL-10 in leukemogenesis. The figure illustrates the possible contribution of the IL-10 cytokine in ALL development, highlighting its influence on the regulation of inflammation and its pro-tumorigenic potential. This cytokine is inserted in a unified model initially proposed to explain how leukemia emerges and evolves. During hematopoietic development, stem cells are tightly regulated towards commitment to lymphoid lineage within a multistep mechanism. During this process, accidental mutations, generally acquired in the fetal stage, induce early cell oncogenic transformation, generating pre-leukemic clones. Given certain conditions (such as immune stress), these pre-leukemic clones will acquire secondary mutations, giving rise to leukemic cells that lead to full-blown ALL. The participation of IL-10 in these events is still a subject of research and speculation. In childhood, the exposure to immune stressors (infections, for example) leads to robust inflammatory responses and IL-10 plays a key role in adjusting this by promoting tolerance. An IL-10 deficiency after birth seemingly gives rise to excessive inflammation, thus promoting tumor development; therefore suggesting that the absence of IL-10 may be a factor driving leukemogenesis in the context of B-ALL. B-ALL - B cell acute lymphoblastic leukemia; HSC - hematopoietic stem cells; IL - interleukin.

resistance to apoptosis, in addition to favoring cell survival and organ infiltration. [11–14].

In fact, studies indicate that IL-10 plays a paradoxical role in leukemia, since it acts in two distinct scenarios: leukemogenesis and in the evolution of already established leukemia. However, the implications of IL-10 in the different stages of ALL are still important objects of study and require further investigation. Therefore, in this review, we explore the current panorama of knowledge regarding IL-10 and its dual role in the context of ALL, and describe the main aspects related to IL-10, including its biological characteristics, immunological and genetic mechanisms, their impact on the leukemia microenvironment, as well as their clinical implications and highlight the questions that are still to be answered in this field of research.

2. Biology of interleukin-10

IL-10 is a key regulatory molecule for suppressing immune responses and acts by blocking the production and function of a variety of cytokines. It is produced by several immune cells, including dendritic cells, macrophages, neutrophils, natural killer (NK) cells and different subsets of T cells and B cells, which are, in addition to producers, targets of its biological effects [15–20]. Due to its pleiotropic function in various cell types, IL-10 has different reported roles during the development and progression of cancer [21–23]. The pro-tumorigenic effect of IL-10 is mediated by diminished anti-tumour immunity, which contributes positively to tumor growth and promotion. Nonetheless, it is believed that IL-10 may exert an anticancer effect by reducing tumor-promoting inflammation and stimulating CD8⁺ T cells in the tumor

microenvironment [23,24].

IL-10 has a homodimeric structure that is composed of two non-covalently linked monomers. Inside each monomer, there are two disulfide bridges (C30-C126 and C80-C132) that are essential for maintaining the structure and biological activity of this cytokine [16,19]. The action of IL-10 occurs via a transmembrane receptor complex, which is composed of IL-10R1 and IL-10R2, and is capable of regulating immune responses. In some cell types, such as monocytes or macrophages, for example, IL-10 decreases the production of inflammatory mediators and inhibits antigen presentation, although it increases their uptake [16]. Furthermore, the special physiological relevance of this cytokine lies in its preventing and limiting specific, exacerbated and nonspecific immune reactions and, consequently, tissue damage [16,25].

Several factors have been described and may be associated with irregular expression of IL-10, which affects immune homeostasis and increases the risk of cancer [26,27]. It has been described that single nucleotide variants (SNVs) in the promoter region of the *IL10* gene promote increased IL-10 expression, which are significantly correlated with the susceptibility and pathogenesis of childhood ALL [27,28]. The *IL10* gene is located on chromosome 1q31-32 and encodes 178 amino acids, with the promoter region presenting many SNVs that tend to alter the transcription of the gene and, consequently, the production of the molecule [29]. The IL-10, -1082 A > G genotype, for example, demonstrates an increased risk of B-ALL and T-ALL [29]. In addition, plasma levels of IL-10, associated with the presence of polymorphisms in the *IL10* gene, may also influence the response to treatment in patients with ALL [30].

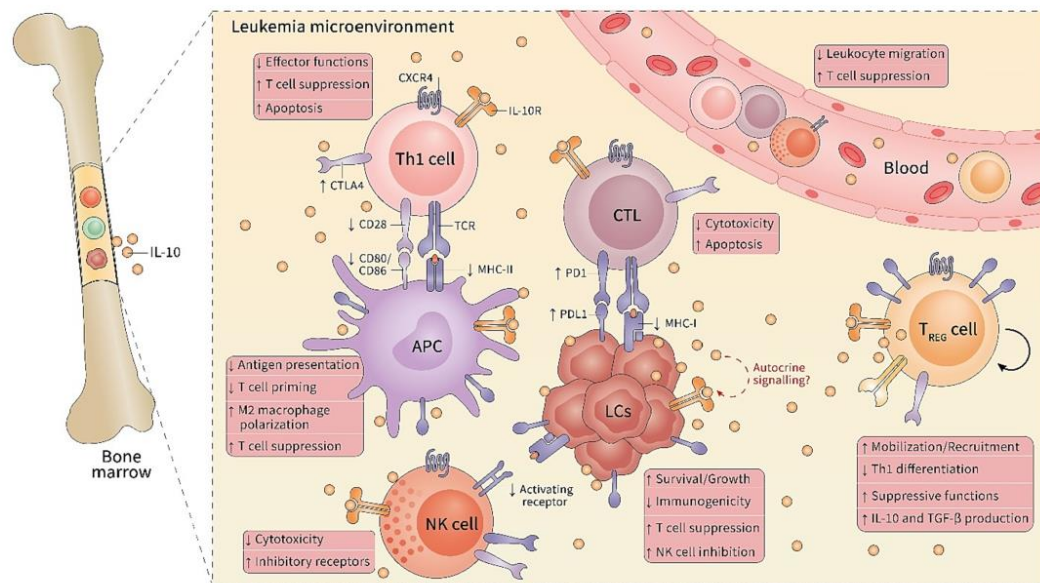


Fig. 2. IL-10 effects in the leukemia microenvironment. Interleukin (IL)-10-induced signaling has been shown to be important for the progression of full-blown leukemia, and occurs in several immune cells such as Th1 cells, CTLs, APCs, Treg cells, and NK cells within the leukemic microenvironment. This cytokine plays an important role in the proliferation of leukemic cells while decreasing cytotoxic responses. This is largely mediated through IL-10R autocrine signaling, which supports the survival and immune escape of leukemic cells (MHC-I downregulation, for example), as well as reduces the APC ability for priming T cells via downregulation of stimulatory molecules (MHC-II and CD80/CD86, for example). In addition, the antitumor responses are strongly reduced by the upregulation of immune checkpoints (such as PD1-PDL1 and CTLA4) that inhibit T cell and NK cell effector functions, leading to apoptosis as a consequence of the high presence of IL-10, which is strongly produced by Treg cells and the leukemic cells themselves. Key surface molecules regulated by IL-10 and the interacting ligands and receptors are shown. The antitumor or protumor biological effects of this signaling in each cell are summarized in boxes (green and red, respectively). APC - antigen-presenting cell; CTL - cytotoxic T lymphocytes; CTLA4 - cytotoxic T lymphocyte antigen 4; CXCR4 - CXC-chemokine receptor 4; IL-10R - interleukin-10 receptor; LCs - leukemic cells; MHC - major histocompatibility complex; NK - natural killer; PD1 - programmed cell death 1; PDL1 - programmed cell death 1 ligand 1; TCR- T cell receptor; TGF β - transforming growth factor beta; Th1 - T helper 1; Treg- regulatory T cells.

3. The role of IL-10 in leukemogenesis

In the early 1980 s, the genetic foundations for the development of neoplasms were established, starting with the careful characterization of structural chromosomal abnormalities. In addition, the discovery of genetic anomalies present in the tumor genome allowed the identification of a range of genes that mutate during the hematopoiesis process [31]. The hematopoietic cycle involves cell development and maturation in a hierarchical fashion from the hematopoietic stem cell (HSC), and is characterized by its capacity for self-renewal and differentiation into specialized cells in the blood tissue and the immune system [32].

As cell production and maturation occur, the differentiation potential of progenitor cells is restricted until a single mature cell type is generated [32]. During this process, several external events can contribute to the occurrence of genetic mutations that affect the homeostasis of the hematopoietic microenvironment, thus contributing to oncogenesis [33]. These genetic mutations can activate cell survival pathways and interfere with the regulation of growth and differentiation of normal blood cell progenitors, which favors the oncogenic transformation that sustains the main characteristics of the neoplastic process [7,33].

In fact, the expression and/or activation of specific genes is associated with the pathogenesis of hematological cancers, especially acute leukemias. However, in addition to intrinsic changes, one of the key events for the development of ALL is the remodeling of the hematopoietic microenvironment by leukemic cells. This process can occur as a

result of the release of a range of immune mediators, including cytokines, chemokines and growth factors, which promote cell activation, survival and proliferation [34–38]. In addition, the immunological mechanisms involved in triggering ALL remain poorly understood.

Mel Greaves tries to explain the process of leukemogenesis using the hypothesis of late infection, which is divided into two critical stages: first, an intrauterine event and, second, a postnatal event that would promote the development of ALL [39]. This hypothesis is based on exposure time and stimulation of the immune system, with a genetic mutation, originating in the womb, that would produce a pre-leukemic clone. Subsequently, after birth, natural microbial exposure during early childhood would lead to deficient and dysregulated immune responses, thereby promoting a new mutation and resulting in the development of cancer [39,40].

Interestingly, a study carried out by Chang et al. [8] suggests that newborns who develop ALL during early childhood may have a constitutively lower expression of IL-10 at birth. This low production results in a propensity to react to normal infections in a hypersensitive manner, especially during the first year of life, which may induce a progression from pre-leukemic clones via infection-related inflammatory processes (Fig. 1). Based on these findings, IL-10 has been the subject of studies that seek to understand its possible impact on the leukemogenesis process in ALL, since its levels are systematically regulated to avoid conditions associated with its decrease or increase [19].

It is notable that the production of IL-10 by cells in the tumor microenvironment usually presents a pro-tumorigenic rather than anti-

tumor activity, based on the reduction of immune surveillance, stimulation of angiogenesis, in addition to contributing to proliferation and metastatic dissemination, and acting in this way as a strong opponent of the immune response against cancer [9,21,23,41]. In contrast, its decrease was associated with transformation of B cell precursors in the bone marrow microenvironment [30,42–44]. Studies have shown that the IL-10 deficit, associated with high levels of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-13 and GM-CSF, indirectly impairs lymphopoiesis, thereby increasing the promotion of damage in the DNA of B cells [43].

4. The role of IL-10 in leukemia

Overexpression of IL-10 or its receptor (IL-10R) has been observed in several hematologic malignancies, including leukemia [45–48]. IL-10 has the ability to promote survival and immune evasion of leukemia cells while decreasing anti-tumor responses in the leukemia microenvironment (Fig. 2) [49–54]. In this context, it is observed *in vitro* that, in chronic lymphocytic leukemia (CLL), the capacity for survival and proliferation of leukemic B cells depends on the production and autocrine signaling of IL-10, which suggests that it acts as a growth factor for the cancer cells themselves [49]. In addition, an IL-10-induced upregulation of the IL-2 receptor was observed, which acts synergistically to promote its activation [54]. Moreover, the presence of IL-10 supports proliferation, survival and even resistance to chemotherapy, and may maintain the homeostasis of leukemic stem cells in the bone marrow microenvironment, mainly via the action of regulatory T cells (Treg) [55,56].

There are reports of antitumor effects of IL-10 *in vitro*, which apparently depend on the type of leukemia, the microenvironment and even the patient's biological factors [49,50,54,57–64]. Studies have also shown that *in vitro* treatment of leukemic cells of myeloid lineage (myeloblasts) with IL-10 reduced tumor expansion and inhibited the production of pro-tumor cytokines such as IL-1 β and IL-6 [60–62,65]. Furthermore, it was observed that B-chronic lymphocytic leukemia cells supplemented with IL-10 *in vitro* resulted in dose-dependent cell death [63]. In acute myeloid leukemia (AML), the presence of elevated concentrations of IL-10 has been reported, with higher survival rates and better responses to chemotherapy [47]. These findings suggest that IL-10 is involved in the pathophysiological process of the disease, although the role of this interleukin in leukemogenesis remains to be described [46,66]. Moreover, the dual-role of IL-10 in leukemogenesis can be justified by the fact that this cytokine has a variety of functions that depend considerably on the cellular and molecular microenvironment.

In this context, elevated levels of IL-10 exert protumoral effects, since this cytokine promotes the growth and proliferation of tumor cells through the activation of transcription factors such as STAT3, inhibiting apoptosis and favoring escape from immunosurveillance. Furthermore, increased IL-10 expression in primary cells has been described as an indicator of poor prognosis and a predictor of metastatic development [67,68]. Alternatively, IL-10 also presents antitumor activities through the activation and recruitment of cytotoxic CD8⁺ T cells and NK cells in the tumor microenvironment, stimulating lymphocyte and antibody-dependent immune memory and inhibiting the inflammatory axis of macrophages. This further promotes a downregulation of the synthesis of pro-angiogenic factors and reduces the release of pro-inflammatory cytokines that aid tumor growth, survival and invasion [68,69].

It is worth highlighting that combinations of cytokines, either with each other or with chemokines or growth factors, produce more pronounced effects than any single molecule, which may explain the lack of reports of these antitumor effects in *in vivo* models [70,71]. Another explanation for these conflicting roles is that IL-10 may play a dual role in tumorigenesis and cancer development, with the initiation of the process being affected by this cytokine, which may act predominantly to stimulate cytotoxic T lymphocytes (CTL) and NK-mediated cancer cell

death. However, if cancer cells survive and re-wire themselves to express the IL-10R, IL-10 production in the tumor microenvironment may primarily act as a potent cancer promoter [21].

In the context of childhood ALL, IL-10 appears to be strongly associated with leukemic progression. Several findings have demonstrated elevated levels of IL-10 at the time of diagnosis, which decreased after induction therapy and apparently reflected the patients' leukemic burden, and may be related to a worse clinical outcome in all disease subtypes [12,72–75]. Moreover, patients who tested positive for measurable residual disease (MRD) exhibited higher levels of IL-10 in the bone marrow compartment, whereas lower levels of this molecule were observed in patients with negative MRD at the end of remission induction therapy [76].

Ultimately, production of IL-10 is recognized as an immune evasion mechanism adopted by leukemic cells to reduce their immunogenicity and escape immunosurveillance [36,40]. This is evidenced by extensive research that shows that leukemia-reactive T cells often fail to be activated, undergoing anergy or even apoptosis during the initial presentation of tumor antigens [34,35]. The biological explanation is that leukemia cells often produce significant levels of IL-10, which downregulates the ability of antigen-presenting cells to initiate cytotoxic T cell-mediated responses [36–39]. Therefore, currently available data suggest that IL-10 may play an important role in immune evasion and disease progression in ALL.

5. IL-10 and its clinical applications

Cytokine-based immunotherapy has so far been a promising area of investigation, though only IFN- α and IL-2 cytokines have received FDA approval for anticancer therapy [77]. Several problems persist with cytokine-based therapies, which are broadly categorized into high toxicity and low efficacy. Vast pleiotropism and redundancy in signaling, as well as dual immunosuppressive and immunostimulatory functions also contribute to suboptimal safety and efficacy [24,78]. However, cytokine-based therapies continue to be an important field of investigation, especially considering the anti-inflammatory and immunostimulatory functions of certain cytokines, such as IL-10.

In cancer, early research aimed to neutralize IL-10 to mediate tumor rejection through T-cell stimulation. However, this approach has been limited by severe and potentially fatal inflammatory toxicities [23]. Current research has sought to explore its immunostimulatory potential, focusing on increasing local levels of IL-10 in the tumor microenvironment to mediate tumor regression, since stimulation of IL-10-dependent CD8⁺ T cells has been shown to induce a strong tumor-specific immunity [79]. Administration directly to the tumor site has been shown to reduce toxicity and increase the efficacy of immunotherapy, decreasing off-target systemic proinflammatory effects and increasing local drug concentrations, respectively [80,81].

In vivo, the antitumor mechanisms of IL-10 conjugated to polyethylene glycol (pegylation) have been well documented and shown to work synergistically with anti-PD-1 therapy [79,82,83]. However, a phase Ib trial failed to demonstrate additional benefits when using the combination of IL-10 and pembrolizumab or nivolumab [84]. Studies evaluating the binding to IL-10R also brought about important discoveries regarding the immunostimulatory potential of IL-10. Gorby et al. [85] developed an IL-10 construct with a potent immunomodulatory effect, which targeted the β subunit of the receptor (IL-10R β) with the highest affinity. These data indicate that the relative affinity and avidity of IL-10 to receptor subunits may provide an insight into the lack of efficacy in certain settings.

Another possible therapeutic approach would be to explore the immunosuppressive potential, which could occur by blocking IL-10, with the aim of changing the immunological landscape, sequestering the immunosuppressive network and allowing the establishment of specific and more effective cytotoxic responses against leukemic cells. Reports investigating this therapeutic strategy have shown promising

Table 1
Dual-role of IL-10 in leukemogenesis and tumor progression of acute lymphoblastic leukemia.

IL-10 behavior	Population	Country	Findings and clinical implications	References
Decrease	Newborns	USA	Low levels of IL-10 in samples of neonatal blood spots indicate a dysregulation in the immune response, conferring a greater susceptibility to the development of ALL	[8]
Below the detection level	Newborns	Denmark	IL-10 levels were below the detection threshold in dried blood-spot samples from neonates	[10]
Increase	Pediatric patients	Brazil	High levels of IL-10 in bone-marrow samples from pediatric patients at the time of diagnosis	[12]
Increase	Pediatric patients	China	High levels of IL-10 in peripheral blood samples from pediatric patients at the time of diagnosis	[13,14]
Increase	Pediatric patients	China	Pediatric patients showed a trend towards increased serum IL-10 levels	[28]
Increase	Pediatric patients	Poland	High levels of IL-10 in peripheral blood samples from pediatric patients at the time of diagnosis	[74]
Increase	Pediatric patients	Brazil	MRD-positive patients at the end of induction therapy showed a trend towards increased levels of IL-10 in the bone marrow samples	[76]

ALL, Acute lymphoblastic leukemia; USA, United States of America; MRD, Measurable residual disease.

results in enhancing antitumor responses mediated by CD8⁺ T cells and NK cells [83,86–88]. However, in order to provide safe and effective therapeutic strategies, further studies are needed to fully evaluate the effects resulting from the modulation or inhibition of IL-10.

6. Conclusions and perspectives

To our knowledge, few works have investigated the dual role of IL-10 in ALL and its impact on the evolution of the disease and, especially, on its development from the first stimulus. Patients who develop ALL have a deficit in the production of IL-10 at birth, with increased levels of this molecule on diagnosis, mainly in the medullary compartment, which show a clear decline at the end of remission chemotherapy (Table 1) [89–92]. This behavior leads us to believe that this cytokine actively participates in the development and maintenance of the disease since, with the elimination of leukemic cells, the concentration of the molecule presents a significant decrease and the levels of pro-inflammatory and/or cytotoxic mediators are reestablished [12,76,93]. Furthermore, it is known that elevated levels of IL-10 in the tumor microenvironment are associated with a worse prognosis in a variety of cancers [94–98].

Similarly, the cytokine TGF- β promotes a highly immunosuppressive tumor environment, with shared properties and mechanisms of action, decreasing Th1, Th2 and Th17 effector phenotypes, and maintaining the

immunosuppressive phenotype of T cells [99,100]. In addition, the recently discovered cytokine IL-35 has also been shown to exert important effects on the regulation of T cells, converting them into IL-35-producing immunosuppressive T cells through inhibition of Th1 and Th17 effector profiles [101,102]. These cytokines are secreted by diverse immune populations, including cells of the innate and adaptive immune system and, in certain scenarios, by tumor cells, which ultimately drive the immunosuppressive fate of the tumor niche and regulate the growth and proliferative capacity of tumor cells [103–105].

A study carried out in pediatric patients with ALL demonstrated a significant decrease in serum levels of TGF- β [14]. In contrast, high levels of IL-35 were observed, which was associated with low white blood cell and platelet counts, thereby indicating an influence on the prognosis of ALL [106]. Likewise, adult patients with AML also exhibited an increase in IL-35 levels in bone marrow and peripheral blood, which was significantly correlated with the clinical stages of leukemia and acts as a diagnostic and prognostic indicator [46,107–109]. In addition, IL-35 has also been shown to promote immune escape from leukemic blasts, thus increasing proliferation and reducing apoptosis of these tumor cells, and suggests the involvement of IL-35 in the pathogenesis of AML [107].

In conclusion, these data highlight that IL-10 plays an intriguing and paradoxical role in the development and progression of ALL. Based on

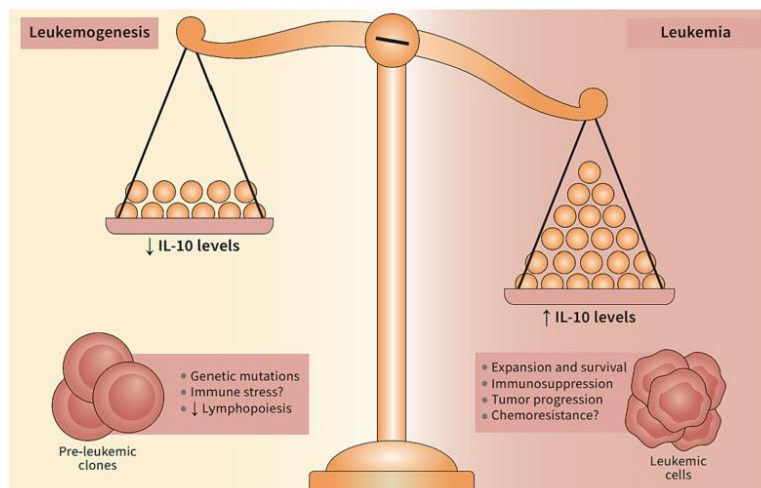


Fig. 3. The dual role of IL-10 in leukemogenesis and leukemia. Changes in IL-10 levels have a deleterious effect. Low levels of this cytokine promote hyperactive immune responses, leading to a state of immunological stress characterized by excessive inflammation that determines tumor development, i.e., leukemogenesis. In this process, acquired genetic mutations drive the emergence of pre-leukemic clones that impair normal lymphopoiesis. On the other hand, increased levels of IL-10 have been shown to be a crucial factor for the survival and proliferation of leukemic cells, promoting the inhibition of antitumor responses, increasing immunosuppression and possibly aiding in chemoresistance. Thus, in leukemia, the high presence of this cytokine leads to tumor progression.

this imbalance, in which, on one side of the scale decreased IL-10 levels are associated with increased susceptibility to ALL; and on the other, elevated levels in the leukemia microenvironment are related to disease progression (Fig. 3). Interestingly, the role of IL-10 in cancer biology, specifically in ALL, remains little explored. In this sense, a better understanding of the impact of IL-10, in addition to other immunoregulatory cytokines, may have important implications for the development of new therapeutic strategies for this disease. Lastly, we suggest that future studies are needed to elucidate the mechanisms by which IL-10 can influence the natural history of ALL in order to further clarify the double role of this cytokine.

Author contributions

ABL, FSS, FM-G, JAQA and AGC were responsible for the initial conception, project, and writing of this manuscript. MS-B, FSA-H, JACN, VGRS and GAVS collected, analyzed, and reviewed the data. MS-B, FSS and FM-G created the illustrations. ABL, FSS, FM-G, FSA-H, JAQA and AGC supervised the project development, interpreted the data and reviewed the manuscript. All authors read, discussed the general outline of the article together and approved the final version of the manuscript.

Funding

This work was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) (Pró-Estado Program [#002/2008, #007/2018 and #005/2019], and POSGRAD Program [#005/2022 and #002/2023]), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (PDPG-CONSOLIDACAO-3-4 Program - #88887.707248/2022-00). FSS, ABL, MS-B, FSA-H and FM-G, have fellowships from FAPEAM, CAPES and CNPq (MSc and PhD students). JACN and VGRS have fellowships from FAPEAM (Scientific Initiation students). AGC is level 2 research fellow from CNPq. The funders had no role in study design and decision to publish, or preparation of the manuscript.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgments

We would like to thank our collaborators at the HEMOAM Foundation, especially the Amazon Group for Interdisciplinary Health Research - Amazon InterScience; the pediatric patients with ALL, as well as their parents or legal guardians; and the researchers of the Post-graduate Program in Basic and Applied Immunology (UFAM) and of the Post-graduate Program in Sciences Applied to Hematology (UEA).

References

- Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. [Internet]. 2005 Mar; 14(1):53–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x>.
- Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2006 Jan 12;354(2):166–178. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMr052603>.
- Imai K. Acute lymphoblastic leukemia: pathophysiology and current therapy. *Rinsho. Ketsueki*. [Internet]. 2017 [cited 2023 Mar 30];58(5):460–470. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28592761/>.
- Raaijmakers MHGP. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica* [Internet]. 2011 Jul 1; 96(7):1041–1048. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.028035>.
- Berit B, Tynes RB. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* [Internet]. 2007 Jun;1775(2):283–297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S03044119X0700029>.
- Fröbel J, Landspersky T, Percin G, Schreck C, Rahmig S, Ori A, et al. The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem. *Front. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 2021 Jul 22;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.705410/full>.
- Look AT. Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science (80-)*. [Internet]. 1997 Nov 7;278(5340):1059–1064. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.278.5340.1059>.
- Chang JS, Zhou M, Buffer PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. Profound Deficit of IL10 at Birth in Children Who Develop Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2022 Jun 16];20(8):1736–1740. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653647/>.
- Jiménez-Morales S, Aranda-Urbe IS, Pérez-Amado CJ, Ramírez-Bello J, Hidalgo-Miranda A. Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front. Immunol.* [Internet]. 2021 Nov 18 [cited 2023 Jan 7];12:4787. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.737340/full>.
- Soegaard SH, Roostgaard K, Skogstrand K, Wiemels JL, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Neonatal Inflammatory Markers Are Associated with Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2023 Mar 30];78(18):5458–5463. Available from: <https://pmc/articles/PMC7605595/>.
- K. Bhattacharya, S. Chandra, C. Mandal, Critical stoichiometric ratio of CD4 + CD25 + FoxP3 + regulatory T cells and CD4 + CD25 – responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia, *Immunology* [Internet] 142 (1) (2014 May) 124–139, <https://doi.org/10.1111/imm.12237>.
- F. Magalhães-Gama, M.W.A. Kerr, N.D. de Araújo, H.N.S. Ibiapina, J.C.F. Neves, F.S.A. Hanna, et al., Imbalance of chemokines and cytokines in the bone marrow microenvironment of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia, *J. Oncol.* [Internet] 22 (2021) (2021 Jul) 1–9. <https://www.hindawi.com/journal/2021/5530650/>.
- Shuxu Du, Yongrui Jia, Hong Tang, Yangling Sun, Wanzhui Wu, Liming Sun JD. Immune regulation of hydrogen sulfide in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chin. Med. J. (Engl)*. [Internet]. 2014;127(21):3695–3699. Available from: <https://mednexus.org/doi/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131106>.
- Q. Dai, G. Zhang, Y. Wang, L. Ye, R. Shi, L. Peng, et al., Cytokine network imbalance in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia at diagnosis, *Cytokine* 169 (2023 Sep), 156267.
- Liu P, Song J, Su H, Li L, Lu N, Yang R, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 23;8(7):e69547. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069547>.
- M. Saraiva, A. O'Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* [Internet] 10 (3) (2010 Mar 15) 170–181. <http://www.nature.com/articles/nri2711>.
- E.A. El-maadawy, M.F. Elshah, R.M. Bakry, M.M. Mousa, S.H. El-Naby, R. M. Tahaat, Regulation of CD4+CD25+FOXP3+ cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): Implication of cytokines and miRNAs, *Mol. Immunol.* 1 (124) (2020 Aug) 1–8.
- W. Ouyang, A. O'Garra, IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation, *Immunity* [Internet] 50 (4) (2019 Apr) 871–891. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761319301372>.
- Saraiva M, Saraiva M, Vieira P, Vieira P, Vieira P, O'Garra A, et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 [Internet]. *J. Exp. Med.* 2020 Jan 6 [cited 2023 Mar 18];217(1). Available from: <https://rupress.org/jem/article/217/1/e20190418/132577/Biology-and-therapeutic-potential-of-interleukin>.
- R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, et al., Biology of interleukin-10, *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet] 21 (5) (2010 Oct) 331–344. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610110000651>.
- Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* [Internet]. 2015 Oct 28 [cited 2023 Mar 18];367(2):103–107. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515004516>.
- Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 Elicits IFN-γ-Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2023 Mar 18];20(6):781–796. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610811004090/fulltext>.
- Oh M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. *Cancer Immunol. Res.* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2023 Mar 18];2(3):194–199. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerimmunolres/article/2/3/194/467083/IL-10-Master-Switch-from-Tumor-Promoting>.
- RALLIS KS, CORRIGAN AE, DADAH H, GEORGE AM, KESHWARA SM, SIDERIS M, et al. Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. *Anticancer Res.* [Internet]. 2021 Jul;41(7):3247–3252. Available from: <http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.15110>.

- [25] R. Sabat, IL-10 family of cytokines, *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet] 21 (5) (2010 Oct) 315–324. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610110000791>.
- [26] Lo WJ, Chang WS, Hsu HF, Ji HX, Hsiao CL, Tsai CW, et al. Significant Association of Interleukin-10 Polymorphisms with Childhood Leukemia Susceptibility in Taiwan. *In Vivo.* 2016;30(3):265–269.
- [27] C.H. Hiroki, M.K. Amarante, D.L. Petenuci, A.Y. Sakaguchi, F.C. Trigo, M.A. E. Watanabe, et al., IL-10 gene polymorphism and influence of chemotherapy on cytokine plasma levels in childhood acute lymphoblastic leukemia patients IL-10 polymorphism and plasma levels in leukemia patients, *Blood Cells Mol. Dis.* 55 (2) (2015 Aug 1) 168–172.
- [28] R.-T. Liu, X.-X. Wang, J.-R. Sun, N. Gao, W.-Z. Yu, Correlations of IL-6 and IL-10 gene polymorphisms with childhood acute lymphoblastic leukemia, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* [Internet] 24 (15) (2020 Aug) 8048–8056. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32767331>.
- [29] Abdalhabib EK, Alzahrani B, Saboor M, Hamza A, Elfaki EM, Alanazi F, et al. IL-10 rs1800896 Polymorphism: A Risk Factor for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmacogenomics Pers. Med.* [Internet]. 2022 Sep; Volume 15:809–815. Available from: <https://www.dovepress.com/il-10-rs1800896-polymorphism-a-risk-factor-for-adult-acute-lymphoblast-peer-reviewed-fulltext-article-PGPM>.
- [30] Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 Mar 29];16 (8):1437–1442. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12145682/>.
- [31] Bernard O. Mécanismes de la leucémogénèse. *Bull. Cancer* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2023 Mar 29];97(11):1381–1388. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000745511530758X>.
- [32] Nemkov T, D'Alessandro A, Reisz JA. Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment [Internet]. *Cancer Rep.* 2019 Apr 7;2(2):e1139. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cnr.21139>.
- [33] C. Tomasetti, L. Li, B. Vogelstein, Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention, *Science* (80-) [Internet] 355 (6331) (2017 Mar 24) 1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>.
- [34] Dander E, Palmi C, D'Amico G, Cazzaniga G. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Over Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Jun 5];22(9). Available from: <https://pmc/articles/PMC8122951/>.
- [35] Duarte D, Hawkins ED, Lo Celso C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood* [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2023 Jun 5];131 (14):1507–1511. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/131/14/1507/36671/The-interplay-of-leukemia-cells-and-the-bone>.
- [36] M.T. Witkowski, I. Dolgalev, N.A. Eversen, C. Ma, T. Chambers, K.G. Roberts, et al., Extensive remodeling of the immune microenvironment in B cell acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Cell* [Internet] 37 (6) (2020 Jun) 867–882.e12. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610820302142>.
- [37] H. Cheng, G. Sun, T. Cheng, Hematopoiesis and microenvironment in hematological malignancies, *Cell Regen.* [Internet] 7 (1) (2018 Sep) 22–26. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2045976918300099>.
- [38] Kim JA, Shim JS, Lee GY, Yim HW, Kim TM, Kim M, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Jun 5];75(11):2222–2231. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/75/11/2222/603942/Microenvironmental-Remodeling-as-a-Parameter-and>.
- [39] M. Greaves, A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Nat. Rev. Cancer* [Internet] 18 (8) (2018 Aug 21) 471–484. <http://www.nature.com/articles/s41568-018-0015-6>.
- [40] Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J. Pediatr.* [Internet]. 2017;60(5):129. Available from: <http://www.e-cp.org/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2017.60.5.129>.
- [41] Hopken UE, Rehm A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends in Cancer* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Jun 27];5(6):351–364. Available from: <http://www.cell.com/article/S2405803319300755/fulltext>.
- [42] K.W. Moore, M.R. de Waal, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* [Internet] 19 (1) (2001 Apr) 683–765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>.
- [43] B.A. Fitch, M. Zhou, J. Situ, S. Surianarayana, M.Q. Reeves, M.L. Hermiston, et al., Decreased IL-10 accelerates B-cell leukemia/lymphoma in a mouse model of pediatric lymphoid leukemia, *Blood Adv.* 6 (3) (2022) 854–865.
- [44] L. Zhu, T. Shi, C. Zhong, Y. Wang, M. Chang, X. Liu, IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterol. Res.* [Internet] 10 (2) (2017) 65–69. <http://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/740>.
- [45] N. Chen, Y. Xu, J. Mou, Q. Rao, H. Xing, Z. Tian, et al., Targeting of IL-10R on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells, *Blood Cancer J.* 11 (8) (2021 Aug) 1–11.
- [46] WU H, LI P, SHAO N, MA J, JI M, SUN X, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- β in acute myeloid leukemia. *Oncol. Lett.* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2023 Mar 18];3(5):1119–1123. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.614/abstract>.
- [47] B. Sanchez-Correa, J.M. Bergua, C. Campos, I. Gayoso, M.J. Arcos, H. Bañas, 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* [Internet] 61 (3) (2013 Mar) 885–891. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613000021>.
- [48] Sun Y xin, Kong H li, Liu C fang, Yu S, Tian T, Ma D xin, et al. The imbalanced profile and clinical significance of T helper associated cytokines in bone marrow microenvironment of the patients with acute myeloid leukemia. *Hum. Immunol.* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Mar 18];75(2):113–118. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24269703/>.
- [49] Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int. J. Hematol.* [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 18];62(2):99–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8590779/>.
- [50] Alhakeem SS, McKenna MK, Gachuki BW, Rangekar VR, Byrd JC, Muthusamy N, et al. The role of IL-10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cell survival. *J. Immunol.* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Dec 9];196(1_Supplement):211.17–211.17. Available from: https://journals.aai.org/jimmunol/article/196/1_Supplement/211.17/57937/The-role-of-IL-10-in-B-cell-chronic-lymphocytic.
- [51] Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J. Immunol.* [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2023 Mar 18];200(12):4180–4189. Available from: <https://pmc/articles/PMC6555426/>.
- [52] Rivas JR, Liu Y, Alhakeem SS, Eckenrode JM, Marti F, Collard JP, et al. Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021 Nov 17 [cited 2023 Mar 18];35(11):3188–3200. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01217-1>.
- [53] DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* [Internet]. 2013 Jan 13 [cited 2022 Dec 13];27(1):170–182. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012165>.
- [54] Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, Bancheureau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2023 Mar 18];178(5):1473–1481. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/178/5/1473/1104278/1473.pdf>.
- [55] Binder S, Luciano M, Horejs-Hoeck J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet]. 2018 Oct;43:8–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610118300984>.
- [56] Xu Y, Mou J, Wang Y, Zhou W, Rao Q, Xing H, et al. Regulatory T cells promote the stemness of leukemia stem cells through IL10 cytokine-related signaling pathway. *Leukemia* [Internet]. 2022 Feb 11 [cited 2023 Mar 18];36(2):403–415. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34381181/>.
- [57] Larmonier N, Marron M, Zeng Y, Cantrell T, Romanoski A, Sepassi M, et al. Tumor-derived CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF- β and IL-10. *Cancer Immunol. Immunother.* [Internet]. 2006 Nov 6 [cited 2023 Mar 18];56(11):48–59. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-006-0160-8>.
- [58] Toniolo PA, Liu S, Yeh JE, Ye DQ, Barbuti JAM, Frank DA. Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2023 Mar 18];7(29):46301–46314. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27317770/>.
- [59] Roessner PM, Llaó Cid L, Lupar E, Roeder T, Bordas M, Schifflers C, et al. EOMES and IL-10 regulate antitumor activity of T regulatory type 1 CD4+ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Mar 18];35(8):2311–2324. Available from: <https://pmc/articles/PMC8324479/>.
- [60] Westermann F, Kube D, Haier B, Bohlen H, Engert A, Zuehlendorf M, et al. Interleukin 10 inhibits cytokine production of human AML cells. *Ann. Oncol.* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2023 Mar 18];7(4):397–404. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419605909/fulltext>.
- [61] Rutz S, Ouyang W. Regulation of interleukin-10 expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* [Internet]. 2016 Nov;941(11):89–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475283>.
- [62] O. Bruserud, IL-4, IL-10 and IL-13 in acute myelogenous leukemia, *Cytokines, Cell. Mol. Ther.* [Internet] 4 (3) (1998 Sep) 187–198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825844>.
- [63] Fluckiger AC, Durand I, Bancheureau J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Exp. Med.* [Internet]. 1994 Jan 1 [cited 2023 Mar 18];179(1):91–99. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/179/1/91/1395598/91.pdf>.
- [64] Tao M, Li B, Nayini J, Sivaraman S, Song S, Larson A, et al. In Vivo Effects of IL-4, IL-10, and Amifostine on Cytokine Production in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Leuk. Lymphoma* [Internet]. 2001 Jan [cited 2023 Mar 18];41(1–2):161–168. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428190109057966>.
- [65] Asano Y, Shibata S, Kobayashi S, Okamura S, Niho Y. Interleukin-10 inhibits the autocrine growth of leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* [Internet]. 1997 Dec 1 [cited 2023 Mar 18];66(4):445–450. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9479871>.
- [66] Mahmood EF, Ahmed AA. Evaluation of interleukin-35 and interleukin-10 in adult acute myeloid leukemia patients before and after induction chemotherapy. *Iraqi J. Hematol.* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 27];9(2):82. Available from: <https://www.ijhonline.org/article.asp?issn=2072-8069;year=2020;volume=9;issue=2;epage=82;epage=86;aulast=Mahmood>.
- [67] Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wunsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to

- vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod. Pathol.* [Internet]. 2011 Jun [cited 2023 Sep 5];24(6):801–809. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317876/>.
- [68] V. Carlini, D.M. Noonan, E. Abdalaleem, D. Goletti, C. Sansone, L. Calabrone, et al., The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front. Immunol.* 8 (14) (2023 Jun) 1161067.
- [69] Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* [Internet]. 2005 Oct 4 [cited 2023 Sep 5];78(5):1043–1051. Available from: <https://doi.org/10.1189/jlb.0705358>.
- [70] Kuek V, Hughes AM, Kotecha RS, Cheung LC. Therapeutic Targeting of the Leukaemia Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2021 Jun 26;22(13):6888. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6888>.
- [71] F. Chiarini, A. Lonetti, C. Evangelisti, F. Buontempo, E. Orsini, C. Evangelisti, et al., Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* [Internet] 1863 (3) (2016 Mar) 449–463. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488915002931>.
- [72] Inagaki A, Ishida T, Ishii T, Komatsu H, Iida S, Ding J, et al. Clinical significance of serum Th1-, Th2- and regulatory T cells-associated cytokines in adult T-cell leukemia/Lymphoma: High interleukin-5 and -10 levels are significant unfavorable prognostic factors. *Int. J. Cancer* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2023 Mar 19];118(12):3054–3061. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16425276/>.
- [73] K. Drabko, A. Bojarska-Junak, J.R. Kowalczyk, Serum concentration of IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- α in children with acute lymphoblastic leukemia - Possible role of oxidative stress. *Cent. J. Immunol.* 33 (3) (2008) 146–149.
- [74] E. Bien, A. Balcerska, E. Adamkiewicz-Drozyńska, M. Rapala, M. Krawczyk, J. Stepinski. Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. *Clin. Biochem.* 42 (10–11) (2009 Jul) 1144–1157.
- [75] Zhang K, Li X, Huang R, Chen C, Hu W. IL-10 as an indicator for predicting clinical progression in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin. Lab.* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 9];67(10):2261–2267. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34655194/>.
- [76] M.W.A. Kerr, F. Magalhães-Gama, H.N.S. Ibiapina, F.S.A. Hanna, L.A. Xabregas, E.B. Alves, et al., Bone marrow soluble immunological mediators as clinical prognosis biomarkers in B-cell acute lymphoblastic leukemia patients undergoing induction therapy. *Front. Oncol.* 27 (11) (2021 Sep) 3631.
- [77] K.C. Conlon, M.D. Milkovic, T.A. Waldmann. Cytokines in the treatment of cancer. *J. Interf. Cytokine Res.* [Internet] 39 (1) (2019 Jan) 6–21. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>.
- [78] Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. [Internet]. 2011 Oct 13;3(4):3856–3893. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/4/3856>.
- [79] A. Naing, J.R. Infante, K.P. Papadopoulos, I.H. Chan, C. Shen, N.P. Ratti, et al., PEGylated IL-10 (Pegilodecakin) induces systemic immune activation, CD8+ T cell invigoration and polyclonal T cell expansion in cancer patients. *Cancer Cell* [Internet] 34 (5) (2018 Nov) 775–791.e3. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610818304732>.
- [80] R.M. Berman, T. Suzuki, H. Tahara, P.D. Robbins, S.K. Narula, M.T. Lotze. Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *J. Immunol.* [Internet] 157 (1) (1996 Jul 1) 231–238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683120>.
- [81] F.N. Lauw, D. Pajk, C.E. Hack, M. Kurimoto, S.J.H. van Deventer, T. van der Poll. Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *J. Immunol.* [Internet] 165 (5) (2000 Sep 1) 2783–2789. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/165/5/2783/33202/Proinflammatory-Effects-of-IL-10-During-Human>.
- [82] Garon EB, Wong DJ, Schneider JG, Aljumaily R, Korn WM, Patel MR, et al. Responses and durability of clinical benefit in non-small cell lung cancer treated with pegilodecakin in combination with anti-PD-1 inhibitors. *Ann. Oncol.* [Internet]. 2018 Oct 29;viii407. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419496014>.
- [83] Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, et al. Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* [Internet]. 2016 Oct 10 [cited 2023 Jun 14];34(29):3562. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.33.3622>.
- [84] A. Naing, D.J. Wong, J.R. Infante, W.M. Korn, R. Aljumaily, K.P. Papadopoulos, et al., Pegilodecakin combined with pembrolizumab or nivolumab for patients with advanced solid tumours (IVY): a multicentre, multicohort, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* [Internet] 20 (11) (2019 Nov) 1544–1555. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473204519305145>.
- [85] Gorby C, Sotolongo Bellón J, Wilmes S, Warda W, Pohler E, Fyfe PK, et al. Engineered IL-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses. *Sci. Signal.* [Internet]. 2020 Sep 15;13(649). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.abc0653>.
- [86] B.R. Lee, B.E. Kwon, E.H. Hong, A. Shim, J.H. Song, H.M. Kim, et al., Interleukin-10 attenuates tumour growth by inhibiting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signalling in myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Lett.* 381 (1) (2016 Oct 10) 156–164.
- [87] Shen L, Li J, Liu Q, Song W, Zhang X, Tiruthani K, et al. Local Blockade of Interleukin 10 and C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 with Nano-Delivery Promotes Antitumor Response in Murine Cancers. *ACS Nano* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jun 14];12(10):9830–9841. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.8b00967>.
- [88] Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* [Internet]. 2013 Nov [cited 2023 Jun 14];25(6):637. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24322764/>.
- [89] Wu S, Geßner R, Von Stackelberg A, Kirchner R, Henze G, Seeger K. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. *Cancer* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2023 Mar 19];103(5):1054–1063. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.20869>.
- [90] PÉREZ-FIGUEROA E, SÁNCHEZ-QUAXOSPA M, MARTÍNEZ-SOTO KA, SÁNCHEZ-ZAUCO N, MEDINA-SANSON A, JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ E, et al. Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. *Oncol. Rep.* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2023 Mar 19];35(5):2699–2706. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2016.4657/abstract>.
- [91] H. Ariffin, M.S. Azanan, S.S. Abd Ghafar, L. Oh, K.H. Lau, T. Thirunavakarasu, et al., Young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia show evidence of chronic inflammation and cellular aging. *Cancer* 123 (21) (2017 Nov 1) 4207–4214.
- [92] Latoch E, Konończuk K, Konstantynowicz-Nowicka K, Muszyńska-Roslan K, Sztolszter K, Chabowski A, et al., Asymptomatic Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Demonstrate a Biological Profile of Inflamm-Aging Early in Life. *Cancers (Basel)*. [Internet]. 2022 May 20 [cited 2023 Mar 19];14(10):2522. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/10/2522/html>.
- [93] Mohammed FM, Fahd MA, Jassin NA. Levels of Interleukin-10 in Iraqi Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia after Chemotherapy. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.* [Internet]. 2020 Apr 25 [cited 2023 Mar 19];14(2):1251–1256. Available from: <https://medicopublication.com/index.php/ijfnt/article/view/3078>.
- [94] Zhao S, Wu D, Wu P, Wang Z, Huang J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 6;10(10):e0139598. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139598>.
- [95] Nacinović-Duletić A, Štifter S, Dvorňak S, Škunca Z, Jonjić N. Correlation of serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels with clinicopathological features and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Lab. Hematol.* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2023 Jun 14];30(3):230–239. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-553X.2007.00951.x>.
- [96] F. De Vita, M. Orditura, G. Galizia, C. Romano, A. Roscigno, E. Lieto, et al., Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Chest* 117 (2) (2000 Feb 1) 365–373.
- [97] G. Galizia, M. Orditura, C. Romano, E. Lieto, P. Castellano, L. Pelosio, et al., Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery. *Clin. Immunol.* 102 (2) (2002 Feb 1) 169–178.
- [98] Viviani S, Notti P, Bonfante V, Verderio P, Valagussa P, Bonadonna G. Elevated pretreatment serum levels of IL-10 are associated with a poor prognosis in Hodgkin's disease, the milan cancer institute experience. *Med. Oncol.* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jun 14];17(1):59–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02826218>.
- [99] L. Xu, A. Kitani, W. Strober. Molecular mechanisms regulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol.* [Internet] 3 (3) (2010 May) 230–238. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S19330192102014799>.
- [100] T.A. Moo-Young, J.W. Larson, B.A. Belt, M.C. Tan, W.G. Hawkins, T.J. Eberlein, et al., Tumor-derived TGF- β mediates conversion of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunother.* 32 (1) (2009 Jan) 12–21.
- [101] L.W. Collison, V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomin, C. Guy, J. Bankoti, et al., IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. Available from: *Nat. Immunol.* [Internet] 11 (12) (2010 Dec 17) 1093–1101. <https://www.nature.com/articles/ni.1952>.
- [102] L.W. Collison, G.M. Delgoffe, C.S. Guy, K.M. Vignali, V. Chaturvedi, D. Fairweather, et al., The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat. Immunol.* 13 (3) (2012 Mar) 290–299.
- [103] A. Taylor, J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis, C.A. Akdis. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology* [Internet] 117 (4) (2006 Apr) 433–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x>.
- [104] A.G. Jarnicki, J. Lysaght, S. Todryk, K.H.G. Mills. Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF- β -producing T cells infiltrating the growing tumor: Influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 177 (2) (2006 Jul) 896–904.
- [105] Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- β , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Med.* [Internet]. 2022 Jan 25 [cited 2022 Jun 27];10:205031212110690. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35096390>.
- [106] H. Solati, M. Zarenejad, A. Ghavami, Z. Ghamsi, Z. Amirghofran, IL-35 and IL-18 serum levels in children with acute lymphoblastic leukemia: the relationship with prognostic factors. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* [Internet]. 42 (4) (2020 May) 281–286. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001667>.
- [107] Q. Tao, Y. Pan, Y. Wang, H. Wang, S. Xiong, Q. Li, et al., Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts. *Int. J.*

F.S. Silva et al.

Cytokine 171 (2023) 156371

- Cancer [Internet] 137 (10) (2015 Nov 15) 2384–2393, <https://doi.org/10.1002/jco.29563>.
- [108] Ahmed HA, Maklad AM, Elyamany A. Role of IL27 and IL35 as biomarkers and potential targets in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 2019 May;37(15 suppl):e18516–e18516.
- [109] J. Wang, Q. Tao, H. Wang, Z. Wang, F. Wu, Y. Pan, et al., Elevated IL-35 in bone marrow of the patients with acute myeloid leukemia, *Hum. Immunol.* 76 (9) (2015 Sep) 681–686.

6.2. CAPÍTULO II - Dados obtidos através dos experimentos do estudo

6.2.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os pacientes com LLA-B apresentaram idade mediana de 6 (IQR 4-8), enquanto a mediana de idade do GC foi de 3 (IQR 2-9) anos. O sexo masculino foi predominante nos pacientes com LLA-B, com 14/20, enquanto o GC foi composto por 9 crianças do sexo masculino e 11 do sexo feminino, conforme observado na Tabela 5. Pacientes com LLA-B apresentaram uma diminuição significativa de neutrófilos, monócitos, hemoglobina e plaquetas em comparação ao GC, refletindo a usual tríade da leucemia, caracterizada por anemia, neutropenia e trombocitopenia (3). Além disso, os pacientes com LLA-B apresentaram aumento no número de leucócitos totais quando comparado ao GC.

Tabela 5. Dados demográficos hematológicos da população do estudo.

Características	CG (n= 20)	LLA-B (n= 20)	p-value
Idade (anos), mediana (IQR)	3 (2-9)	6 (4-8)	
Sexo, (masculino/feminino)	9M/11F	14M/6F	
Leucócitos totais ($\times 10^3$ /uL), mediana (IQR)	8.045 (7.590-9.973)	8.810 (4.458-17.565)	0,1964
Linfoblastos ABS [%], mediana (IQR)		6.289 [62%] (1.908-13.610)	
Neutrófilos ($\times 10^3$ /uL), mediana (IQR)	3.43 (3.07-4.80)	0.46 (0.23-0.98)	<0,0001
Linfócitos ($\times 10^3$ /uL), mediana (IQR)	3.43 (3.03-4.46)	2.70 (1.62-5.00)	0,2665
Monócitos ($\times 10^3$ /uL), mediana (IQR)	0.38 (0.28-0.48)	0.06 (0.00-0.24)	0,0128
Hemoglobina (g/dL), mediana (IQR)	13.1 (12.2-13.6)	8.2 (5.6-9.7)	<0,0001
Plaquetas ($\times 10^3$ /uL), mediana (IQR)	379 (308-444)	36 (21-93)	<0,0001

Valores de referência: Leucócitos: 5.2 – 12.4 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Neutrófilos: 1.9 – 8 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Linfócitos: 0.9 – 5.2 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Monócitos: 0.16 – 1 $\times 10^3/\mu\text{L}$; Hemoglobina: 12 – 18 g/dL; Plaqueta: 130 – 140 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

Os resultados clínicos da população do estudo são apresentados na Tabela 6, destacando o Imunofenótipo de LLA-B comum (CD10⁺), a estratificação de risco ao D0, a reestratificação ao D15, e a avaliação da doença residual mensurável ao D35. Inicialmente, 65% dos pacientes foram classificados como Baixo Risco (BR) e 35% como Alto Risco (AR) ao D0. Ao D15, 11 pacientes foram reestratificados para o grupo de AR, totalizando 55% pacientes de AR e 45% de BR. A avaliação da positividade para doença residual mensurável ao D35 demonstrou que 45% dos pacientes apresentaram DRM⁽⁻⁾, alcançando a remissão completa durante a terapia de indução, enquanto 55% apresentaram doença residual DRM⁽⁺⁾.

Tabela 6. Características clínicas da população estudada.

Variáveis	Pacientes (n=20)
Imunofenotipagem	
LLA-B comum (CD10 ⁺)	20 (100%)
Estratificação de risco de tratamento em D0	
Baixo Risco (BR)	13 (65%)
Alto Risco (AR)	7 (35%)
Reestratificação de risco de tratamento em D15	
Baixo risco (BR)	9 (45%)
Alto risco (AR)	11 (55%)
Doença residual mensurável em D35	
DRM ⁽⁻⁾	9 (45%)
DRM ⁽⁺⁾	11 (55%)

DRM, doença residual mensurável.

Estudos indicam que crianças com LLA-B nascem com um desequilíbrio imunológico. A interação entre uma resposta imune desregulada e exposições ambientais pós-natais favorece o desenvolvimento da neoplasia (30,36). Nesse cenário, os linfócitos T regulatórios (Tregs), bem como as citocinas imunossupressoras, emergem como elementos cruciais na

regulação imunológica, inibindo a atividade de outras células imunes, assegurando a auto tolerância e prevenindo respostas hiperativas (167,270). Dessa forma, investigamos o perfil de linfócitos Tregs, populações de MVs-Treg e citocinas imunossupressoras, com o propósito de fornecer insights sobre o comportamento desses mediadores durante a malignidade.

Na Figura 11, demonstramos o perfil de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B no momento do diagnóstico. Os resultados demonstraram um aumento significativo de IL-10, com diminuição de TGF- β , quando comparado ao GC (Figura 11A). As concentrações elevadas de IL-10 podem ser uma repercussão da imunossupressão celular observada no microambiente leucêmico desses pacientes, o que pode contribuir para a sobrevivência, proliferação e metástase das células tumorais, devido a atenuação da imunovigilância (271,272).

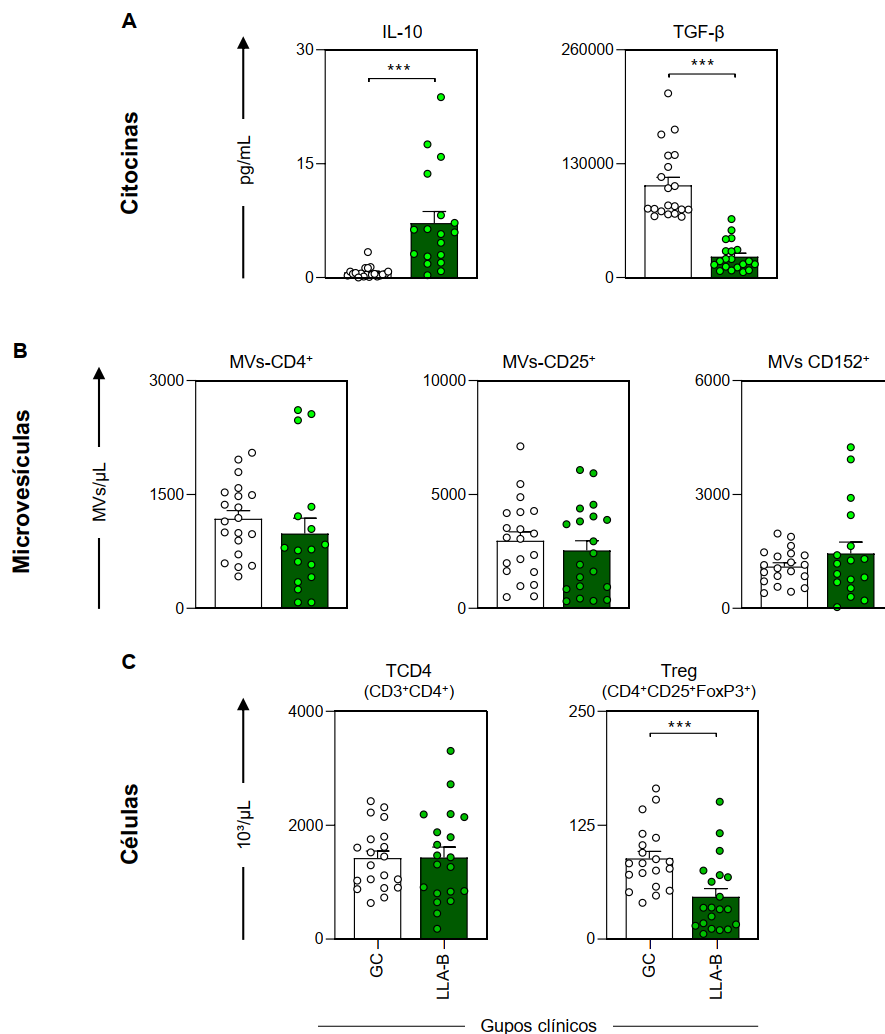


Figura 11. Perfil de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B ao diagnóstico. As citocinas IL-10 e TGF- β (A), microvesículas Tregs (B) e populações celulares TCD4

(CD3⁺CD4⁺) e Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (C) foram avaliadas ao momento do diagnóstico dos pacientes com LLA-B (cor verde) e no grupo controle – GC (cor branca). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student ou Mann-Whitney e as diferenças significativas são destacadas por asteriscos para p<0,001 (***)).

Outros estudos relataram o aumento de TGF- β , juntamente com IL-10 (202,273,274). Embora seja esperado que o TGF- β exibisse a mesma dinâmica da IL-10, é possível que sua diminuição esteja correlacionada a diminuição dos linfócitos Treg, uma vez que desempenha um papel crucial no desenvolvimento e na funcionalidade dessas células (176). No câncer, o TGF- β tem demonstrado promover um microambiente imunossupressor, inibindo a proliferação e infiltração de células T CD4⁺ e CD8⁺ efectoras, reduzindo ainda a produção de IFN- γ e prejudicando a montagem de respostas citotóxicas específicas (224). Em última análise, é importante investigar a concentração e o impacto do TGF- β no microambiente leucêmico.

Curiosamente, a caracterização do perfil de MVs-Treg não demonstrou resultados estatisticamente significativos (Figura 11B). No entanto, a partir de uma análise minuciosa é possível observar importantes alterações em relação ao GC. Em resumo, os dados demonstraram que, embora os pacientes com LLA-B tenham apresentado diminuição na contagem de MVs-CD4⁺ e MVs-CD25⁺, houve uma tendência de aumento na contagem de MVs-CD152⁺ (também conhecido como CTLA-4), reflexo de uma maior expressão de CTLA-4 pelos linfócitos Treg, indicando o aumento da capacidade imunossupressora dessas células na leucemia, conforme observado reportado por estudos anteriores (275,276).

A análise do perfil celular (Figura 11C), por sua vez, revelou dados observados em estudos anteriores, que demonstravam uma diminuição na frequência de linfócitos Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) no sangue periférico de pacientes pediátricos com LLA-B (24). A diminuição de linfócitos Treg na circulação, pode estar indicando a migração dessas células para o compartimento medular, local primário da malignidade. Estudos que avaliaram medula óssea de pacientes pediátricos com LLA-B revelaram um aumento na porcentagem de linfócitos Treg em relação ao SP e, em comparação à medula óssea de crianças sem leucemia (202,277). Em adição, essas células demonstraram coexpressar FoxP3, IL-10, TGF- β e CD152 elevados, exibindo, assim, uma atividade imunossupressora aumentada (24).

Com o propósito de identificar possíveis biomarcadores, realizamos a avaliação dos pacientes ao D0, segregando-os com base na avaliação da DRM ao dia D35. Entretanto, não identificamos diferenças estatisticamente significativas, conforme demonstrado na Figura 12.

Poderíamos especular que a investigação desses elementos na medula óssea, e preferencialmente com um número amostral mais elevado, poderá proporcionar resultados distintos, destacando a importância de futuras investigações mais abrangentes e direcionadas.

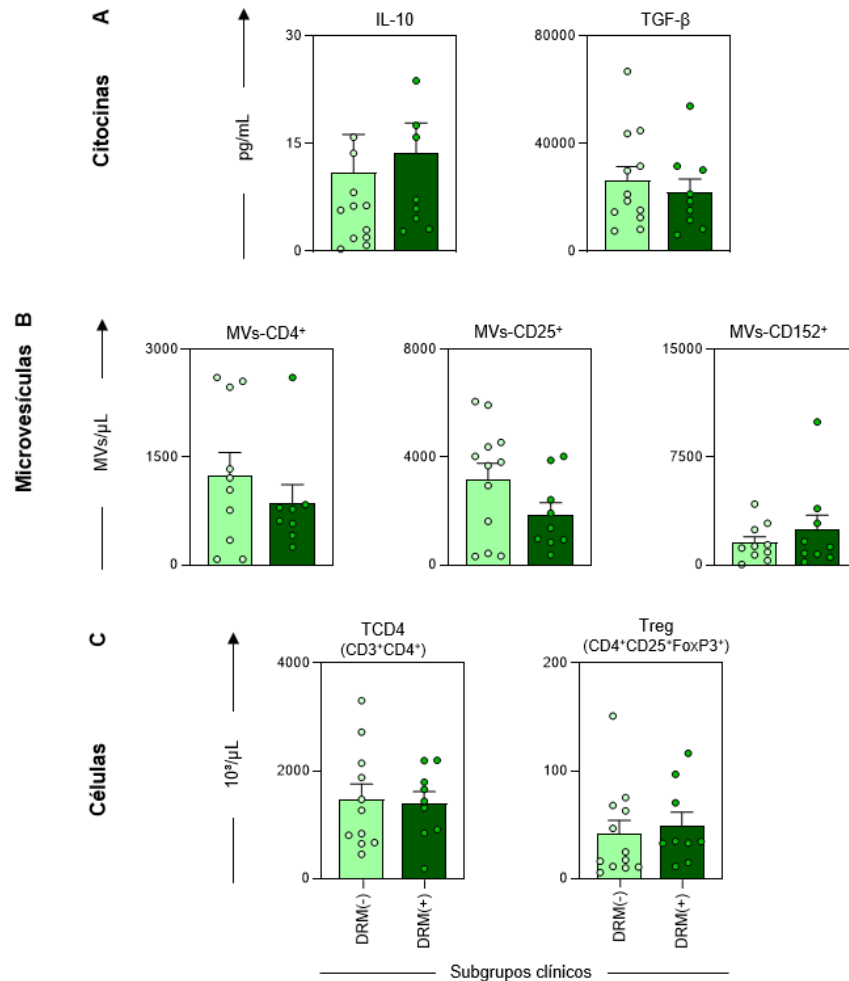


Figura 12. Perfil de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes com DRM⁽⁻⁾ e DRM⁽⁺⁾. As citocinas IL-10 e TGF-β (A), microvesículas Tregs (B) e populações celulares TCD4 (CD3⁺CD4⁺) e Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (C) foram avaliadas em pacientes com DRM⁽⁻⁾ (cor verde claro) e em pacientes com DRM⁽⁺⁾ (cor verde escuro). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student ou Mann-Whitney.

A análise da cinética dos linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores durante a terapia de indução foi realizada com objetivo de proporcionar uma visão mais abrangente do comportamento dos mediadores regulatórios ao longo do tratamento, conforme representado na Figura 13. Coletivamente, os dados demonstraram que os pacientes pediátricos com LLA-B exibiram ao longo da terapia de indução, um claro declínio nas concentrações de IL-10, ao

passo que apresentaram um aumento gradativo da concentração de TGF- β e na frequência das células TCD4⁺ e linfócitos Treg.

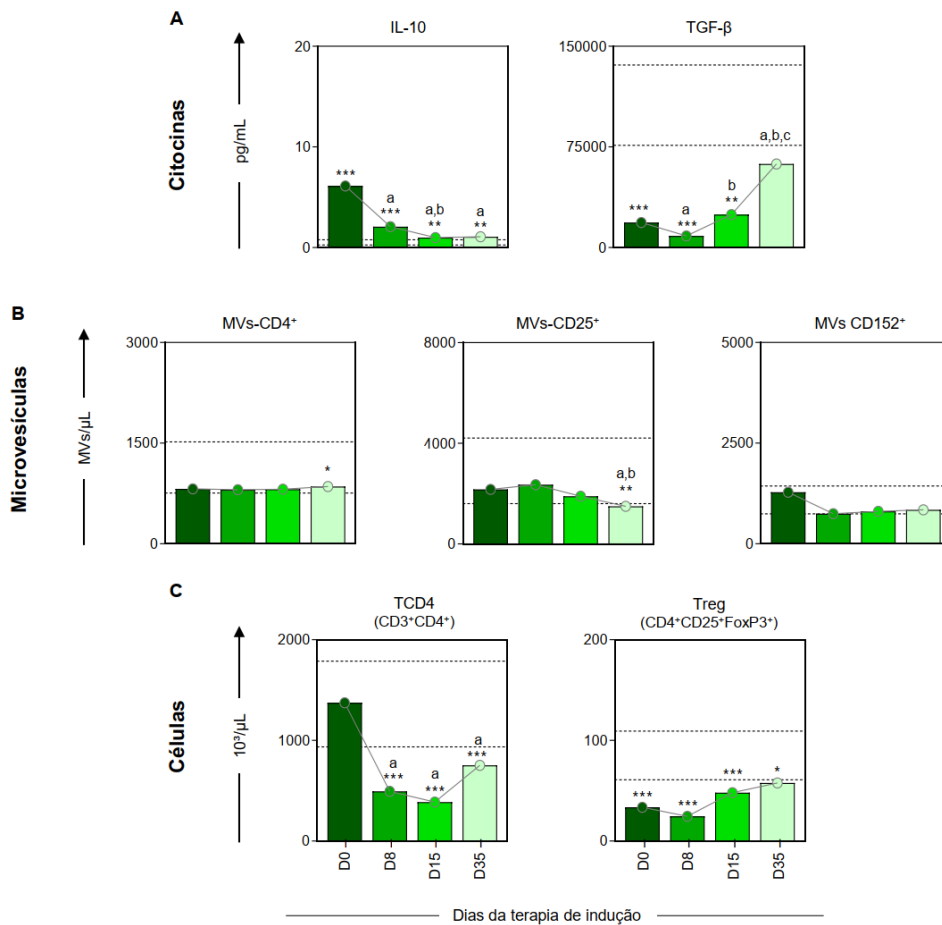


Figura 13. Cinética de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B. As citocinas IL-10 e TGF- β (A), microvesículas Tregs (B) e populações celulares TCD4 (CD3⁺CD4⁺) e Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) (C) foram avaliadas durante a terapia de indução de remissão (D0, D8, D15 e D35). As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste t pareado ou teste de postos sinalizados de pares combinados de Wilcoxon para comparações entre D0, D8, D15 e D35, enquanto o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para comparação com o grupo controle (GC). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de terapia de indução são representadas pelas seguintes letras: (a, b, c), que se referem às comparações com D0, D8 e D15, respectivamente. Diferenças significativas em relação ao GC estão destacadas com asteriscos para $p < 0,001$ (***) $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,05$ (*).

É importante destacar que a frequência dos linfócitos Tregs, suscita uma reflexão sobre o papel do TGF- β nessas células, em condições normais e durante processos patológicos. Uma vez que, ambos apresentam uma mesma dinâmica de produção ao diagnóstico e durante a terapia de indução da remissão. Esses achados sugerem uma importância da presença de TGF- β no microambiente tumoral, evidenciando seu papel no desenvolvimento e na funcionalidade dos linfócitos Tregs (174,176).

A análise da cinética de MVs-Treg revelou notáveis alterações em comparação ao D0. Embora os pacientes tenham apresentado aumento de linfócitos Treg ao D35, foi observado uma diminuição significativa de MVs-Treg (CD25⁺), além de uma tendência na diminuição de MVs-Treg (CD152⁺) (Figura 13B). Esses achados evidenciam uma redução na liberação de MVs por linfócitos Tregs ao D35, em conjunto com a diminuição da expressão de CTL-4 e, possivelmente, outros receptores inibitórios, o que pode indicar o controle da malignidade, relacionado a diminuição da carga leucêmica.

Por fim, com objetivo de investigar as correlações entre os linfócitos Treg, MVs-Treg e citocinas imunossupressoras, foram construídas redes integrativas dos pacientes com LLA-B, nos diferentes tempos da terapia de indução da remissão, conforme representado na Figura 14. Ao explorar as redes integrativas, foram observados perfis de correlação semelhantes entre os diferentes momentos da terapia de indução da remissão. De maneira geral, os pacientes com LLA-B exibiram uma rede com uma participação robusta dos mediadores regulatórios avaliados, destacando-se pelo elevado número de interações.

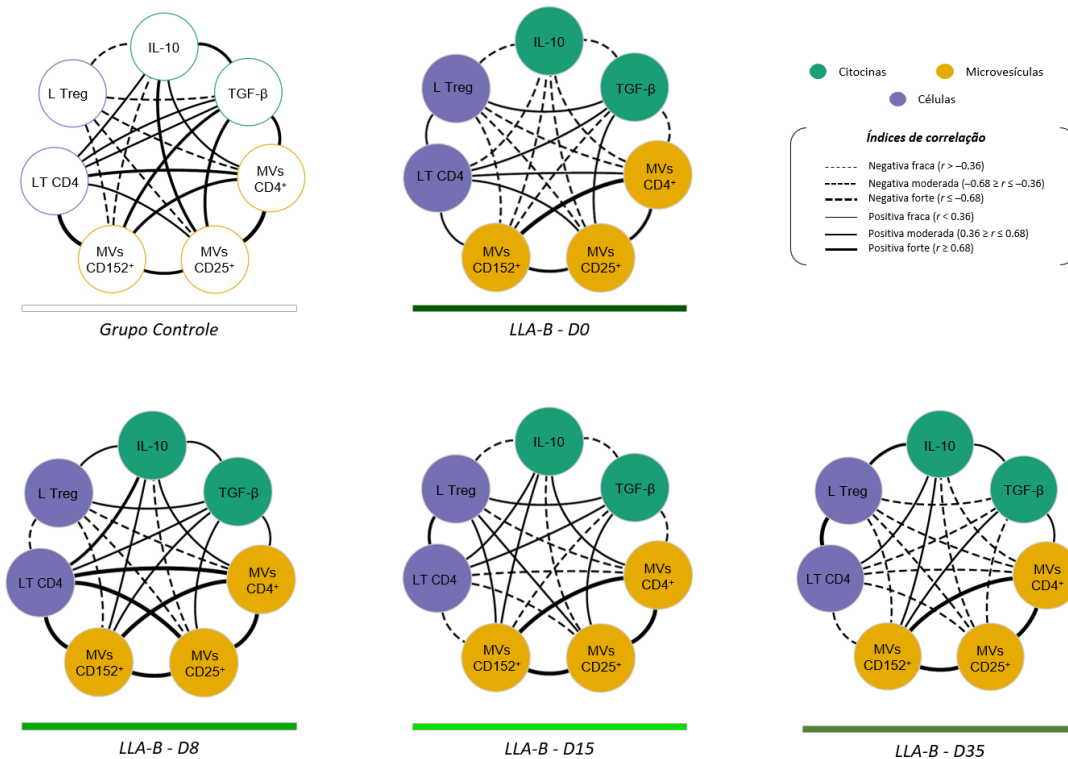


Figura 14. Redes Integrativas de linfócitos Tregs e mediadores imunossupressores em pacientes pediátricos com LLA-B ao diagnóstico. Redes integrativas foram montadas para identificar as complexas interações entre os linfócitos TCD4⁺, Tregs, MVs-Tregs, IL-10 e TGF-β durante a terapia de indução da remissão (D0, D8, D15 e D35). Os Nódulos coloridos são usados para identificar os mediadores imunológicos

avaliados. A análise de correlação foi empregada para construir redes integrativas de acordo com escores “r” significativos em $p < 0,05$ usando testes de correlação de Spearman.

Ao analisar de maneira mais minuciosa, é possível observar que os pacientes com LLA-B apresentaram D0, um maior número de conexões negativas mediadas pela citocina IL-10, sugerindo uma possível influência no feedback negativo no momento do diagnóstico. Em contraste, o GC exibiu uma rede com menor número de conexões negativas. Durante a terapia de indução, no dia D8, observou-se fortes correlações entre os linfócitos TCD4 e as populações de MVs ($CD4^+$, $CD25^+$ e $CD152^+$), sugerindo uma interação substancial entre esses elementos. Contudo, ao D15 e D35, as redes são caracterizadas pelo aumento das correlações negativas, inclusive entre os linfócitos $TCD4^+$ e as MVs-Treg.

Na LLA-B, sugere-se que as células específicas do tumor não são devidamente ativadas, ao contrário, apresentam-se em um estado de energia ou exaustão (278,279). A disfunção dessas células é especialmente influenciada pelos linfócitos Treg, resultando na redução da capacidade proliferativa e da função efetora, caracterizado pelo aumento da expressão de vários receptores inibitórios, visando contribuir para a indução de tolerância imunológica (280,281).

Os linfócitos Treg desempenham um papel central na imunossupressão celular de pacientes pediátricos com LLA-B, seja no compartimento medular ou no sangue periférico. Alguns estudos têm explorado se o número de linfócitos Treg $CD4^+$ nas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) é modulado em pacientes com LLA-B (24,202,282,283). Esses resultados refletem a complexidade da resposta imunológica durante a terapia de indução, indicando mudanças significativas em citocinas, MVs e populações celulares.

No entanto, é crucial enfatizar que essas observações, embora promissoras, necessitam de validação em estudos prospectivos e pareados, avaliando os linfócitos Treg e os mediadores imunossupressores tanto na circulação, como no compartimento medular ósseo, garantindo uma interpretação mais precisa de seus impactos clínicos. Esta abordagem longitudinal é crucial para uma compreensão abrangente da imunovigilância e montagem de resposta imunológica durante o tratamento, buscando identificar potenciais biomarcadores, além de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento dos pacientes pediátricos com LLA-B.

LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

É importante considerar que o estudo apresentou algumas limitações, como a não utilização de amostras de medula óssea, deixando uma lacuna no perfil desses mediadores no microambiente leucêmico. Além disso, devido as dificuldades com a coleta de sangue, o N amostral também acabou limitando as investigações de biomarcadores preditores de mudança de grupo de risco ao D15 e doença residual mensurável ao D35. Outra limitação observada foi a utilização de amostras de soro para quantificação de MVs-Treg, o que pode ter influenciado nos resultados do estudo, uma vez que a contagem de MVs pode ser maior em amostras de plasma.

Com isso, temos como próximas etapas dar continuidade nas investigações sobre os linfócitos Treg, MVs-Treg e citocinas imunossupressoras, realizando um estudo abrangente, com amostras de MO e SP, um N amostral mais robusto, e incluindo outras citocinas imunossupressoras como IL-35, além de outros receptores inibitórios que estão associados ao prognóstico de pacientes com leucemia e outros tipos de câncer.

CONCLUSÃO

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que:

- (i) Ao diagnóstico (D0), os pacientes pediátricos com LLA-B apresentaram: Aumento de IL-10, com diminuição de TGF- β ; Tendência de aumento de MVs-Tregs com fenótipo CD152⁺ (CTLA-4); Diminuição na frequência de linfócitos Treg;
- (ii) Por outro lado, ao final da terapia de indução da remissão (D35), foi observado: Declínio nas concentrações de IL-10, ao passo que exibiram aumento de TGF- β ; Diminuição de MVs-Treg com fenótipo CD25⁺ e CD152⁺; Além disso, verificou-se, o aumento sucessivo na frequência de células TCD4⁺ e linfócitos Tregs, sugerindo uma transição da resposta imunológica durante o tratamento;
- (iii) Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve a cinética de linfócitos Treg, de MVs-Tregs (CD4⁺, CD25⁺ e CD152⁺), e das citocinas IL-10 e TGF- β durante todo o período da terapia de indução da remissão nos pacientes pediátricos com LLA-B;
- (iv) Entre os mediadores imunossupressores dos linfócitos Treg, as microvesículas surgem como potenciais atores-chave no câncer. No entanto, são necessárias investigações adicionais para compreender melhor as características das MVs-Treg no contexto da LLA-B, a fim de esclarecer seu papel na fisiopatologia da doença e na resposta ao tratamento;
- (v) A dinâmica e interação dessas microvesículas com o sistema imunológico contribuem para o potencial significativo de estudos, que proporcionem insights valiosos sobre os mecanismos subjacentes à imunossupressão e sua reversão ao longo do tratamento;
- (vi) Nossos resultados, abrem caminho para novas investigações das possíveis aplicações clínicas das MVs-Treg e o seu potencial clínico, como biomarcadores preditivos de resposta terapêutica e alvos terapêuticos para otimização da imunoterapia em pacientes com LLA-B e outras neoplasias relacionadas;

- (vii) A investigação contínua neste campo promissor pode gerar avanços significativos no diagnóstico, prognóstico e terapia do câncer, oferecendo melhores resultados e qualidade de vida aos pacientes afetados.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS

1. Zámečníkova A. Childhood acute lymphoblastic leukemia. In: *Acute Lymphoblastic Leukemia: Etiology, Pathogenesis And Treatments*. 2012. p. 85–118.
2. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. [Internet]. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology*. American Society of Hematology. Education Program. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*; 2003 [cited 2022 Jun 14]. p. 102–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14633779/>
3. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J* [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2022 Jun 15];7(6):e577. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28665419/>
4. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia* [Internet]. 2009;23(12):2233–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2009.175>
5. Bakker E, Qattan M, Mutti L, Demonacos C, Krstic-Demonacos M. The role of microenvironment and immunity in drug response in leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2016;1863(3):414–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.08.003>
6. Huan J, Hornick NI, Shurtleff MJ, Skinner AM, Goloviznina NA, Roberts CT, et al. RNA trafficking by acute myelogenous leukemia exosomes. *Cancer Res*. 2013;73(2):918–29.
7. Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science* [Internet]. 2008 Dec 19 [cited 2022 Jun 15];322(5909):1861–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19095944/>
8. Sedgwick AE, D’Souza-Schorey C. The biology of extracellular microvesicles. *Traffic* [Internet]. 2018 May;19(5):319–27. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tra.12558>
9. Cai J, Han Y, Ren H, Chen C, He D, Zhou L, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(4):227–38.
10. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, Simeon V, Calice G, Raimondo S, et al. MiRNAs

- and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: A new insight in transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(6):6676–92.
11. Lo Cicero A, Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles shuffling intercellular messages: For good or for bad. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;35:69–77.
 12. Meldolesi J. Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. *Curr Biol* [Internet]. 2018;28(8):R435–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>
 13. Willms E, Cabañas C, Mäger I, Wood MJA, Vader P. Extracellular vesicle heterogeneity: Subpopulations, isolation techniques, and diverse functions in cancer progression. *Front Immunol*. 2018;9(APR).
 14. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassarà D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res*. 1998;18(5 A):3433–7.
 15. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions [Internet]. Vol. 4, *Journal of Extracellular Vesicles*. *J Extracell Vesicles*; 2015 [cited 2022 Jun 15]. p. 1–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25979354/>
 16. Lee Y, El Andaloussi S, Wood MJA. Exosomes and microvesicles: Extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2012;21(R1):1–10.
 17. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* [Internet]. 2008 May 1 [cited 2022 Jun 15];180(9):5771–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18424693/>
 18. Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, et al. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2022 Jul 19];15(10):3325–32. Available from: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/15/10/3325/73439/Increased-Frequency-and-Suppression-by-Regulatory>
 19. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4 +CD25 + regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 2012;3(2):421–4.
 20. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in

- immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6(4):345–52.
21. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, McInnes IB, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur J Immunol.* 2007;37(11):3021–9.
 22. Campbell DJ, Koch MA. T reg cells: Patrolling a dangerous neighborhood. *Nat Med.* 2011;17(8):929–30.
 23. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, et al. MicroRNA-Containing T-Regulatory-Cell-Derived Exosomes Suppress Pathogenic T Helper 1 Cells. *Immunity [Internet].* 2014;41(1):89–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2014.05.019>
 24. Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells and CD4+ CD25- responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology [Internet].* 2014 May 1 [cited 2022 Jul 19];142(1):124–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12237>
 25. Wu H, Li P, Shao N, Ma J, Ji M, Sun X, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- β in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett.* 2012;3(5):1119–23.
 26. Ehsanpour A, Saki N, Bagheri M, Behzad MM, Abroun S. The Expression of Microvesicles in Leukemia: Prognostic Approaches. *Cell J [Internet].* 2019 Jul 1 [cited 2022 Oct 4];21(2):115. Available from: </pmc/articles/PMC6397602/>
 27. Van Etten RA. Mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene: new perspectives in the post-imatinib era. *Leuk Res.* 2004 May 1;28(SUPPL. 1):21–8.
 28. Van Etten RA. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene* 2007 2647 [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2022 Oct 4];26(47):6738–49. Available from: <https://www.nature.com/articles/1210758>
 29. Greaves M, Cazzaniga V, Ford A. Can we prevent childhood Leukaemia? *Leukemia [Internet].* 2021 May 1 [cited 2022 Sep 29];35(5):1258–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33833382/>
 30. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer [Internet].* 2018 Aug 1 [cited 2022 Sep 29];18(8):471–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784935/>
 31. Bartley K, Metayer C, Selvin S, Ducore J, Buffler P. Diagnostic X-rays and risk of

- childhood leukaemia. *Int J Epidemiol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2022 Oct 3];39(6):1628. Available from: [/pmc/articles/PMC2992630/](#)
32. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2007 Jan [cited 2022 Oct 3];115(1):138. Available from: [/pmc/articles/PMC1817663/](#)
 33. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia [Internet]. Vol. 6, *Nature Reviews Cancer*. *Nat Rev Cancer*; 2006 [cited 2022 Oct 3]. p. 193–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16467884/>
 34. Salaro E, Rambaldi A, Falzoni S, Amoroso FS, Franceschini A, Sarti AC, et al. Involvement of the P2X7-NLRP3 axis in leukemic cell proliferation and death. *Sci Reports* 2016 61 [Internet]. 2016 May 25 [cited 2022 Sep 29];6(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep26280>
 35. Moreira-Souza ACA, Almeida-da-Silva CLC, Rangel TP, Rocha G da C, Bellio M, Zamboni DS, et al. The P2X7 Receptor Mediates *Toxoplasma gondii* Control in Macrophages through Canonical NLRP3 Inflammasome Activation and Reactive Oxygen Species Production. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Oct 12 [cited 2022 Sep 29];8(OCT). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29075257/>
 36. Chang JS, Zhou M, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 [cited 2022 Jun 16];20(8):1736–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653647/>
 37. Chang JS, Zhou M, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 Aug [cited 2022 Jun 16];20(8):1736–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653647/>
 38. Roman E, Simpson J, Ansell P, Kinsey S, Mitchell CD, McKinney PA, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia and infections in the first year of life: a report from the United Kingdom Childhood Cancer Study. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2022 Oct 3];165(5):496–504. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17182983/>
 39. Lejman M, Chałupnik A, Chilimoniuk Z, Dobosz M. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2022 Oct 3];23(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269896/>

40. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2022 Oct 3];75(3):417. Available from: [/pmc/articles/PMC5765206/](#)
41. Hoffbrand A V., Steensma DP. Hoffbrand's essential haematology. Wiley-Blackwell. 2019:432.
42. Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Akute lymphoblastische Leukämie bei Kindern: Therapiesteuerung durch den Nachweis von MRD (minimal residual disease). *Dtsch Arztebl Int*. 2012 Oct 5;109(40):652–8.
43. INCA. Incidência, mortalidade e morbidade hospitalar por câncer em crianças, adolescentes e adultos jovens no Brasil: informações dos registros de câncer e do sistema de mortalidade. 2016.
44. INCA. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. 2017.
45. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ)—Health Professional Version - National Cancer Institute. PDQ Cancer Inf Summ [Internet]. 2019 [cited 2022 Jun 16];2019. Available from: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>
46. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil [Internet]. 2022. 2022. 162 p. Available from: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>
47. Vieira AF, Neves B, Tonelli SR. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEUCEMIA LINFOIDE NAS REGIÕES DO BRASIL RESUMO. *Rev UNILUS Ensino e Pesqui v* [Internet]. 2017 Mar 31 [cited 2022 Jun 15];37(37):2017. Available from: <http://revista.unilus.edu.br/index.php/ruep/article/view/933>
48. Balmant NV, De Souza Reis R, De Oliveira Santos M, Oliveira JP, De Camargo B. Trends in Cancer Mortality Among Adolescents and Young Adults in Brazil. *J Adolesc Young Adult Oncol* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2022 Jun 15];6(2):341–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28051344/>
49. De Camargo B, De Oliveira Santos M, Rebelo MS, De Souza Reis R, Ferman S, Noronha CP, et al. Cancer incidence among children and adolescents in Brazil: First report of 14 population-based cancer registries. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Feb 1 [cited 2022 Jun 15];126(3):715–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19642142/>
50. Reis RDS, Santos MDO, De Camargo B, Oliveira JFP, Thuler LCS, Pombo-De-

- Oliveira MS. Early childhood leukemia incidence trends in Brazil. *Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2016 Feb 17 [cited 2022 Jun 15];33(2):83–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26925506/>
51. de Souza Reis R, de Camargo B, de Oliveira Santos M, de Oliveira JM, Azevedo Silva F, Pombo-De-Oliveira MS. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2011 Jan [cited 2022 Jun 15];56(1):58–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21108440/>
 52. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Jun 24];14(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31437246/>
 53. Bain BJ, Estcourt L. FAB Classification of Leukemia. *Brenner's Encycl Genet* Second Ed. 2013 Feb 27;5–7.
 54. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [Internet]. Vol. 127, *Blood*. Blood; 2016 [cited 2022 Jun 16]. p. 2391–405. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27069254/>
 55. Pui CH. Treatment of acute leukemias : new directions for clinical research. 2003;562.
 56. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2009 Aug [cited 2022 Jun 16];23(4):655–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19577163/>
 57. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2004 Apr [cited 2022 Jun 16];40(2):91–8. Available from: <http://www.scielo.br/j/jbpml/a/hqbmPwpLN5tLzxRX3kdnSpg/?lang=pt>
 58. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? [Internet]. Vol. 120, *Blood*. Blood; 2012 [cited 2022 Jun 16]. p. 1165–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730540/>
 59. McGregor S, McNeer J, Gurbuxani S. Beyond the 2008 World Health Organization classification: The role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2022 Jun 24];29(1):2–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22372201/>

60. Brandalise SR, Pinheiros VR, Lee MLM. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância. *Soc Bras Oncol Pediátrica*. 2009;
61. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020 [cited 2022 Sep 29]. Available from: [/pmc/articles/PMC7037356/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33111111/)
62. Da Costa Salina TD, Ferreira YA, Alves EB, Ferreira CM, De Paula EV, Mira MT, et al. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 16 [cited 2022 Jun 16];6. Available from: [/pmc/articles/PMC4985643/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26611111/)
63. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* [Internet]. 2010 [cited 2022 Oct 3];2010:7–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21239764/>
64. Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? [Internet]. Vol. 21, *Leukemia*. *Leukemia*; 2007 [cited 2022 Oct 3]. p. 622–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17301806/>
65. Short NJ, Jabbour E. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 2017 Jan 16 [cited 2022 Oct 3];19(1):6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28205134/>
66. Borowitz MJ, Wood BL, Devidas M, Loh ML, Raetz EA, Salzer WL, et al. Prognostic significance of minimal residual disease in high risk B-ALL: A report from Children's Oncology Group study AALL0232. *Blood* [Internet]. 2015 Aug 20 [cited 2022 Oct 3];126(8):964–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26124497/>
67. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, et al. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016 Mar 1;1863(3):449–63.
68. Gomariz A, Isringhausen S, Helbling PM, Nombela-Arrieta C. Imaging and spatial analysis of hematopoietic stem cell niches. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2020 [cited 2022 Sep 16];1466(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31368140/>
69. Maestroni GJM. Adrenergic Modulation of Hematopoiesis. *J Neuroimmune Pharmacol* [Internet]. 2020 Mar 1 [cited 2022 Sep 16];15(1):82–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30762159/>
70. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells

- maintain haematopoietic stem cells. *Nature* [Internet]. 2012 Jan 26 [cited 2022 Sep 16];481(7382):457–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22281595/>
71. Méndez-Ferrer S, Michurina T V., Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* [Internet]. 2010 Aug 12 [cited 2022 Sep 16];466(7308):829–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20703299/>
 72. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* [Internet]. 2008 Apr 11 [cited 2022 Sep 16];283(15):9499–503. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18272517/>
 73. Ebben JD, Treisman DM, Zorniak M, Kutty RG, Clark PA, Kuo JS. The cancer stem cell paradigm: a new understanding of tumor development and treatment. *Expert Opin Ther Targets* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Sep 16];14(6):621–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20426697/>
 74. Ayob AZ, Ramasamy TS. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci* [Internet]. 2018 Mar 6 [cited 2022 Sep 16];25(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29506506/>
 75. Walcher L, Kistenmacher AK, Suo H, Kitte R, Dluczek S, Strauß A, et al. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* [Internet]. 2020 Aug 7 [cited 2022 Sep 16];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32849491/>
 76. Simioni C, Conti I, Varano G, Brenna C, Costanzi E, Neri LM. The Complexity of the Tumor Microenvironment and Its Role in Acute Lymphoblastic Leukemia: Implications for Therapies. *Front Oncol* [Internet]. 2021 May 5;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.673506/full>
 77. Zhou J, Mauerer K, Farina L, Gribben JG. The role of the tumor microenvironment in hematological malignancies and implication for therapy. *Front Biosci* [Internet]. 2005 [cited 2022 Sep 16];10(2):1581–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15769648/>
 78. Veiga JP, Costa LF, Sallan SE, Nadler LM, Cardoso AA. Leukemia-stimulated bone marrow endothelium promotes leukemia cell survival. *Exp Hematol* [Internet]. 2006 May [cited 2022 Sep 16];34(5):610–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16647567/>
 79. Simioni C, Neri LM, Tabellini G, Ricci F, Bressanin D, Chiarini F, et al. Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia.

- Leukemia [Internet]. 2012 Nov [cited 2022 Sep 16];26(11):2336–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22614243/>
80. Li Z, He XC, Li L. Hematopoietic stem cells: self-renewal and expansion. *Curr Opin Hematol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Sep 16];26(4):258–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31170110/>
 81. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018 194 [Internet]. 2018 Jan 17 [cited 2022 Jun 21];19(4):213–28. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.125>
 82. O'Brien K, Breyne K, Ughetto S, Laurent LC, Breakefield XO. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 Aug 18];21(10):585–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32457507/>
 83. Li S, Yi M, Dong B, Jiao Y, Luo S, Wu K. The roles of exosomes in cancer drug resistance and its therapeutic application. *Clin Transl Med* [Internet]. 2020 Dec [cited 2022 Aug 18];10(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33377643/>
 84. Menck K, Scharf C, Bleckmann A, Dyck L, Rost U, Wenzel D, et al. Tumor-derived microvesicles mediate human breast cancer invasion through differentially glycosylated EMMPRIN. *J Mol Cell Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Aug 18];7(2):143–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25503107/>
 85. Ortiz A. Not all extracellular vesicles were created equal: clinical implications. *Ann Transl Med* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2022 Aug 18];5(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28361076/>
 86. Mathew M, Zade M, Mezghani N, Patel R, Wang Y, Momen-Heravi F. Extracellular Vesicles as Biomarkers in Cancer Immunotherapy. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 Aug 18];12(10):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33007968/>
 87. Qin B, Hu X min, Su Z hong, Zeng X bo, Ma H ying, Xiong K. Tissue-derived extracellular vesicles: Research progress from isolation to application. *Pathol - Res Pract* [Internet]. 2021 Oct;226:153604. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S034403382100265X>
 88. Wolf P. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Br J Haematol* [Internet]. 1967 May 1 [cited 2022 Jun 16];13(3):269–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x>
 89. Poste G, Nicolson GL. Arrest and metastasis of blood-borne tumor cells are modified

- by fusion of plasma membrane vesicles from highly metastatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1980 [cited 2022 Aug 18];77(1):399–403. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6928631/>
90. Bian X, Xiao YT, Wu T, Yao M, Du L, Ren S, et al. Microvesicles and chemokines in tumor microenvironment: mediators of intercellular communications in tumor progression. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 Mar 30 [cited 2022 Aug 18];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30925930/>
 91. Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Sep 7 [cited 2022 Jun 16];101(36):13368–73. Available from: <https://www.pnas.org>
 92. Lässer C, Eldh M, Lötvall J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 16];(59):1–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22257828/>
 93. Keller S, Ridinger J, Rupp AK, Janssen JWG, Altevogt P. Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *J Transl Med* [Internet]. 2011 Jun 8 [cited 2022 Jun 16];9(1):1–9. Available from: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-9-86>
 94. Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* [Internet]. 2005 Jul [cited 2022 Jun 16];17(7):879–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15908444/>
 95. Poliakov A, Spilman M, Dokland T, Amling CL, Mobley JA. Structural heterogeneity and protein composition of exosome-like vesicles (prostasomes) in human semen. *Prostate* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2022 Jun 16];69(2):159–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18819103/>
 96. Lässer C, O’Neil SE, Ekerljung L, Ekström K, Sjöstrand M, Lötvall J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. *Am J Rhinol Allergy* [Internet]. 2011 Mar [cited 2022 Jun 16];25(2):89–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21172122/>
 97. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2022 Jun 16];9(6):654–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17486113/>
 98. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem

- cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia* [Internet]. 2006 [cited 2022 Jun 16];20(5):847–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16453000/>
99. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* [Internet]. 2013 Feb 18 [cited 2022 Jun 16];200(4):373–83. Available from: www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.201211138JCB373
 100. Witwer KW, Soekmadji C, Hill AF, Wauben MH, Buzás EI, Di Vizio D, et al. Updating the MISEV minimal requirements for extracellular vesicle studies: building bridges to reproducibility. *J Extracell vesicles* [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2022 Jun 16];6(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29184626/>
 101. Lötvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzás EI, Vizio D Di, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 16];3(1). Available from: [/pmc/articles/PMC4275645/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721812/)
 102. Lee CH, Im EJ, Moon PG, Baek MC. Discovery of a diagnostic biomarker for colon cancer through proteomic profiling of small extracellular vesicles. *BMC Cancer* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Aug 18];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30382917/>
 103. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Jun 21];40:41–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721812/>
 104. Pap E, Pállinger É, Pásztói M, Falus A. Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Aug 18];58(1):1–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19132498/>
 105. Piccin A, Murphy WG, Smith OP. Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* [Internet]. 2007 May [cited 2022 Aug 18];21(3):157–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17118501/>
 106. Zhu S, Li S, Yi M, Li N, Wu K. Roles of microvesicles in tumor progression and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 2021;16:7071–90.
 107. Inal JM, Ansa-Addo EA, Stratton D, Kholia S, Antwi-Baffour SS, Jorfi S, et al.

- Microvesicles in health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Aug 18];60(2):107–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22307363/>
108. Jorfi S, Inal JM. The role of microvesicles in cancer progression and drug resistance. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2013 Feb [cited 2022 Aug 18];41(1):293–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23356300/>
 109. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2022 Aug 18];19(22):1875–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19896381/>
 110. Wang D, Sun W. Urinary extracellular microvesicles: isolation methods and prospects for urinary proteome. *Proteomics* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 18];14(16):1922–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24962155/>
 111. Clancy JW, Zhang Y, Sheehan C, D’Souza-Schorey C. An ARF6-Exportin-5 axis delivers pre-miRNA cargo to tumour microvesicles. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Aug 18];21(7):856–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31235936/>
 112. Mentkowski KI, Snitzer JD, Rusnak S, Lang JK. Therapeutic Potential of Engineered Extracellular Vesicles. *AAPS J* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Aug 18];20(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29546642/>
 113. Li B, Antonyak MA, Zhang J, Cerione RA. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2012 Nov 8 [cited 2022 Aug 18];31(45):4740–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22266864/>
 114. Sedgwick AE, Clancy JW, Olivia Balmert M, D’Souza-Schorey C. Extracellular microvesicles and invadopodia mediate non-overlapping modes of tumor cell invasion. *Sci Rep*. 2015 Oct 13;5.
 115. Schlienger S, Campbell S, Claing A. ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2022 Aug 18];25(1):17–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24196838/>
 116. Agrahari V, Agrahari V, Burnouf PA, Chew CH, Burnouf T. Extracellular Microvesicles as New Industrial Therapeutic Frontiers. *Trends Biotechnol* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2022 Aug 18];37(7):707–29. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30638682/>
117. Sheehan C, D'Souza-Schorey C. Tumor-derived extracellular vesicles: molecular parcels that enable regulation of the immune response in cancer. *J Cell Sci* [Internet]. 2019 [cited 2022 Aug 18];132(20). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31615844/>
 118. Koga K, Nabeshima K, Aoki M, Kawakami T, Hamasaki M, Toole BP, et al. Emmprin in epithelioid sarcoma: expression in tumor cell membrane and stimulation of MMP-2 production in tumor-associated fibroblasts. *Int J cancer* [Internet]. 2007 Feb 15 [cited 2022 Aug 18];120(4):761–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17131322/>
 119. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2022 Aug 18];40:41–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721812/>
 120. Zhong W De, Liang YX, Lin SX, Li L, He HC, Bi XC, et al. Expression of CD147 is associated with prostate cancer progression. *Int J cancer* [Internet]. 2012 Jan 15 [cited 2022 Aug 18];130(2):300–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21328337/>
 121. D'Souza-Schorey Crislyn C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev* [Internet]. 2012 Jun [cited 2022 Aug 18];26(12):1287–99. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22713869/>
 122. Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 [cited 2022 Aug 18];10(12):1470–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19011622/>
 123. Rak J. Microparticles in cancer. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 18];36(8):888–906. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21049390/>
 124. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* [Internet]. 2006 [cited 2022 Aug 18];20(9):1487–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16791265/>
 125. Melzani G, Bugari G, Parrinello G, Mori G, Manganoni A usilia M, De Panfilis G. Evaluation of soluble Fas ligand as a serological marker for melanoma. *Dermatology*

- [Internet]. 2002 [cited 2022 Aug 18];205(2):111–5. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12218223/>
126. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: Integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* (80-) [Internet]. 2011 Mar 25 [cited 2022 Sep 15];331(6024):1565–70. Available from:
<https://www.science.org/doi/10.1126/science.1203486>
 127. Finn OJ. Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Ann Oncol*. 2012 Sep 1;23(SUPPL.8):viii6–9.
 128. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2006 Apr 1;6(4):295–307. Available from:
<https://www.nature.com/articles/nri1806>
 129. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 2008 Feb 1;18(1):11–8.
 130. Kim PS, Ahmed R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2010 Apr;22(2):223–30. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952791510000294>
 131. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2016 Sep 9 [cited 2022 Sep 20];4(9):721. Available from:
</pmc/articles/PMC5026325/>
 132. Li C, Jiang P, Wei S, Xu X, Wang J. Regulatory T cells in tumor microenvironment: new mechanisms, potential therapeutic strategies and future prospects. *Mol Cancer* 2020 191 [Internet]. 2020 Jul 17 [cited 2022 Sep 20];19(1):1–23. Available from:
<https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-020-01234-1>
 133. Plitas G, Rudensky AY. Regulatory T Cells: Differentiation and Function. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Aug 18];4(9):721–5. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27590281/>
 134. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2012 Apr [cited 2022 Aug 18];12(4):252–64. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22437870/>
 135. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* [Internet]. 2015 Apr 13 [cited 2022 Aug 18];27(4):450–61. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25858804/>
 136. Gotwals P, Cameron S, Cipolletta D, Cremasco V, Crystal A, Hewes B, et al. Prospects

- for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Aug 18];17(5):286–301. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28338065/>
137. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* [Internet]. 1970 [cited 2022 Sep 15];18(5):723–37. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4911896/>
 138. Fujimoto S, Greene M, Sehon AH. Immunosuppressor T cells in tumor bearing host. *Immunol Commun* [Internet]. 1975 [cited 2022 Sep 15];4(3):201–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1080741/>
 139. Berendt MJ, North RJ. T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med* [Internet]. 1980 [cited 2022 Sep 15];151(1):69–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6444236/>
 140. North RJ, Bursucker I. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med* [Internet]. 1984 May 1 [cited 2022 Sep 15];159(5):1295–311. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6232335/>
 141. Bursucker I, North RJ. Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. II. Failure to demonstrate postexcision immunity after the onset of T cell-mediated suppression of immunity. *J Exp Med* [Internet]. 1984 May 1 [cited 2022 Sep 15];159(5):1312–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6232336/>
 142. Groux H, O’Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, De Vries JE, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* [Internet]. 1997 [cited 2022 Sep 15];389(6652):737–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9338786/>
 143. Weiner HL. Induction and mechanism of action of transforming growth factor- β -secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2022 Sep 15];182(1):207–14. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1034/j.1600-065X.2001.1820117.x>
 144. Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Francalanci M, Angeli R, Mazzinghi B, et al. Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes. *Blood* [Internet]. 2003 Dec 1 [cited 2022 Sep 15];102(12):4107–14. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/102/12/4107/16728/Human-CD8-CD25->

- thymocytes-share-phenotypic-and
145. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, et al. Tolerization of dendritic cells by TS cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 2002 33 [Internet]. 2002 Jan 28 [cited 2022 Sep 15];3(3):237–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni760>
 146. Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential Roles of CD8+CD122+ Regulatory T Cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *J Exp Med* [Internet]. 2004 Nov 1 [cited 2022 Sep 15];200(9):1123–34. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20040395>
 147. Zoul W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, Borvakz J, Nome F, Isaeva T, et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001 712 [Internet]. 2001 [cited 2022 Sep 15];7(12):1339–46. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm1201-1339>
 148. Wei S, Kryczek I, Zou L, Daniel B, Cheng P, Mottram P, et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8+ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2022 Sep 15];65(12):5020–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15958543/>
 149. Gilliet M, Liu YJ. Generation of Human CD8 T Regulatory Cells by CD40 Ligand-activated Plasmacytoid Dendritic Cells. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Mar 18 [cited 2022 Sep 15];195(6):695–704. Available from: <http://www.jem.org/cgi/content/full/195/6/695>
 150. Hawrylowicz CM, O'Garra A. Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2005 Apr [cited 2022 Jul 19];5(4):271–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15775993/>
 151. Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Jul 19];212:256–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903919/>
 152. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Jul 19];212:28–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903904/>
 153. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of Peripheral

- CD4+CD25⁻ Naive T Cells to CD4+CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2022 Sep 16];198(12):1875–86. Available from:
<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20030152>
154. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol* [Internet]. 2008 Sep [cited 2022 Sep 18];29(9):429–35. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18676178/>
155. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25⁻ T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Sep 18];172(9):5149–53. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15100250/>
156. Tran DQ, Ramsey H, Shevach EM. Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood* [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2022 Sep 18];110(8):2983–90. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17644734/>
157. Okeke EB, Uzonna JE. The Pivotal Role of Regulatory T Cells in the Regulation of Innate Immune Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2019 Apr 9;10. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2019.00680/full>
158. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* [Internet]. 2012;3:51. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22566933>
159. Scheinecker C, Göschl L, Bonelli M. Treg cells in health and autoimmune diseases: New insights from single cell analysis. *J Autoimmun* [Internet]. 2020 Jun;110:102376. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841119307802>
160. Georgiev P, Charbonnier LM, Chatila TA. Regulatory T Cells: the Many Faces of Foxp3. *J Clin Immunol* [Internet]. 2019 Oct 2;39(7):623–40. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/s10875-019-00684-7>
161. Goodman WA, Cooper KD, McCormick TS. Regulation Generation: The Suppressive Functions of Human Regulatory T Cells. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2012;32(1):65–79. Available from:
<http://www.dl.begellhouse.com/journals/2ff21abf44b19838,76944bab5ddebfc1,76e6c3>

- 6555f9f029.html
162. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008 87 [Internet]. 2008 Jul [cited 2022 Jun 27];8(7):523–32. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2343>
 163. Zhao H, Liao X, Kang Y. Tregs: Where We Are and What Comes Next? *Front Immunol* [Internet]. 2017 Nov 24;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01578/full>
 164. Tung SL, Fanelli G, Matthews RI, Bazoer J, Letizia M, Vizcay-Barrena G, et al. Regulatory T Cell Extracellular Vesicles Modify T-Effector Cell Cytokine Production and Protect Against Human Skin Allograft Damage. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 May 20;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00317/full>
 165. Rojas C, Campos-Mora M, Cárcamo I, Villalón N, Elhusseiny A, Contreras-Kallens P, et al. T regulatory cells-derived extracellular vesicles and their contribution to the generation of immune tolerance. *J Leukoc Biol* [Internet]. 2020 Sep 1;108(3):813–24. Available from: <https://academic.oup.com/jleukbio/article/108/3/813/6884357>
 166. Smyth LA, Ratnasothy K, Tsang JYS, Boardman D, Warley A, Lechler R, et al. CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Sep 18];43(9):2430–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23749427/>
 167. Grover P, Goel PN, Greene MI. Regulatory T Cells: Regulation of Identity and Function. *Front Immunol*. 2021 Oct 5;12:750542.
 168. Shevach EM. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002 26 [Internet]. 2002 [cited 2022 Sep 15];2(6):389–400. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri821>
 169. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2022 Sep 15];21(2):137–48. Available from: <http://www.cell.com/article/S1074761304002092/fulltext>
 170. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005 54 [Internet]. 2005 Mar 18 [cited 2022 Sep 15];5(4):263–74. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1586>
 171. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005 64 [Internet]. 2005 Mar 22 [cited 2022 Sep 15];6(4):345–52. Available from:

- <https://www.nature.com/articles/n1178>
172. Kretschmer K, Apostolou I, Jaeckel E, Khazaie K, Von Boehmer H. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Jul 19];212:163–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16903913/>
 173. Lafaille MAC de, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. CD25⁻ T Cells Generate CD25⁺Foxp3⁺ Regulatory T Cells by Peripheral Expansion. *J Immunol* [Internet]. 2004 Dec 15 [cited 2022 Sep 16];173(12):7259–68. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/173/12/7259>
 174. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, Pallone F, Galle PR, Neurath MF. Cutting Edge: TGF- β Induces a Regulatory Phenotype in CD4⁺CD25⁻ T Cells through Foxp3 Induction and Down-Regulation of Smad7. *J Immunol* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Sep 16];172(9):5149–53. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/172/9/5149>
 175. Liang S, Alard P, Zhao Y, Parnell S, Clark SL, Kosiewicz MM. Conversion of CD4⁺CD25⁻ cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J Exp Med* [Internet]. 2005 Jan 3 [cited 2022 Sep 16];201(1):127–37. Available from: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20041201
 176. Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and Induced CD4⁺CD25⁺ Cells Educate CD4⁺CD25⁻ Cells to Develop Suppressive Activity: The Role of IL-2, TGF- β , and IL-10. *J Immunol* [Internet]. 2004 May 1 [cited 2022 Sep 21];172(9):5213–21. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/172/9/5213>
 177. Fu S, Zhang N, Yopp AC, Chen D, Mao M, Chen D, et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant* [Internet]. 2004 Oct [cited 2022 Sep 21];4(10):1614–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367216/>
 178. Chen WJ, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2022 Sep 18];198(12):1875–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14676299/>
 179. Rao PE, Petrone AL, Ponath PD. Differentiation and Expansion of T Cells with Regulatory Function from Human Peripheral Lymphocytes by Stimulation in the Presence of TGF- β . *J Immunol* [Internet]. 2005 Feb 1 [cited 2022 Sep 21];174(3):1446–55. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/174/3/1446>

180. Park HB, Paik DJ, Jang E, Hong S, Youn J. Acquisition of anergic and suppressive activities in transforming growth factor- β -costimulated CD4⁺CD25⁻ T cells. *Int Immunol* [Internet]. 2004 Aug 1 [cited 2022 Sep 21];16(8):1203–13. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/16/8/1203/865699>
181. Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A Role for TGF- β in the Generation and Expansion of CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells from Human Peripheral Blood. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jun 15 [cited 2022 Sep 21];166(12):7282–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/166/12/7282>
182. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation Ex Vivo of TGF- β -Producing Regulatory T Cells from CD4⁺CD25⁻ Precursors. *J Immunol* [Internet]. 2002 Oct 15 [cited 2022 Sep 21];169(8):4183–9. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/169/8/4183>
183. Gray JD, Hirokawa M, Horwitz DA. The role of transforming growth factor beta in the generation of suppression: an interaction between CD8⁺ T and NK cells. *J Exp Med* [Internet]. 1994 Nov 1 [cited 2022 Sep 21];180(5):1937–42. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/180/5/1937/1105845/1937.pdf>
184. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Sep 15];299(5609):981–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12522256/>
185. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003 44 [Internet]. 2003 Mar 3 [cited 2022 Sep 15];4(4):330–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni904>
186. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003 44 [Internet]. 2003 Mar 3 [cited 2022 Sep 15];4(4):337–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/ni909>
187. Papiernik M, De Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Pénit C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol* [Internet]. 1998 Apr 1 [cited 2022 Sep 21];10(4):371–8. Available from: <https://academic.oup.com/intimm/article/10/4/371/667662>
188. Almeida ARM, Legrand N, Papiernik M, Freitas AA. Homeostasis of Peripheral CD4⁺ T Cells: IL-2R α and IL-2 Shape a Population of Regulatory Cells That Controls CD4⁺ T Cell Numbers. *J Immunol* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2022 Sep 21];169(9):4850–60. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/169/9/4850>

189. Furtado GC, De Curotto Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function. *J Exp Med* [Internet]. 2002 Sep 16 [cited 2022 Sep 21];196(6):851–7. Available from: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20020190>
190. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):723–35.
191. Bayer AL, Yu A, Adeegbe D, Malek TR. Essential role for interleukin-2 for CD4+CD25+ T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med* [Internet]. 2005 Mar 7 [cited 2022 Sep 21];201(5):769–77. Available from: www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.20041179
192. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4+CD25+ T Cell Suppressor Function. *J Immunol* [Internet]. 2004 Jun 1 [cited 2022 Sep 21];172(11):6519–23. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/172/11/6519>
193. Rosa M de la, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* [Internet]. 2004 Sep 1 [cited 2022 Sep 21];34(9):2480–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.200425274>
194. Wan YY, Flavell RA. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Apr 5 [cited 2022 Sep 16];102(14):5126–31. Available from: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0501701102>
195. Yu P, Lee Y, Liu W, Krausz T, Chong A, Schreiber H, et al. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J Exp Med*. 2005 Mar 7;201(5):779–91.
196. Seo N, Hayakawa S, Takigawa M, Tokura Y. Interleukin-10 expressed at early tumour sites induces subsequent generation of CD4+ T-regulatory cells and systemic collapse of antitumour immunity. *Immunology* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2022 Sep 16];103(4):449–57. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2567.2001.01279.x>
197. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* [Internet]. 2001 May 1 [cited 2022 Sep 21];166(9):5530–9. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11313392/>
198. Han Y, Dong Y, Yang Q, Xu W, Jiang S, Yu Z, et al. Acute Myeloid Leukemia Cells Express ICOS Ligand to Promote the Expansion of Regulatory T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Sep 26 [cited 2022 Jul 20];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30319662/>
 199. Li A hua, Qiu G qiang, Gu W ying, Ling Y, Weng K zhi, Tan Q, et al. [Expression of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the patients with acute lymphocytic leukemia]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2022 Sep 21];23(5):439–42. Available from: <https://europepmc.org/article/med/17488606>
 200. Zheng RH, Yu BD, Zheng LX, Wang CY, Qin PF, Luo XD, et al. [Changes of T Cell Subsets and Their Relationship with Clinical Features and Prognosis in Patients with Acute Leukemia]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Jul 20];26(5):1309–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30295243/>
 201. Darwish NM, El Asady RS, Maged Amin M, Abdel Monem AM, Salah MA. The Role of Regulatory T cell in acute leukemia and associated febrile infections. *Int J Adv Res Biol Sci* [Internet]. 2015 Apr 10;2(4):306–20. Available from: <http://www.ijarbs.com/pdfcopy/apr2015/ijarbs39.pdf>
 202. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, Md Noor S, Osman R, Abdul-Jalil M, et al. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients. *Hematology* [Internet]. 2016 Apr 20 [cited 2022 Sep 21];21(4):206–12. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10245332.2015.1101965>
 203. SALEM ML, Abdou S, El-Shanshory M, Attia M, Zidan AA, Sobhy S, et al. Increases in the numbers of cells with the phenotype of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Immunol*. 2016;196(1 Supplement).
 204. Bryniarski K, Ptak W, Jayakumar A, Püllmann K, Caplan MJ, Chairoungdua A, et al. Antigen-specific, antibody-coated, exosome-like nanovesicles deliver suppressor T-cell microRNA-150 to effector T cells to inhibit contact sensitivity. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jun 27];132(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727037/>
 205. Smyth LA, Ratnasothy K, Tsang JYS, Boardman D, Warley A, Lechler R, et al. CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol* [Internet]. 2013 [cited 2022 Jun

- 27];43(9):2430–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23749427/>
206. Xie Y, Zhang X, Zhao T, Li W, Xiang J. Natural CD8⁺25⁺ regulatory T cell-secreted exosomes capable of suppressing cytotoxic T lymphocyte-mediated immunity against B16 melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2013 Aug 16 [cited 2022 Jun 27];438(1):152–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23876314/>
207. Yu X, Huang C, Song B, Xiao Y, Fang M, Feng J, et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells-derived exosomes prolonged kidney allograft survival in a rat model. *Cell Immunol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2022 Jun 27];285(1–2):62–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24095986/>
208. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer Exosomes Express CD39 and CD73, Which Suppress T Cells through Adenosine Production. *J Immunol* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2022 Sep 22];187(2):676–83. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/187/2/676>
209. Vergani E, Daveri E, Vallacchi V, Bergamaschi L, Lalli L, Castelli C, et al. Extracellular vesicles in anti-tumor immunity. *Semin Cancer Biol*. 2021 Sep 9;
210. Hu H, Wu J, Cao C, Ma L. Exosomes derived from regulatory T cells ameliorate acute myocardial infarction by promoting macrophage M2 polarization. *IUBMB Life* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2022 Jun 27];72(11):2409–19. Available from: <https://onlinelibrary-wiley.ez2.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1002/iub.2364>
211. Gholipour E, Kahroba H, Soltani N, Samadi P, Sarvarian P, Vakili-Samiani S, et al. Paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia-derived exosomes regulate immune function in human T cells. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2022 Sep 22];26(16):4566–76. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jcmm.17482>
212. Sullivan JA, Tomita Y, Jankowska-Gan E, Lema DA, Arvedson MP, Nair A, et al. Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Jan 28 [cited 2022 Sep 18];30(4):1039–1051.e5. Available from: <http://www.cell.com/article/S2211124719317462/fulltext>
213. Tung SL, Fanelli G, Matthews RI, Bazoer J, Letizia M, Vizcay-Barrena G, et al. Regulatory T Cell Extracellular Vesicles Modify T-Effector Cell Cytokine Production and Protect Against Human Skin Allograft Damage. *Front Cell Dev Biol*. 2020 May 20;8:317.
214. Sullivan JA, Tomita Y, Jankowska-Gan E, Lema DA, Arvedson MP, Nair A, et al. Treg-Cell-Derived IL-35-Coated Extracellular Vesicles Promote Infectious Tolerance.

- Cell Rep. 2020 Jan 28;30(4):1039-1051.e5.
215. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nat* 2006 4417090 [Internet]. 2006 Apr 30 [cited 2022 Sep 23];441(7090):235–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature04753>
 216. Gao Z, Gao Y, Li Z, Chen Z, Lu D, Tsun A, et al. Synergy between IL-6 and TGF- β signaling promotes FOXP3 degradation. *Int J Clin Exp Pathol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Sep 23];5(7):626. Available from: </pmc/articles/PMC3438759/>
 217. Okoye IS, Coomes SM, Pelly VS, Czieso S, Papayannopoulos V, Tolmachova T, et al. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. *Immunity* [Internet]. 2014 Jul 17 [cited 2022 Jun 27];41(1):89–103. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25035954/>
 218. Chen X, Liang H, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs from tumor cells can suppress immune function. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Apr 2 [cited 2022 Sep 18];5(4). Available from: </pmc/articles/PMC4839375/>
 219. Seo N, Akiyoshi K, Shiku H. Exosome-mediated regulation of tumor immunology. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2022 Sep 18];109(10):2998. Available from: </pmc/articles/PMC6172045/>
 220. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2022 Sep 16];8(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27141051/>
 221. Goebel EJ, Hart KN, McCoy JC, Thompson TB. Structural biology of the TGF β family. *Exp Biol Med (Maywood)* [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2022 Sep 16];244(17):1530–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31594405/>
 222. Xu L, Kitani A, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF- β -induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol* 2010 33 [Internet]. 2010 Mar 10 [cited 2022 Jun 27];3(3):230–8. Available from: <https://www.nature.com/articles/mi20107>
 223. Moo-Young TA, Larson JW, Belt BA, Tan MC, Hawkins WG, Eberlein TJ, et al. Tumor derived TGF-Beta mediates conversion of CD4+Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer. *J Immunother* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Jun 27];32(1):12–21. Available from: </pmc/articles/PMC3862184/>
 224. Yang Z, Qi Y, Lai N, Zhang J, Chen Z, Liu M, et al. Notch1 signaling in melanoma cells promoted tumor-induced immunosuppression via upregulation of TGF- β 1. *J Exp*

- Clin Cancer Res [Internet]. 2018 Jan 4 [cited 2022 Jun 27];37(1):1–13. Available from: <https://jccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-017-0664-4>
225. Yu HM, Yang JL, Jiao SC, Wang JD, Li Y. TGF- β 1 precursor and CD8 are potential prognostic and predictive markers in operated breast cancer. *J Huazhong Univ Sci Technol [Medical Sci]* 2014 341 [Internet]. 2014 Feb 6 [cited 2022 Jun 27];34(1):51–8. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11596-014-1231-2>
226. Nakazawa N, Yokobori T, Kaira K, Turtoi A, Baatar S, Gombodorj N, et al. High Stromal TGFBI in Lung Cancer and Intratumoral CD8-Positive T Cells were Associated with Poor Prognosis and Therapeutic Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors. *Ann Surg Oncol* 2019 273 [Internet]. 2019 Sep 30 [cited 2022 Jun 27];27(3):933–42. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1245/s10434-019-07878-8>
227. Zloza A, Jagoda MC, Lyons GE, Graves MC, Kohlhapp FJ, O’Sullivan JA, et al. CD8 Co-receptor promotes susceptibility of CD8+ T cells to transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated suppression. *Cancer Immunol Immunother* 2010 602 [Internet]. 2010 Dec 31 [cited 2022 Jun 27];60(2):291–7. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-010-0962-6>
228. Nara N, Tohda S, Nagata K, Suzuki T, Yamashita Y. Inhibition of the in vitro growth of blast progenitors from acute myeloblastic leukemia patients by transforming growth factor-beta (TGF-beta). *Leukemia* [Internet]. 1989 Aug 1 [cited 2022 Jun 28];3(8):572–7. Available from: <https://europepmc.org/article/med/2473359>
229. Keller JR, Mantel C, Sing GK, Ellingsworth LR, Ruscetti SK, Ruscetti FW. Transforming growth factor beta 1 selectively regulates early murine hematopoietic progenitors and inhibits the growth of IL-3-dependent myeloid leukemia cell lines. *J Exp Med* [Internet]. 1988 Aug 1 [cited 2022 Jun 28];168(2):737–50. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/168/2/737/1098360/737.pdf>
230. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Bañas H, 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*. 2013 Mar 1;61(3):885–91.
231. Wu Y, Chen P, Huang HF, Huang MJ, Chen YZ. Reduction of transforming growth factor- β 1 expression in leukemia and its possible role in leukemia development. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2012 Jan [cited 2022 Jun 28];53(1):145–51. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2011.603446>

232. Dubois CM, Ruscetti FW, Palaszynski EW, Falk LA, Oppenheim JJ, Keller JR. Transforming growth factor beta is a potent inhibitor of interleukin 1 (IL-1) receptor expression: proposed mechanism of inhibition of IL-1 action. *J Exp Med* [Internet]. 1990 Sep 1 [cited 2022 Jun 28];172(3):737–44. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/172/3/737/1100736/737.pdf>
233. Wierenga ATJ, Schuringa JJ, Eggen BJJ, Kruijer W, Vellenga E. Downregulation of IL-6-induced STAT3 tyrosine phosphorylation by TGF- β 1 is mediated by caspase-dependent and -independent processes. *Leuk* 2002 164 [Internet]. 2002 Apr 16 [cited 2022 Jun 28];16(4):675–82. Available from: <https://www.nature.com/articles/2402425>
234. Montenegro DE, Franklin T, Moscinski LC, Zuckerman KS, Hu XT. TGF β inhibits GM-CSF-induced phosphorylation of ERK and MEK in human myeloid leukaemia cell lines via inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-k). *Cell Prolif* [Internet]. 2009 Feb 1 [cited 2022 Jun 28];42(1):1–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2184.2008.00567.x>
235. De Vos S, Ludwig WD, Bettelheim P, Gruss HJ, Herrmann F. Transforming Growth Factor-1 Interferes with the Proliferation-inducing Activity of Stem Cell Factor in Myelogenous Leukemia Blasts through Functional Down-regulation of the c-kit Proto-oncogene Product. *Cancer Res* [Internet]. 1993 [cited 2022 Jun 28];53(15):3638–42. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/53/15/3638/499027/Transforming-Growth-Factor-1-Interferes-with-the>
236. Dong M, Blobel GC. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4589–96.
237. Elliott RL, Blobel GC. Role of transforming growth factor beta in human cancer. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 21;23(9):2078–93.
238. El-maadawy EA, Elshal MF, Bakry RM, Moussa MM, El-Naby SH, Talaat RM. Regulation of CD4+CD25+FOXP3+ cells in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL): Implication of cytokines and miRNAs. *Mol Immunol*. 2020 Aug 1;124:1–8.
239. Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2010 Oct [cited 2022 Sep 16];21(5):331–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21115385/>
240. Saraiva M, O’Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* 2010 103 [Internet]. 2010 Feb 15 [cited 2022 Sep 22];10(3):170–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri2711>

241. Windsor WT, Syto R, Tsarbopoulos A, Zhang R, Durkin J, Baldwin S, et al. Disulfide Bond Assignments and Secondary Structure Analysis of Human and Murine Interleukin 10. *Biochemistry* [Internet]. 1993 [cited 2022 Sep 18];32(34):8807–15. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00085a011>
242. Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10. *J Immunol* [Internet]. 1996 [cited 2022 Sep 18];157(8):3672–80. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/157/8/3672.short>
243. Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res*. 1994;13(1):47–54.
244. Joyce DA, Gibbons DP, Green P, Steer JH, Feldmann M, Brennan FM. Two inhibitors of pro-inflammatory cytokine release, interleukin-10 and interleukin-4, have contrasting effects on release of soluble p75 tumor necrosis factor receptor by cultured monocytes. *Eur J Immunol* [Internet]. 1994 Nov 1 [cited 2022 Sep 18];24(11):2699–705. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.1830241119>
245. Chen N, Xu Y, Mou J, Rao Q, Xing H, Tian Z, et al. Targeting of IL-10R on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood Cancer J*. 2021 Aug;11(8):1–11.
246. WU H, LI P, SHAO N, MA J, JI M, SUN X, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- β in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2023 Mar 18];3(5):1119–23. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.614/abstract>
247. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Campos C, Gayoso I, Arcos MJ, Bañas H, 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* [Internet]. 2013 Mar;61(3):885–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613000021>
248. Sun Y xin, Kong H li, Liu C fang, Yu S, Tian T, Ma D xin, et al. The imbalanced profile and clinical significance of T helper associated cytokines in bone marrow microenvironment of the patients with acute myeloid leukemia. *Hum Immunol* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Mar 18];75(2):113–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24269703/>
249. Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic

- B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int J Hematol* [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 18];62(2):99–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8590779/>
250. Alhakeem SS, McKenna MK, Gachuki BW, Rangnekar VR, Byrd JC, Muthusamy N, et al. The role of IL-10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cell survival. *J Immunol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Dec 9];196(1_Supplement):211.17-211.17. Available from: https://journals.aai.org/jimmunol/article/196/1_Supplement/211.17/57937/The-role-of-IL-10-in-B-cell-chronic-lymphocytic
251. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia–Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J Immunol* [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2023 Mar 18];200(12):4180–9. Available from: </pmc/articles/PMC6555426/>
252. Rivas JR, Liu Y, Alhakeem SS, Eckenrode JM, Marti F, Collard JP, et al. Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021 Nov 17 [cited 2023 Mar 18];35(11):3188–200. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01217-1>
253. DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* [Internet]. 2013 Jan 13 [cited 2022 Dec 13];27(1):170–82. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012165>
254. Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J Exp Med* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2023 Mar 18];178(5):1473–81. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/178/5/1473/1104278/1473.pdf>
255. Silva FS, Barros-Lima A, Souza-Barros M, Crespo-Neto JA, Santos VGR, Pereira DS, et al. A dual-role for IL-10: From leukemogenesis to the tumor progression in acute lymphoblastic leukemia. *Cytokine* [Internet]. 2023 Nov;171:156371. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466623002491>
256. Wu H, Li P, Shao N, Ma J, Ji M, Sun X, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- β in acute myeloid leukemia. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2022 Jun 27];3(5):1119–23. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.614/abstract>

257. Mahmood EF, Ahmed AA. Evaluation of interleukin-35 and interleukin-10 in adult acute myeloid leukemia patients before and after induction chemotherapy. *Iraqi J Hematol* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 27];9(2):82. Available from: <https://www.ijhonline.org/article.asp?issn=2072-8069;year=2020;volume=9;issue=2;spage=82;epage=86;aulast=Mahmood>
258. Yuan X, Wang G, Mai H, Xiao H, Wang Y, Li C, et al. Effects of Notch1 signaling on histone acetylation of Foxp3 gene in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Chinese J Microbiol Immunol* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 22];41(11):829–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.3760/cma.j.cn112309-20210226-00067>
259. Li-hong W, Guo-bing W, Fei-qiu W, Si-xi L, Ying W, Chang-gang L. Changes and significances of inducible IL-35 producing regulatory T cells in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Chinese J Evidence-Based Pediatr* [Internet]. 2015 Jun 5 [cited 2022 Sep 22];10(3):227. Available from: <http://www.cjebp.net/EN/>
260. Soung YH, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers* 2017, Vol 9, Page 8 [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2022 Jun 21];9(1):8. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/9/1/8/htm>
261. Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumor Biol* 2015 3612 [Internet]. 2015 Jul 9 [cited 2022 Jun 21];36(12):9739–52. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13277-015-3741-3>
262. Szczepanski MJ, Szajnik M, Welsh A, Whiteside TL, Boyiadzis M. Blast-derived microvesicles in sera from patients with acute myeloid leukemia suppress natural killer cell function via membrane-associated transforming growth factor- β 1. *Haematologica* [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2022 Jun 21];96(9):1302–9. Available from: <https://haematologica.org/article/view/6067>
263. Van Etten RA. Aberrant cytokine signaling in leukemia. *Oncogene* 2007 2647 [Internet]. 2007 Oct 15 [cited 2022 Jul 19];26(47):6738–49. Available from: <https://www.nature.com/articles/1210758>
264. Zhang XL, Komada Y, Chipeta J, Li QS, Inaba H, Azuma E, et al. Intracellular cytokine profile of T cells from children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Immunol Immunother* 2000 493 [Internet]. 2000 [cited 2022 Jul 19];49(3):165–72. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s002620050616>

265. Łuczyński W, Stasiak-Barmuta A, Krawczuk-Rybak M, Malinowska I. Assessment of selected co-stimulatory, adhesion and activatory molecules and cytokines of Th(1)/Th(2) balance in acute lymphoblastic leukemia in children. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2022 Jul 19];53(4):357–63. Available from: <https://europepmc.org/article/med/16088321>
266. Magalhães-Gama F, Kerr MWA, De Araújo ND, Ibiapina HNS, Neves JCF, Hanna FSA, et al. Imbalance of Chemokines and Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment of Children with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Oncol*. 2021;2021.
267. Kerr MWA, Magalhães-Gama F, Ibiapina HNS, Hanna FSA, Xabregas LA, Alves EB, et al. Bone Marrow Soluble Immunological Mediators as Clinical Prognosis Biomarkers in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing Induction Therapy. *Front Oncol*. 2021 Sep 27;11:3631.
268. Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J Pediatr* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Jun 21];60(5):129. Available from: [/pmc/articles/PMC5461276/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24405087/)
269. Tabe Y, Konopleva M. Advances in understanding the leukaemia microenvironment. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Mar [cited 2022 Jun 16];164(6):767–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24405087/>
270. O’Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004 108 [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 Aug 16];10(8):801–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm0804-801>
271. Hassuneh MR, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. Role of interleukin-10 in the regulation of tumorigenicity of a T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2013 Apr [cited 2022 Jun 28];54(4):827–34. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2012.726721>
272. Ouyang W, O’Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. 2019 Apr 16;50(4):871–91.
273. Liu SX, Xiao HR, Wang GB, Chen XW, Li CG, Mai HR, et al. Preliminary investigation on the abnormal mechanism of cd4+foxp3+cd25high regulatory t cells in pediatric b-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2022 Jun 15];16(2):1433–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30116392>
274. Zahran AM, Shibl A, Rayan A, Mohamed MAEH, Osman AMM, Saad K, et al.

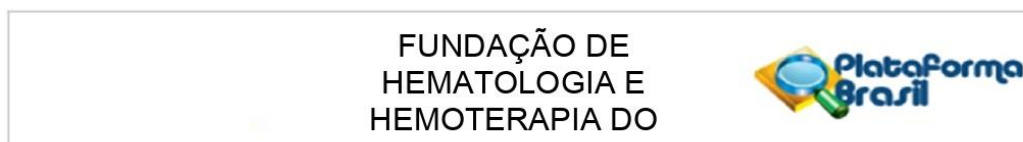
- Increase in polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and regulatory T-cells in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep*. 2021 Dec 1;11(1).
275. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* [Internet]. 2018 Mar;48(3):434–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761318300906>
276. Salama AKS, Hodi FS. Cytotoxic T-Lymphocyte–Associated Antigen-4. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Jul 15;17(14):4622–8. Available from: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/17/14/4622/12169/Cytotoxic-T-Lymphocyte-Associated-Antigen-4CTLA-4>
277. Niedzwieck M, Budzilo O, Adamkiewicz-Drozynska E, Pawlik-Gwozdecka D, Zielinski M, Maciejka-Kemblowska L, et al. [CD4^{sup.}][CD25^{sup.}high][CD127^{sup.}low/-][FoxP₃^{sup.}+] Regulatory T-Cell Population in Acute Leukemias: A Review of the Literature. *J Immunol Res* [Internet]. 2019 Mar 31 [cited 2022 Sep 21];2019. Available from: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=HRC&sw=w&issn=23148861&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA623254146&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
278. Curran EK, Godfrey J, Kline J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends Immunol* [Internet]. 2017 Jul;38(7):513–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471490617300753>
279. D’Amico G, Vulcano M, Bugarin C, Bianchi G, Pirovano G, Bonamino M, et al. CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10–producing, IL-12–defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood* [Internet]. 2004 Aug 1;104(3):744–51. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/104/3/744/18510/CD40-activation-of-BCPALL-cells-generates>
280. Naghavi Alhosseini M, Palazzo M, Cari L, Ronchetti S, Migliorati G, Nocentini G. Overexpression of Potential Markers of Regulatory and Exhausted CD8⁺ T Cells in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Feb 24;24(5):4526. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4526>
281. Kurachi M. CD8⁺ T cell exhaustion. *Semin Immunopathol* [Internet]. 2019 May 15;41(3):327–37. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00281-019-00744-5>
282. Wu ZL, Hu GY, Chen FX, Lu HM, Wu ZL, Li HM, et al. [Change of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells and NK Cells in peripheral blood of children with acute leukemia

- and its possible significance in tumor immunity]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* [Internet]. 2010 Jun 1 [cited 2022 Sep 21];18(3):709–13. Available from: <https://europepmc.org/article/med/20561434>
283. Liu S, Xiao H, Wang G, Chen X, Li C, Mai H, et al. Preliminary investigation on the abnormal mechanism of CD4+FOXP3+CD25^{high} regulatory T cells in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Ther Med* [Internet]. 2018 Jun 19; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2018.6326>

ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo I. Carta de aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação HEMOAM.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica

Pesquisador: Allyson Guimarães da Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51257921.2.0000.0009

Instituição Proponente: Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.982.395

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, do tipo longitudinal, retrospectivo e prospectivo para avaliação dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com LLA, durante a terapia de indução da remissão e terapia de consolidação da remissão dos protocolos de tratamento. As amostras serão coletadas na Fundação HEMOAM, durante os procedimentos de rotina dos pacientes. As coletas ocorrerão em 4 momentos da quimioterapia de remissão, referidos como: diagnóstico (D0), dia 15 da terapia de indução da remissão (D15), final da terapia de indução da remissão (D35) e no dia 84 da terapia de consolidação da remissão (D84) dos protocolos de tratamento, sendo coletados 2 mL de MO e 3mL de SP em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) pela Equipe Médica da Fundação HEMOAM. Serão incluídas no estudo 158 amostras de DNA e plasma de pacientes com LLA criopreservadas e 203 amostras de DNA e plasma de doadores de sangue. A identificação de biomarcadores imunológicos como instrumento preditivo de prognóstico e resposta terapêutica fornecerá meios para identificar os pacientes que apresentarão uma boa resposta à quimioterapia ou a ausência dela, indicando neste último caso, a necessidade de intervenções terapêuticas alternativas ou mais assertivas de maneira antecipada, diminuindo a duração da exposição a terapias ineficazes e potencialmente tóxicas, o que proporcionará melhores resultados e maior qualidade de vida aos pacientes.

Endereço: Av. Constantino Nery, 4397, Bloco A, Sala do CEP-HEMOAM (sala 13)
Bairro: Chapada **CEP:** 69.050-002
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)3655-0114 **Fax:** (92)3655-0112 **E-mail:** cep@hemoam.am.gov.br

Anexo II. Protocolo de imunofenotipagem de linfócitos Treg por citometria de fluxo (CF)

PROTOCOLO DE IMUNOFENOTIPAGEM DE LINFÓCITOS TREG POR CITOMETRIA DE FLUXO (CF)

Tubo	Parâmetros	FITC	PE	PerCP	APC
1	Controle (-)	-	-	-	-
2	Linfócitos Treg	CD25	CD4	CD3	Foxp3

PROCEDIMENTOS:

1. Para este procedimento utilizar 1 ml de sangue periférico em tubo contendo EDTA como anticoagulante para a caracterização do perfil celular utilizando a técnica de CF.
2. As células devem ser marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se fixam em epítomos específicos e são captadas pelo CF para a caracterização das populações celulares.
3. Inicialmente, identificar e distribuir os anticorpos de superfície em 2 tubos de citometria, em seguida adicionado 100 µL de sangue total e 200 µL nos tubos 1 e 2.
4. Homogeneizar e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente (TA) e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, realizar a lise das hemácias com o uso da solução de lise, diluída 10 vezes em água destilada (AD).
5. Os tubos devem ser novamente homogeneizados e incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Passado a fase de incubação, os tubos devem ser centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos.
6. Em seguida o sobrenadante deve ser descartado e acrescentado 2 mL de PBS-W (8,0 g de NaCl, 1,16 g de Na₂HPO₄, 0,2 g de KH₂PO₄, 0,2 g de KCl e 5,0 g de BSA, qsp 1L H₂O destilada, pH: 7,2) para lavagem do pellet formado. Os tubos devem ser homogeneizados e centrifugados novamente.
7. Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser descartado e adicionado 300 µL de PBS-W nos tubos sendo armazenados em geladeira até o momento da leitura pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur®.
8. Dando continuidade na marcação intracelular, deve ser adicionado 2 ml de PBS-P (8,0g de NaCl, 1,16g de Na₂HPO₄, 0,2g de KH₂PO₄, 0,2g de KCl, 5,0g de BSA e 5,0g de Saponina, qsp 1L H₂O destilada, pH:7,2) nos tubos 1 e 2 para permeabilização celular, homogeneizar, incubar por 10 minutos a TA e ao abrigo da luz.
9. Posteriormente deve-se centrifugar em 1500 rpm por 5 minutos e descartado o sobrenadante.
10. O pellet deve ser ressuspensionado em 2 ml de PBS-W, homogeneizado, centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, descartado o sobrenadante, adicionar 100 µL de PBS-P no tubo 1 e 10 µL do anticorpo de FoxP3 diluído em PBS-P (1:10) no tubo 2.
11. Os tubos devem ser incubados por 20 minutos ao abrigo da luz em TA.
12. Após o período de incubação das células, deve-se lavar com 2 ml de PBS-W, homogeneizar, centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante e ressuspender o pellet em 300 µL de PBS-W, homogeneizar e armazenar em geladeira até o momento da leitura.

Anexo III. Protocolo de purificação e imunofenotipagem de microvesículas.

PROTOCOLO SIMPLIFICADO PURIFICAÇÃO E IMUNOFENOTIPAGEM DE MICROVESÍCULAS

PARTE 1 - ORGANIZAÇÃO

1. Separar os materiais, organizar o fluxo e identificar os tubos (ver lista de materiais)

Tubo	MVs	FITC	PE	PerCP	APC
1	Controle (Anexina V)	Anex V	-	-	-
2	MVs-Treg	Anex V	CD152	CD4	CD25

EM DUPLICATA

Fileira A: com anticorpos

Fileira B: sem anticorpos (usada para preparação da amostra)

Controle de todos os Anticorpos

2. Descongelar a amostra de soro em banho maria 36°C (+/- 15 minutos)
3. Aliquotar 700µl de soro em eppendorf e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos (TA), freio 0
4. Enquanto o plasma centrifuga, aliquotar 30µl de cada AC e centrifugar a 13.000 rpm por 10 min (freio 1)

PARTE 2 – PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

1. Tampão Citrato Heparina

- 2mL de citrato (aprox, 10 tubos de coleta) + 4µl de heparina
- Completar o volume para 20mL com PBS 1X

2. Tampão Anexina

- Diluir o Buffer de Anexina (kit)

Obs: 30mL = 48 poços / tubos

6mL = 16 tubos / poços + volume final

- 5,4ml de água de injeção + 600µl Buffer (9 partes de água + 1 parte de buffer = Diluição 1/10)

PARTE 3 – IMUNOFENOTIPAGEM

Preparação especial da Amostra

1. Marcar todos os tubos 1 a 4 com os anticorpos do painel (2 μ l de cada AC, com exceção do CD235a apenas 1 μ l)
Obs: Em duplicata, primeira fileira marcada com AC. Segunda fileira limpa (tubos usados para a preparação da amostra)
2. Marcar os tubos controle com os AC correspondentes (2 μ l de cada)
3. Aliquotar 300 μ l do tampão Citrato Heparina (tubos amostra – 1 a 4 limpos, sem AC)
4. Adicionar 100 μ l de amostra em cada tubo amostra (1 a 4) (coletar do sobrenadante!)
5. Centrifugar a 15.000 rpm por 90 min a 15°C

Após a centrifugação

6. Remover o sobrenadante (aproximadamente 350 μ l)
7. Adicionar 100 μ l de tampão anexina (irá formar uma suspensão, pellet + Mvs)
8. Desta suspensão, retirar 100 μ l e colocar nos tubos marcados (tubos de 1 a 4, com anticorpos)
9. Incubar por 30 min, ao abrigo da luz (TA)
10. Adicionar 300 μ l de tampão anexina em todos os tubos (1 a 17)
11. Analisar no citômetro, 2 minutos e meio por amostra

Anexo IV. Colaboração em produção científica no artigo: *The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications* (doi: 10.3389/fimmu.2022.1071188).



OPEN ACCESS

EDITED BY
Shenghui Zhang,
First Affiliated Hospital of Wenzhou
Medical University, China

REVIEWED BY
Heiko Bruns,
University Hospital Erlangen, Germany
ANM Nazmul Khan,
University at Buffalo, United States

*CORRESPONDENCE
Allyson Guimarães Costa
allyson.gui.costa@gmail.com

[†]These authors have contributed
equally to this work

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 15 October 2022
ACCEPTED 14 November 2022
PUBLISHED 01 December 2022

CITATION
Magalhães-Gama F, Alves-Hanna FS,
Araújo ND, Barros MS, Silva FS,
Catão CLS, Moraes JS, Freitas IC,
Tarragó AM, Malheiro A,
Teixeira-Carvalho A and Costa AG
(2022) The Yin-Yang of myeloid cells
in the leukemic microenvironment:
Immunological role and clinical
implications.
Front. Immunol. 13:1071188.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1071188

COPYRIGHT
© 2022 Magalhães-Gama,
Alves-Hanna, Araújo, Barros, Silva,
Catão, Moraes, Freitas, Tarragó,
Malheiro, Teixeira-Carvalho and Costa.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original author
(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications

Fábio Magalhães-Gama^{1,2,3†}, Fabíola Silva Alves-Hanna^{1,4†},
Nilberto Dias Araújo^{1,4}, Mateus Souza Barros^{1,4},
Flavio Souza Silva^{1,4}, Claudio Lucas Santos Catão^{1,5},
Júlia Santos Moraes¹, Izabela Cabral Freitas¹,
Andréa Monteiro Tarragó^{1,4,5}, Adriana Malheiro^{1,4,5},
Andréa Teixeira-Carvalho^{1,2,3}
and Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5,6*}

¹Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil, ³Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração, Instituto René Rachou - FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, ⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ⁶Escola de Enfermagem de Manaus, UFAM, Manaus, Brazil

The leukemic microenvironment has a high diversity of immune cells that are phenotypically and functionally distinct. However, our understanding of the biology, immunology, and clinical implications underlying these cells remains poorly investigated. Among the resident immune cells that can infiltrate the leukemic microenvironment are myeloid cells, which correspond to a heterogeneous cell group of the innate immune system. They encompass populations of neutrophils, macrophages, and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). These cells can be abundant in different tissues and, in the leukemic microenvironment, are associated with the clinical outcome of the patient, acting dichotomously to contribute to leukemic progression or stimulate antitumor immune responses. In this review, we detail the current evidence and the many mechanisms that indicate that the activation of different myeloid cell populations may contribute to immunosuppression, survival, or metastatic dissemination, as well as in immunosurveillance and stimulation of specific cytotoxic responses. Furthermore, we broadly discuss the interactions of tumor-associated neutrophils and macrophages (TANs and TAMs, respectively) and MDSCs in the leukemic microenvironment. Finally, we provide new perspectives on the potential of myeloid cell subpopulations as

Anexo V. Colaboração em produção científica no artigo: *Exploring the Profile of Cell Populations and Soluble Immunological Mediators in Bothrops atrox* Envenomations (doi: 10.3390/toxins15030196).



Article

Exploring the Profile of Cell Populations and Soluble Immunological Mediators in *Bothrops atrox* Envenomations

Kerolaine Fonseca Coelho^{1,2,†}, Juliana Costa Ferreira Neves^{1,2,†}, Hiochelson Najibe Santos Ibiapina^{1,2}, Fábio Magalhães-Gama^{3,4}, Fabiane Bianca Albuquerque Barbosa^{1,2}, Flavio Souza Silva^{4,5}, Irmgard Alicia María Wellmann^{1,2}, Jacqueline Almeida Gonçalves Sachett^{1,2,6}, Andréa Monteiro Tarragó^{4,5,7}, Luiz Carlos Lima Ferreira^{1,2}, Adriana Malheiro^{1,4,5,7}, Wuelton Marcelo Monteiro^{1,2} and Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5,7,8,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus 69040-000, AM, Brazil

² Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus 69040-000, AM, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Minas), Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil

⁴ Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus 69050-001, AM, Brazil

⁵ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus 69067-005, AM, Brazil

⁶ Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Alfredo da Matta (FUAM), Manaus 69065-130, AM, Brazil

⁷ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus 69050-001, AM, Brazil

⁸ Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus 69057-070, AM, Brazil

* Correspondence: allyson.gui.costa@gmail.com

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Coelho, K.F.; Neves, J.C.F.; Ibiapina, H.N.S.; Magalhães-Gama, F.; Barbosa, F.B.A.; Silva, F.S.; Wellmann, I.A.M.; Sachett, J.A.G.; Tarragó, A.M.; Ferreira, L.C.L.; et al. Exploring the Profile of Cell Populations and Soluble Immunological Mediators in *Bothrops atrox* Envenomations. *Toxins* **2023**, *15*, 196. <https://doi.org/10.3390/toxins15030196>

Received: 27 January 2023

Revised: 18 February 2023

Accepted: 20 February 2023

Published: 4 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: *Bothrops atrox* envenomations are common in the Brazilian Amazon. The venom of *B. atrox* is highly inflammatory, which results in severe local complications, including the formation of blisters. Moreover, there is little information on the immune mechanisms associated with this condition. Thus, a longitudinal study was carried out to characterize the profile of the cell populations and soluble immunological mediators in the peripheral blood and blisters in *B. atrox* patients according to their clinical manifestations (mild and severe). A similar response in both *B. atrox* patient groups (MILD and SEV) was observed, with an increase in inflammatory monocytes, NKT, and T and B cells, as well as CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, IL-1 β and IL-10, when compared with the group of healthy blood donors. After the administration of antivenom, the participation of patrolling monocytes and IL-10 in the MILD group was observed. In the SEV group, the participation of B cells was observed, with high levels of CCL2 and IL-6. In the blister exudate, a hyperinflammatory profile was observed. In conclusion, we revealed the involvement of cell populations and soluble mediators in the immune response to *B. atrox* envenomation at the local and peripheral level, which is related to the onset and extent of the inflammation/clinical manifestation.

Keywords: *Bothrops* snakebite; immune response; cell populations; chemokines; cytokines; blister

Key Contribution: Our results explore and demonstrate that cell populations and soluble mediators are important components of this inflammatory response; with a distinct profile between groups; which was differentiated according to the clinical evolution after *Bothrops atrox* snakebite.

Anexo VI. Colaboração em produção científica no artigo: *Systemic immunological profile of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia: evaluation of performance of cell populations and soluble mediators as serum biomarkers.* (doi: 10.3389/fonc.2023.1290505)



OPEN ACCESS

EDITED BY
Juan Manuel Mejía-Arangure,
Universidad Nacional Autónoma de
México, México

REVIEWED BY
Elisa Dorantes,
Federico Gómez Children's Hospital,
México
Dalia Ramírez-Ramírez,
Biomedical Research Center of East
(CIBIOR), México
JC Balandrán,
Albert Einstein College of Medicine,
United States

*CORRESPONDENCE
Allyson Guimarães Costa
allyson.gui.costa@gmail.com

†These authors have contributed equally to
this work

‡These authors share senior authorship

RECEIVED 07 September 2023
ACCEPTED 08 November 2023
PUBLISHED 01 December 2023

CITATION
Carvalho MPSS, Magalhães-Gama F,
Loiola BP, Neves JCF, Araújo ND, Silva FS,
Catão CLS, Alves EB, Pimentel JPD,
Barbosa MNS, Fraiji NA, Teixeira-
Carvalho A, Martins-Filho OA, Costa AG
and Malheiro A (2023) Systemic
immunological profile of children with B-
cell acute lymphoblastic leukemia:
performance of cell populations and
soluble mediators as serum biomarkers.
Front. Oncol. 13:1290505.
doi: 10.3389/fonc.2023.1290505

COPYRIGHT
© 2023 Carvalho, Magalhães-Gama,
Loiola, Neves, Araújo, Silva, Catão, Alves,
Pimentel, Barbosa, Fraiji, Teixeira-Carvalho,
Martins-Filho, Costa and Malheiro. This is an
open-access article distributed under the
terms of the Creative Commons Attribution
License (CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that
the original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does not
comply with these terms.

Systemic immunological profile of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia: performance of cell populations and soluble mediators as serum biomarkers

Maria Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho^{1,2†},
Fábio Magalhães-Gama^{1,3†}, Bruna Pires Loiola¹,
Juliana Costa Ferreira Neves⁴, Nilberto Dias Araújo^{1,2,5},
Flavio Souza Silva^{1,5}, Claudio Lucas Santos Catão^{1,2},
Eliana Brasil Alves^{1,6}, João Paulo Diniz Pimentel¹,
Maria Nazaré Saunier Barbosa¹, Nelson Abrahim Fraiji^{1,2},
Andréa Teixeira-Carvalho^{2,3†}, Olindo Assis Martins-Filho^{2,3†},
Allyson Guimarães Costa^{1,2,4,5,7*†} and Adriana Malheiro^{1,2,5†}

¹Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil, ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ³Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil, ⁴Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, ⁵Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, ⁶Hospital Universitário Getúlio Vargas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, ⁷Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil

Background: Children with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) have an immune imbalance that is marked by remodeling of the hematopoietic compartment, with effects on peripheral blood (PB). Although the bone marrow (BM) is the main maintenance site of malignancy, the frequency with which immune cells and molecules can be monitored is limited, thus the identification of biomarkers in PB becomes an alternative for monitoring the evolution of the disease.

Methods: Here, we characterize the systemic immunological profile in children undergoing treatment for B-ALL, and evaluate the performance of cell populations, chemokines and cytokines as potential biomarkers during clinical follow-up. For this purpose, PB samples from 20 patients with B-ALL were collected on diagnosis (D0) and during induction therapy (days 8, 15 and 35). In addition, samples from 28 children were used as a control group (CG). The cellular profile (NK and NKT-cells, Treg, CD3⁺ T, CD4⁺ T and CD8⁺ T cells) and soluble immunological mediators (CXCL8, CCL2, CXCL9, CCL5, CXCL10, IL-6, TNF, IFN- γ , IL-17A, IL-4, IL-10 and IL-2) were evaluated via flow cytometry immunophenotyping and cytometric bead array assay.

Anexo VII. Colaboração em produção científica de Resumos em Eventos Científicos

Nacionais e Internacionais:

Resumo 1: SILVA, FS; GAMA, FM; NEVES, WLL; GARCIA, NP; IBIAPINA, HNS; TARRAGÔ, AM; LEON, EB; COSTA, AG; MALHEIRO, A; DE ARAÚJO, ND. *Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) enhances the mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the peripheral blood of BALB/c mice.* In: *Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO 2022)*, 2022, São Paulo-SP., 2022. doi: 10.1016/j.htct.2022.09.506

Resumo 2: MORAES, JDS; MAGALHÃES-GAMA, F; SILVA, FS; BARROS, MS; ARAÚJO, ND; HANNA, FSA; CARVALHO, MDPSS; TARRAGÔ, AM; MALHEIRO, A; COSTA, AG. *Avaliação do perfil de anafilotoxinas em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão.* In: *Anais do Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO 2022)*, 2022, São Paulo-SP., 2022. doi: 10.1016/j.htct.2022.09.576

Resumo 3: SILVA, FS; GAMA, FM ; BARROS, MS; CATÃO, CLS; MORAES, JS; FREITAS, IC; ALVES, FS; ARAUJO, ND; CARVALHO, AT; COSTA, AG. *Immunological role of myeloid cells in the leukemic microenvironment and their clinical implications.* In: *Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022)*, 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459

Resumo 4: MORAES, JS; GAMA, FM; BARROS, MS; SILVA, FS; FREITAS, IC; ALVES, FS; TARRAGO, AM; ARAUJO, ND; MALHEIRO, A; COSTA, AG. *Association of serum levels of mannose-binding lectin with the susceptibility of infections in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia.* In: *Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022)*, 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459

Resumo 5: BARROS, MS; ROCHA, GAV; GAMA, FM; FREITAS, IC; GHEDINI, JGS; MORAES, JS; SILVA, FS; MALHEIRO, A; COSTA, AG; ARAUJO, ND. *Analysis of the frequency of bone marrow and peripheral blood-derived $\gamma\delta$ T cells in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia.* In: *Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022)*, 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459

Resumo 6: CATÃO, CLS; SILVA, FS; GAMA, FM; BARROS, MS; MORAES, JS; OLIVEIRA, EYC; OLIVEIRA, RC; ARAUJO, ND; PASSOS, LNM; COSTA, AG. *Sensitivity of techniques for detection of measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. In: Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022), 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459*

Resumo 7: GAMA, FM; SILVA, SJA; GHEDINI, JGS; SEIXAS, KB; OLIVEIRA, EYC; BARROS, MS; SILVA, FS; ARAUJO, ND; CARVALHO, AT; COSTA, AG. *The role of exosomes in cancer vaccine development: insights and new perspectives. In: Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022), 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459*

Resumo 8: GHEDINI, JGS; FREITAS, IC; GAMA, FM; BARROS, MS; MORAES, JS; SILVA, FS; TARRAGÔ, AM; MALHEIRO, A; COSTA, AG; ARAUJO, ND. *Frequency of natural killer T cells in bone marrow and peripheral blood in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia undergoing induction therapy. In: Anais do 7º Simpósio Internacional de Imunologia e Hematologia (7º ISIH 2022), 2022, Manaus, 2023. doi: 10.5281/zenodo.8061459*