

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANA BEATRIZ GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM AMOSTRAS DE
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
EM TRATAMENTO NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA**

BRASÍLIA

2024

ANA BEATRIZ GOUVEIA

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM AMOSTRAS DE
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EM
TRATAMENTO NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Monteiro de Souza

Co-orientador: Dr. Felipe Magalhães Furtado.

BRASÍLIA

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

(Obs.: esta catalogação é fornecida pela BCE/UnB – deve ser colocada exatamente como fornecida pelo bibliotecário)

Ana Beatriz Gouveia

AVALIAÇÃO DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS EM AMOSTRAS DE
MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA EM
TRATAMENTO NO HOSPITAL DA CRIANÇA DE BRASÍLIA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em __ de _____ de 2024.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Paula Monteiro de Souza - Universidade de Brasília

Dr. Felipe Magalhães Furtado - Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato - Universidade de Brasília

Dra. Robéria Mendonça Pontes - Hospital da Criança de Brasília

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu parceiro Guilherme e aos meus pais e irmão por terem sido tão pacientes nesse período. Sem o apoio de vocês, eu provavelmente não teria conseguido passar por isso. Muito obrigada e eu amo muito vocês!

À minha família, por todas as vezes que expressaram seu apoio, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

Às minhas queridas amigas, que também foram pacientes, grandes incentivadoras e mais uma fonte de inspiração. Ver as mulheres fortes que vocês são nos desafios da vida e da ciência é um privilégio e sou muito grata por tê-las por perto!

À minha psicóloga, Nathália Cavalcanti, por todos os puxões de orelha e por me ajudar a continuar, principalmente nos momentos de maior dificuldade e ansiedade.

Às minhas amigas e colegas sabianas, pela paciência e pelos ensinamentos passados nesse período.

Aos meus orientadores, meu muitíssimo obrigada pela oportunidade de fazer ciência em dois centros de excelência, a Universidade de Brasília e o Hospital da Criança de Brasília. Poder fazer parte de um propósito na área da Saúde, tão desafiadora, complexa e importante, é realmente um privilégio. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por todas as vezes que me acalmaram nos momentos de tensão. Vocês são profissionais incríveis e tenho muita sorte por ter aprendido tanto com vocês!

À equipe do Laboratório de Pesquisa Translacional do Hospital da Criança de Brasília, por confiarem um projeto tão maravilhoso em minhas mãos! Obrigada por todos os ensinamentos. E por último, mas com certeza não menos importante, ao Prof. Dr. Maurício Homem de Mello. Obrigada por me acolher em um momento tão difícil na graduação e por ter acreditado em mim desde o começo, em um momento que nem eu mesma acreditava. Se não fosse por você, eu provavelmente não teria seguido esse caminho. Muito obrigada de verdade.

“Tudo é um caminho.”

Amores ao Sol

Lucão

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
SUMÁRIO	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1. Hematopoiese	16
2.2. Leucemia linfoblástica aguda	20
2.3. Estroma medular	21
2.3.1. Células endoteliais	21
2.3.2. Células mesenquimais	22
2.4. Doença residual mensurável	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1. Pacientes e amostras	25
4.1.1. Processamento de amostras	25
4.2. Caracterização de células mesenquimais e endoteliais	26
4.3. Análises estatísticas	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1. Perfil dos pacientes	28
5.2. Estratificação de risco	31
5.3. Doença residual mensurável	32
5.4. Caracterização de células endoteliais e mesenquimais	35
6. CONCLUSÕES	40
7. REFERÊNCIAS	41

RESUMO

GOUVEIA, Ana Beatriz. **Avaliação de células mesenquimais estromais em amostras de medula óssea de pacientes com leucemia linfoblástica aguda em tratamento no Hospital da Criança de Brasília**. Brasília, 2024. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

O microambiente tumoral realiza um papel crucial no desenvolvimento e progressão de cânceres. Este ambiente é composto por diversos componentes, tais como células imunes e estromais, dentre outros. No contexto das leucemias, o microambiente influencia a sobrevivência e proliferação das células malignas, além da resposta à quimioterapia, através de mecanismos de evasão imune e interações com as células estromais. Entender sua dinâmica é essencial para o desenvolvimento de terapias-alvo capazes de impedir estas interações e melhorar os desfechos dos pacientes com leucemia. Neste estudo, analisamos os perfis de células endoteliais e mesenquimais nas amostras de medula óssea de pacientes pediátricos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de células B através de análises de doença residual mínima (DRM) por citometria de fluxo. Para análise de DRM, as amostras de medula óssea foram coletadas nos dias 15, 33 e 78 após o diagnóstico e processadas seguindo o protocolo de bulk lysis e o painel de DRM de LLA-B adaptada do EuroFlow. Posteriormente, foram realizadas novas análises, desta vez para verificação da presença de células mesenquimais e endoteliais. Os pacientes foram inicialmente estratificados em três grupos de risco e as análises de DRM foram realizadas nos dias 15, 33 e 78 após o início do tratamento, de acordo com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. Tanto a estratificação de risco quanto o resultado de DRM no dia D78 foram considerados de alto valor prognóstico, tendo em vista que pacientes classificados como maior risco ou cuja DRM estava positiva tiveram menores sobrevidas livre de doença e global. O perfil de células estromais não foi considerado um fator prognóstico, mas possivelmente devido à maioria das recaídas tendo acontecido 18 meses após o diagnóstico. Os pacientes foram então separados em grupos levando em consideração o perfil de células estromais e DRM no D78, em que as análises de sobrevivência mostraram uma possível correlação entre as variáveis, mas sem significância estatística. Estudos posteriores seguem necessários para melhor elucidar se as células estromais poderiam ser consideradas um fator prognóstico para tais pacientes.

Palavras-chave: Leucemia linfoblástica aguda, leucemia, doença residual mínima, células

mesenquimais estromais, microambiente tumoral, citometria de fluxo, estratificação de risco.

ABSTRACT

GOUVEIA, Ana Beatriz. **Evaluation of mesenchymal stromal cells from bone marrow samples of pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in therapy at the Children's Hospital of Brasilia.** Brasilia, 2024. Dissertação (Master's in Pharmaceutical Sciences) – Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, 2024.

The tumor microenvironment plays a crucial role in the development and progression of cancers. This complex environment consists of various components such as immune and stromal cells, among others. In leukemia, the microenvironment influences tumor cell survival, proliferation, and response to therapy through immune evasion mechanisms and supportive interactions with stromal cells. Understanding its dynamics is essential for developing targeted therapies that can effectively disrupt these interactions and improve treatment outcomes for leukemia patients. In this study, we analyzed endothelial and mesenchymal stromal cell profiles of bone marrow samples from pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia through measurable residual disease (MRD) by flow cytometry analysis. Bone marrow samples were collected at days +15, +33 and +78 after diagnosis for MRD assessment and then processed following bulk lysis protocol and B-ALL MRD panel, adapted from EuroFlow. Later, data were reanalyzed in order to verify the presence of mesenchymal and endothelial cells. Patients were initially stratified into three risk groups according to the Berlin-Frankfurt-Münster adapted protocol. Risk stratification and measurable residual disease at day +78 were both high prognostic factors, since patients with higher risk or positive disease were related to lower disease-free and overall survivals. Stromal cell profile alone was not considered a prognostic factor, but possibly due to most relapses happening after 18 months after start of therapy. Patients were then stratified according to stromal cell profile and day +78 MRD, which survival analysis showed a possible correlation between, but did not reach statistical significance. Further studies are still necessary in order to elucidate whether stromal cells can be considered an important prognostic factor.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, leukemia, measurable residual disease, mesenchymal stromal cells, tumor microenvironment, flow cytometry, risk stratification.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hematopoiese simplificada. 17
- Figura 2.** Curva de maturação de linfócitos B através de citometria de fluxo multiparamétrica. 19
- Figura 3.** Caracterização de células endoteliais e mesenquimais a partir de seus perfis imunofenotípicos. 27
- Figura 4.** Curvas de probabilidade de sobrevida global e livre de doença para pacientes com diagnóstico de LLA-B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022. 30
- Figura 5.** Curvas de probabilidade de sobrevida global e livre de doença para pacientes do sexo feminino e masculino. 31
- Figura 6.** Curva de probabilidade de sobrevida por estratificação de risco. 32
- Figura 7.** Curva de probabilidade de sobrevida global e livre de doença a partir do status de DRM. 34
- Figura 8.** Estratégia de gates para quantificação de células estromais por citometria de fluxo multiparamétrica utilizando painel Euroflow para DRM de LLA-B. 35
- Figura 9.** Curvas de probabilidade de sobrevida global e livre de doença de acordo com o percentual de células estromais no compartimento medular no D78. 37
- Figura 10.** Curvas de probabilidade de sobrevida global e livre de doença de acordo com o risco estabelecido a partir do percentual de células endoteliais no compartimento medular e status de DRM no D78. 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fenótipo dos linfócitos B ao longo do processo de maturação.	19
Tabela 2. Painel utilizado para marcação de DRM de LLA-B, adaptado do EuroFlow.	26
Tabela 3. Análise do perfil dos pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.	28
Tabela 4. Análise descritiva das variáveis quantitativas de pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.	29
Tabela 5. Análise de sobrevivência para pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.	29
Tabela 6. Análise de sobrevivência por sexo.	30
Tabela 7. Análise de sobrevivência por estratificação de risco.	31
Tabela 8. Análise descritiva das variáveis qualitativas de pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.	33
Tabela 9. Análise de sobrevivência global por status de DRM.	33
Tabela 10. Quantificação de células estromais endoteliais e mesenquimais.	36

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTA: Activina A

AGM: região aorta-gonadal-mesonéfrica

ANGP4: proteína angiopoietina-like 4

AR: alto risco

ATL: leucemia/linfoma de células T do adulto, do inglês *adult T-cell leukemia*

BMP4: proteína morfogenética óssea 4, do inglês *bone morphogenetic protein-4*

BFM: Berlim-Frankfurt-Munich

BR: baixo risco

CAF: fibroblastos associados ao câncer, do inglês *cancer associated fibroblasts*

CCL2: *C-C motif chemokine ligand 2*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CFM: citometria de fluxo multiparamétrica

CRLF2: *cytokine receptor-like factor 2*

CTH: células-tronco hematopoiéticas

CXCL12: fator derivado de células estromais 12

DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro

DN: duplo-negativo

DP: duplo-positivo

DRM: doença residual mensurável

EC: células endoteliais, do inglês *endothelial cells*

EPO: eritropoietina

G-CSF: fator estimulador de colônia granulocítica, do inglês *granulocyte colony-stimulating factor*

GM-CSF: fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos, do inglês *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HCB: Hospital da Criança de Brasília José de Alencar

HLA-DR: anticorpo monoclonal HLA-DR

IKZF1-4: família de genes IKAROS

IL: interleucina

JAK1: Janus quinase 1

LLA: leucemia linfoblástica aguda

LLC: leucemia linfocítica crônica

LMA: leucemia mielóide aguda

LMC: leucemia mielóide crônica

LPT: Laboratório de Pesquisa Translacional

MHC: complexo principal de histocompatibilidade, do inglês *main histocompatibility complex*

MSC: células mesenquimais estromais, do inglês *mesenchymal stromal cells*

NGS: do inglês *next-generation sequencing*

PAX5: gene *Paired Box 5*

PBS: solução salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*

PCR: reação em cadeia da polimerase

RI: risco intermediário

SCF: fator de célula-tronco, do inglês *stem-cell factor*

SG: sobrevida global

SLD: sobrevida livre de doença

SNC: sistema nervoso central

TAMs: macrófago associados ao tumor, do inglês *tumor associated macrophages*

TCR: receptor de células T, do inglês *T cell receptors*

TGF- β : fator de crescimento transformador beta

TPO: trombopoietina

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda é o tipo de câncer mais comum entre pacientes pediátricos, responsável por 80% das leucemias infantis e aproximadamente 25% de todas as neoplasias em crianças, sendo mais prevalente em crianças entre 1 e 4 anos. Ao longo das últimas décadas, o tratamento de LLA tornou-se cada vez mais eficaz, apresentando atualmente uma taxa de remissão acima de 90% (Omar et al., 2022). Um dos principais destaques para tal avanço foi a implementação da Doença Residual Mínima (DRM), que se tornou indispensável na estratificação de risco e no acompanhamento da eficácia do tratamento.

A DRM consiste na detecção de células malignas nos mais baixos níveis, mesmo que o paciente aparentemente tenha alcançado remissão morfológica e pode ser detectada por citometria de fluxo multiparamétrica (MFC) ou métodos moleculares, incluindo PCR e mais recentemente o sequenciamento de nova geração (NGS), podendo alcançar níveis de sensibilidade de até 10^{-6} células. Tal exame possui alto valor prognóstico, com uma pesquisa de DRM positiva sendo amplamente relacionada com piores desfechos em pacientes de todas as idades (Cherian; Soma, 2021; Liang et al, 2023; Ravandi et al, 2016; Ribera et al, 2014; van Dongen et al, 2015).

O microambiente tumoral (TME) é uma rede complexa que inclui a matriz extracelular (ECM), vasos sanguíneos e diversos tipos celulares, como células imunes e estromais, que auxiliam na progressão tumoral a partir de vários processos, incluindo proliferação e migração celular, imunoevasão, angiogênese e até mesmo resistência à quimioterapia (Xu et al, 2022; Hinshaw; Shevde, 2019; Arneth, 2019). As células endoteliais são componentes do sistema vascular, constituindo a parede dos vasos sanguíneos e, dessa forma, tendo um papel importante na progressão tumoral através da regulação da angiogênese e controle da infiltração (Ding; Shyu; Lin, 2011; Sage; Thrakar; Janes, 2016). Células mesenquimais estromais, por outro lado, são células multipotentes com propriedade de autorrenovação que podem ser encontradas em diversos tecidos e possuem propriedades imunomodulatórias, com efeitos tanto anticancerígenos quanto pró-tumorais em diversos tipos de cânceres (Hinshaw; Shevde, 2019; Kalina et al, 2012; Pavon, 2018; Xu et al, 2022).

No entanto, a grande maioria dos estudos sobre a interação entre as células leucêmicas e o microambiente medular são *in vitro*, que ainda não são capazes de simular perfeitamente a complexidade das condições *in vivo*. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi a caracterização *ex vivo* de células mesenquimais e endoteliais de pacientes

diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda ao longo dos pontos de doença residual mensurável (dias +15, +33 e +78 após o início da quimioterapia), de forma a avaliar a resposta medular ao tratamento e investigar se as células mesenquimais poderiam ter relação com os desfechos, a fim de melhor elucidar a relação entre o microambiente tumoral com as leucemias agudas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Hematopoiese

O sangue é um tecido vital composto por leucócitos, eritrócitos e plaquetas. Maximow (1924) propôs uma teoria unitária da hematopoiese, em que todos os componentes celulares do sangue seriam originados a partir de um progenitor comum, que seria uma célula-tronco linfóide chamada de hemocitoblasto. No entanto, sabe-se, atualmente, que tais componentes são originados a partir de um precursor pluripotente comum, chamado de célula-tronco hematopoiética (CTH).

As células-tronco hematopoiéticas são células com capacidade de autorrenovação e diferenciação em progenitores de todas as linhagens celulares sanguíneas. Tais células são originadas na região aorta-gonadal-mesonéfrica (AGM), ainda no embrião (Orkin; Zon, 2008). Já foram relatados, porém, casos de células hematopoiéticas derivadas de células endoteliais, processo chamado de transição endotelial-hematopoiética (Jaffredo et al, 1998; Nishikawa et al, 1998, Oberlin et al, 2002).

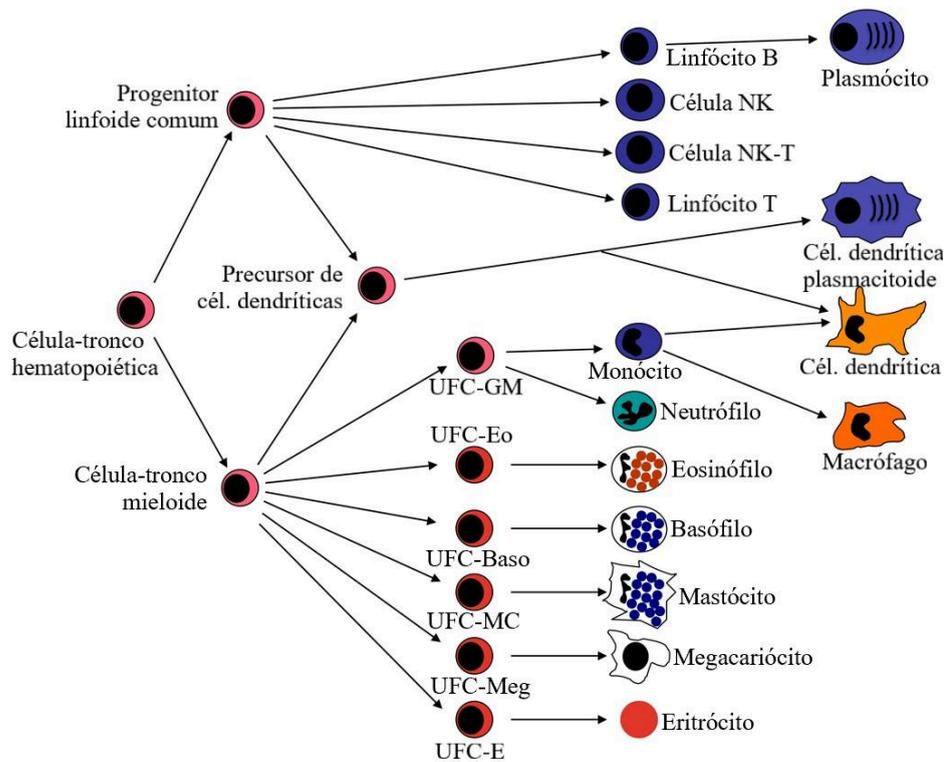
O processo de regeneração de células sanguíneas, independente de sua linha de diferenciação, é chamado de Hematopoiese. A primeira fase da hematopoiese ocorre ainda no saco gestacional, cujos nichos variam entre a placenta, região AGM, fígado e medula óssea, conforme o desenvolvimento do embrião. Já durante a vida adulta, a medula óssea é a única fonte de produção de células hematopoiéticas (Longo, 2010; Orkin; Zon, 2008).

Durante esse processo, conforme o grau de maturação, as células sanguíneas perdem sua capacidade de diferenciação e de proliferação, ao passo que adquirem capacidades específicas, como fagocitose e reconhecimento antigênico. Para que isso ocorra, as células-tronco hematopoiéticas e suas sucessoras interagem com diversas citocinas, incluindo moléculas de adesão e fatores de crescimento, muitas vezes expressas pelos próprios componentes do

estroma medular. Algumas das principais citocinas envolvidas na hematopoiese incluem o fator de crescimento de células-tronco (SCF), a eritropoietina (EPO), a trombopoietina (TPO) e o fator estimulador de granulócitos e monócitos (G-CSF e GM-CSF), relacionadas com a produção e diferenciação das hemácias, plaquetas e granulócitos, respectivamente (Longo, 2010; Orkin; Zon, 2008).

A eritropoietina (EPO) é uma glicoproteína que foi descoberta a partir da observação do aumento de hemácias após exposição a grandes altitudes, devido à hipóxia causada por tais (Reissmann, 1950; Ruhstroth-Bauer, 1950). Durante a hematopoiese embrionária, o fígado é o principal produtor de eritropoietina, enquanto os rins passam a ser a fonte primária de produção após o nascimento (Bunn, 2013). Além disso, já foi demonstrado que a EPO pode induzir angiogênese e condrogênese. Já a trombopoietina (TPO) é a principal citocina envolvida na produção de megacariócitos, que por sua vez irão se diferenciar em plaquetas (Longo, 2010; Ribatti; Vacca, 1999).

Figura 1. Hematopoiese simplificada. As células-tronco hematopoiéticas podem se diferenciar em diversas linhagens, dando origem a todas as células sanguíneas. UFC: Unidades formadoras de colônias; -GM: linhagem granulocítica/monocítica; -Eo: linhagem eosinofílica; -Baso: linhagem basofílica; -MC: mastócitos; -Meg: linhagem megacariocítica; -E: linhagem eritroide.



Fonte: Chaplin, 2010.

Assim como o fator estimulador de colônias granulocíticas é essencial para a diferenciação das células-tronco hematopoiéticas em granulócitos, a família de fatores de transcrição Ikaros (IKZF1-4) e a interleucina 7 (IL-7) são fundamentais para a diferenciação na linhagem linfocítica. A primeira etapa da diferenciação nesta linhagem é a transformação da HSC em um progenitor linfóide comum, que irá então se diferenciar em linfócitos B, T ou NK, dependendo do estímulo recebido (Longo, 2010).

As células T e NK possuem uma diferenciação mais similar, tendo em vista que é a partir da sinalização de Notch-1 que o progenitor comum irá se comprometer com estas linhagens, sendo posteriormente diferenciadas a partir de duas vias de sinalização. Apesar de todos os linfócitos serem produzidos na medula óssea, os linfócitos T completam sua maturação no timo, sendo chamados de timócitos assim que saem do ambiente medular (Longo, 2010).

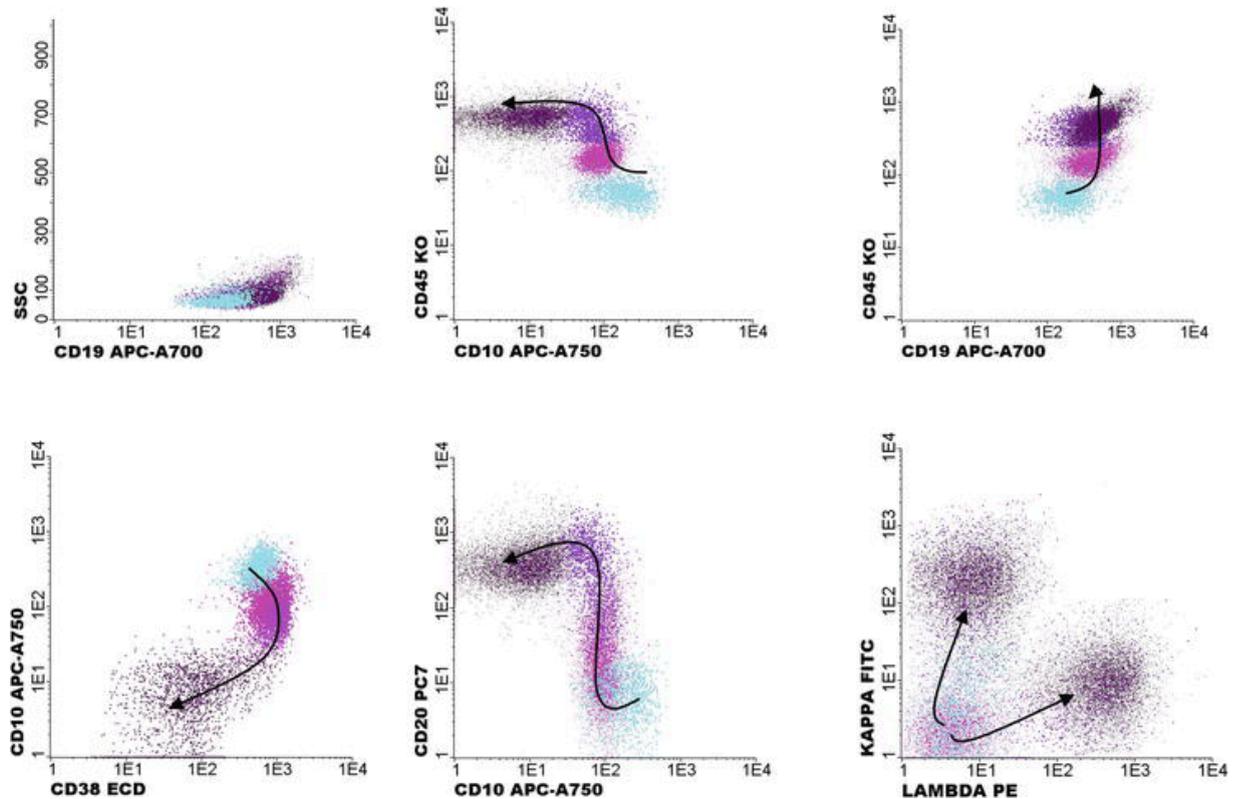
Assim que chegam ao timo, a primeira etapa de maturação dos linfócitos T ocorre no córtex, em que são chamados de duplos-negativos (DN), até que passam a expressar seus receptores (TCR, do inglês *T cell receptors*) e tanto CD4 quanto CD8, adquirindo um fenótipo duplo-positivo (DP). Os linfócitos então adquirem seu fenótipo definitivo ao se ligarem com as moléculas de reconhecimento MHC, em que linfócitos CD4 se ligam a MHC de classe I e CD8 a MHC-II. Caso isto não ocorra, as células serão consideradas como não-funcionais e passarão por um processo de apoptose (Abbas et al, 2014; Chaplin, 2010; Marti et al, 2017).

Os linfócitos B são também produzidos na medula óssea, porém irão migrar para os tecidos linfóides secundários, como os linfonodos e o baço. O processo de maturação passa por diversas etapas, sendo as células chamadas de pró-B, pró-B I, pró-B II, B imatura, B madura e, enfim, plasmócito, cada uma com seu fenótipo específico (Tabela 1; Figura 2).

Tabela 1. Fenótipo dos linfócitos B ao longo do processo de maturação.

pró-B	pró-B I	pró-B II	B imatura	B madura	plasmócito
CD34	CD34	CD20 ^{het}	CD20	CD20	CD38
TdT	TdT	CD22	CD22	CD22 ^{alto}	CD19
CD22	CD22	CD38	CD38	CD19	CD138
CD38 ^{alto}	CD38	CD19	CD19	CD79a	CD45
CD45 ^{baixo}	CD19	CD79a	CD79a	CD45 ^{alto}	cyIgμ
	CD79a	CD10 ^{baixo}	CD10 ^{baixo}	IgM/IgD	
	CD10 ^{alto}	CD45 ^{alto}	CD45 ^{alto}		
	CD45 ^{baixo}	cyIgμ	cyIgμ		
			IgM		

Figura 2: Curva de maturação de linfócitos B através de citometria de fluxo multiparamétrica. Azul claro: imaturos; rosa/lilás: intermediários; roxo: linfócitos B maduros.



Fonte: Marti, 2017.

Os linfócitos B são os principais participantes da resposta imune humoral, sendo responsáveis pela produção e secreção de imunoglobulinas que por sua vez serão responsáveis pela neutralização ou opsonização de antígenos específicos. Além disso, são também responsáveis pela apresentação de antígenos para os linfócitos T e produção de células de memória, além da ativação do sistema complemento (Abbas, 2014; Althwaiqeb, 2023; LeBien; Tedder, 2008).

2.2. Leucemia linfoblástica aguda

Leucemias são neoplasias hematológicas em que há o crescimento exacerbado de células malignas, ou leucêmicas, na medula óssea. As leucemias podem ser classificadas de acordo com sua linhagem ou o estado de maturação da célula doente; as principais são as leucemias mieloides aguda (LMA) e crônica (LMC), linfoblástica aguda (LLA) e linfocítica crônica (LLC). As primeiras classificações dentre os tipos de leucemia eram baseados exclusivamente na morfologia e citoquímica da medula óssea (Bennett et al, 1976); no entanto, mais recentemente foi publicada uma nova classificação que incorporava outros fatores, como a citogenética e imunofenotipagem (Jaffe et al., 2001).

A leucemia linfoblástica aguda é derivada de precursores linfoides cuja diferenciação foi impedida, enquanto sua divisão é favorecida, resultando em uma multiplicação desenfreada de clones malignos. É mais comum em pacientes do sexo masculino e pode ocorrer em todas as idades, sendo mais predominante em crianças, principalmente entre 2 e 5 anos. Neste grupo, é responsável por mais de 30% de todas as neoplasias infantis e cerca de 25% dos casos de leucemias (Onciu, 2009; Dander et al., 2021). A LLA pode ser inicialmente subdividida a partir de sua célula precursora, podendo ser de células T ou B, esta última responsável por cerca de 75% dos casos em todas as faixas etárias (Jing et al., 2024; Lizcova et al, 2024; Raetz; Teachey, 2016).

Aproximadamente 75% dos casos de LLA pediátrica apresentam alterações cromossômicas, sendo hiperdiploidia (5+ cromossomos) ou hipodiploidia (menos de 44), t(12;21), t(1;19) e t(9;22) as mais prevalentes. Além disso, cerca de 2/3 dos pacientes diagnosticados com LLA-B possuem alterações nos genes de fatores transcricionais, com JAK1 ou 2, PAX5, IFZF1 e CLRF2 alguns dos mais comuns (Brady et al, 2022; Lejman et al, 2022; Mullighan, 2013).

2.3. Estroma medular

A medula óssea é o principal órgão hematopoiético dos mamíferos, onde seus componentes agem diretamente na regulação da hematopoiese, estimulando a auto-renovação e diferenciação linhagem-específica das células-tronco hematopoiéticas. É dividida em amarela, composta principalmente por adipócitos, e vermelha, local onde há a produção ativa das células sanguíneas (Longo, 2010; Orkin; Zon, 2008). Além destas, o microambiente medular também conta com diversos outros tipos celulares em sua composição, tais como células endoteliais, estromais, osteoblastos e fibroblastos, dentre outros, que agem em conjunto para manutenção da homeostase (Longo, 2010; Lucas, 2021; Orkin; Zon, 2008).

2.3.1. Células endoteliais

As células endoteliais são o componente mais interno das paredes dos vasos sanguíneos e linfáticos, participando de diversos processos, como a resposta imune, inflamação e coagulação. Isto ocorre pois desenvolvem funções que incluem manutenção da homeostase tecidual, controle da permeabilidade dos vasos e da passagem de células imunes e sinalização parácrina, além de funções tecido-específicas (Marziano et al., 2021; Pober; Sessa, 2007; Trimm; Red-Horse, 2023).

No contexto do câncer, as células endoteliais estão fortemente relacionadas à invasividade e malignidade devido ao seu papel na regulação da passagem transendotelial e sua relação com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), cuja expressão está aumentada em diversos tipos de câncer, levando à formação de novos vasos (Fodil et al., 2022; Ghalehbandi et al., 2023). No caso da angiogênese tumoral, a nova vasculatura é desorganizada e constituída por células imaturas, que acabam facilitando a passagem das células cancerígenas para os vasos sanguíneos e, posteriormente, para os tecidos onde irão se instalar (Chung; Lee; Ferrara, 2010). No câncer de mama, por exemplo, há um aumento da expressão da proteína angiopoietina-like 4 (ANGP4), que irá dissociar as junções celulares endoteliais, facilitando a metástase pulmonar (Padua et al., 2008; van Zijl; Krupitza; Mikulits, 2011). Além disso, dentre as alterações presentes nos blastos leucêmicos podemos citar as alterações na expressão das moléculas de adesão, capazes de auxiliar na imunoevasão (Cavenagh et al.,

1993; Corrado et al., 2016; Taverna et al., 2012).

2.3.2. Células mesenquimais

As células mesenquimais estromais, anteriormente chamadas de células-tronco mesenquimais, são células pluripotentes com capacidade de autorrenovação que se encontram em diversos tecidos, tais como o cordão umbilical, endométrio, tecido adiposo e a medula óssea, com característica de aderência ao plástico e capacidade de diferenciação em adipócitos, condroblastos e osteoblastos *in vitro* e expressão dos marcadores CD105, CD73 e CD90, na ausência de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR (Ding; Shyu; Lin, 2011; Dominici et al, 2006; Kobolak et al, 2016). As MSCs possuem importante papel na estimulação das células do microambiente e na regulação da resposta imune; isto é devido ao seu alto potencial de liberação de citocinas e fatores de crescimento. Devido às suas propriedades imunomodulatórias, estas células vêm sendo muito estudadas para verificar seu potencial terapêutico, sendo seu uso mais bem estabelecido para casos de transplantes, para minimizar o risco da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Huang et al., 2024; Kadri et al., 2023; Kelly; Rasko, 2021). No entanto, os efeitos imunomodulatórios das MSCs fazem com que tenham um papel controverso, tendo em vista sua interação no microambiente tumoral com as células tumorais.

As células leucêmicas possuem a habilidade de sequestrar células do estroma medular a fim proporcionar um nicho favorável para progressão da doença através de imuno evasão, secreção de citocinas proliferativas e até mesmo resistência à quimioterapia (Behrmann et al, 2018; Hughes et al, 2023). As células mesenquimais estromais podem limitar a resposta imune e assim aumentar a proliferação celular e crescimento tumoral, estando relacionada a um pior prognóstico em alguns cânceres, como gastrointestinal e mieloma múltiplo, assim como resistência ao tratamento e aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como CXCL12, IL-6 e TGF- β (Egan et al, 2023; Ham et al, 2021; Wang et al, 2023).

Nos nichos medulares na LLA-B, as MSCs desempenham um papel fundamental na progressão da doença, interagindo com os blastos de diversas formas. Em primeiro lugar, produzem Activina A (ACTA), proteína reguladora

membro da família do TGF- β , que por sua vez irá diminuir a produção de CXCL12, levando a um aumento da migração de blastos ao mesmo tempo que reduz a migração de células-tronco hematopoiéticas saudáveis (Portale et al., 2019). Além disso, há um aumento na liberação de CCL2 e BMP4, levando ao recrutamento e polarização de macrófagos M2 e associados ao tumor (TAMs) e geração de células dendríticas supressoras, resultando em suporte para o crescimento tumoral, invasividade e angiogênese (de Vasconcelos et al., 2010; Ma et al., 2019; Sierra-Filardi et al., 2014; Valencia et al., 2019).

Além disso, as vesículas extracelulares das células mesenquimais estão relacionadas a um efeito pró-tumorigênico em diversas neoplasias, incluindo neoplasias hematopoiéticas como mieloma múltiplo, LMC e até mesmo leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (El-Saghir et al., 2016; Milani et al., 2017; Wang et al., 2014). Outro ponto importante é que as MSCs são capazes de se diferenciar em fibroblastos associados ao câncer (CAF), célula mais prevalente no microambiente tumoral e que está também relacionada com aumento proliferativo e diminuição da apoptose (Borriello et al, 2017; Egan et al, 2023).

2.4. Doença residual mensurável

A avaliação de resposta ao tratamento em pacientes portadores de LLA pode ser realizada por meio de avaliação citológica de aspirado de medula óssea ou por técnicas de pesquisa de doença residual mínima, ou doença residual mensurável (DRM). A avaliação citológica consiste em uma metodologia de baixo custo e facilmente disponível, porém de baixa sensibilidade, variando de 3% a 5%. A DRM é definida como a presença de células doentes mesmo após o tratamento, mesmo que o paciente aparente estar em remissão morfológica (Kruse et al., 2020; Berry et al., 2017). Isto é possível através de técnicas extremamente sensíveis, tais como citometria de fluxo multiparamétrica (CFM), PCR e NGS, que podem alcançar níveis de sensibilidade de até 10^{-6} células (Short et al, 2022).

Diversos estudos avaliam a presença de células residuais em diferentes momentos após o início do tratamento quimioterápico. Sua detecção ao final da terapia de indução e de consolidação é considerada um parâmetro independente, indicador de prognóstico desfavorável entre pacientes com LLA

em qualquer faixa etária (Ribera et al., 2014; Pui et al., 2015; Schnittger, 2015; van Dongen et al., 2015; Ravandi et al., 2016). Além disso, foi demonstrada a importância do uso de doença residual mínima como parâmetro para alteração da intensidade do tratamento (Pui et al., 2015; van Dongen et al., 2015; Ravandi et al., 2016). Dessa forma, a DRM é um dos fatores mais importantes para uma estratificação de risco adequada.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a presença de células estromais em pacientes com leucemia linfoblástica aguda ao longo do tratamento no Hospital da Criança de Brasília, seguindo o protocolo BFM-2009 adaptado.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia do protocolo BFM-2009 adaptado em crianças diagnosticadas com LLA-B em tratamento no HCB;
- Quantificar as células estromais endoteliais e mesenquimais presentes nas amostras de medula óssea coletadas durante os pontos D15, D33 e D78;
- Verificar possível relação entre o percentual de células estromais no D78 e o prognóstico dos pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Pacientes e amostras

Foram incluídos neste estudo pacientes pediátricos diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília entre julho de 2019 e agosto de 2022. Pacientes com menos de 1 ano de idade ao diagnóstico, com síndrome de Down, histórico de quimioterapia por outras neoplasias ou recaída à admissão no Hospital não foram incluídos, devido à diferença nos protocolos de tratamento. Todas as amostras de medula óssea foram coletadas nas dependências do Hospital e processadas no Laboratório de Pesquisa Translacional (LPT) para fins de análise de doença residual mínima, nos dias 15, 33 e 78 após o início do tratamento. No total, 172 amostras foram analisadas, sendo 57 no D15 e D33 e 58 no D78. Todos os pais ou responsáveis assinaram um termo de consentimento sobre o uso das amostras em pesquisas do Hospital. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) sob o número 85960218.5.0000.5553.

4.1.1. Processamento de amostras

A coleta das amostras foi realizada pela equipe do Hospital. Após recebimento pelo Laboratório, as amostras foram processadas seguindo os protocolos de Bulk Lysis para DRM (EuroFlow Consortium, 2018), para promover a lise das

hemácias, e marcação conforme painel de DRM de LLA-B (Tabela 2), ambos do EuroFlow (Theunissen et al, 2017). As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e analisadas no software Infinicyt (Cytognos, S.L.) nos pontos de DRM (dias 15, 33 e 78 após o diagnóstico).

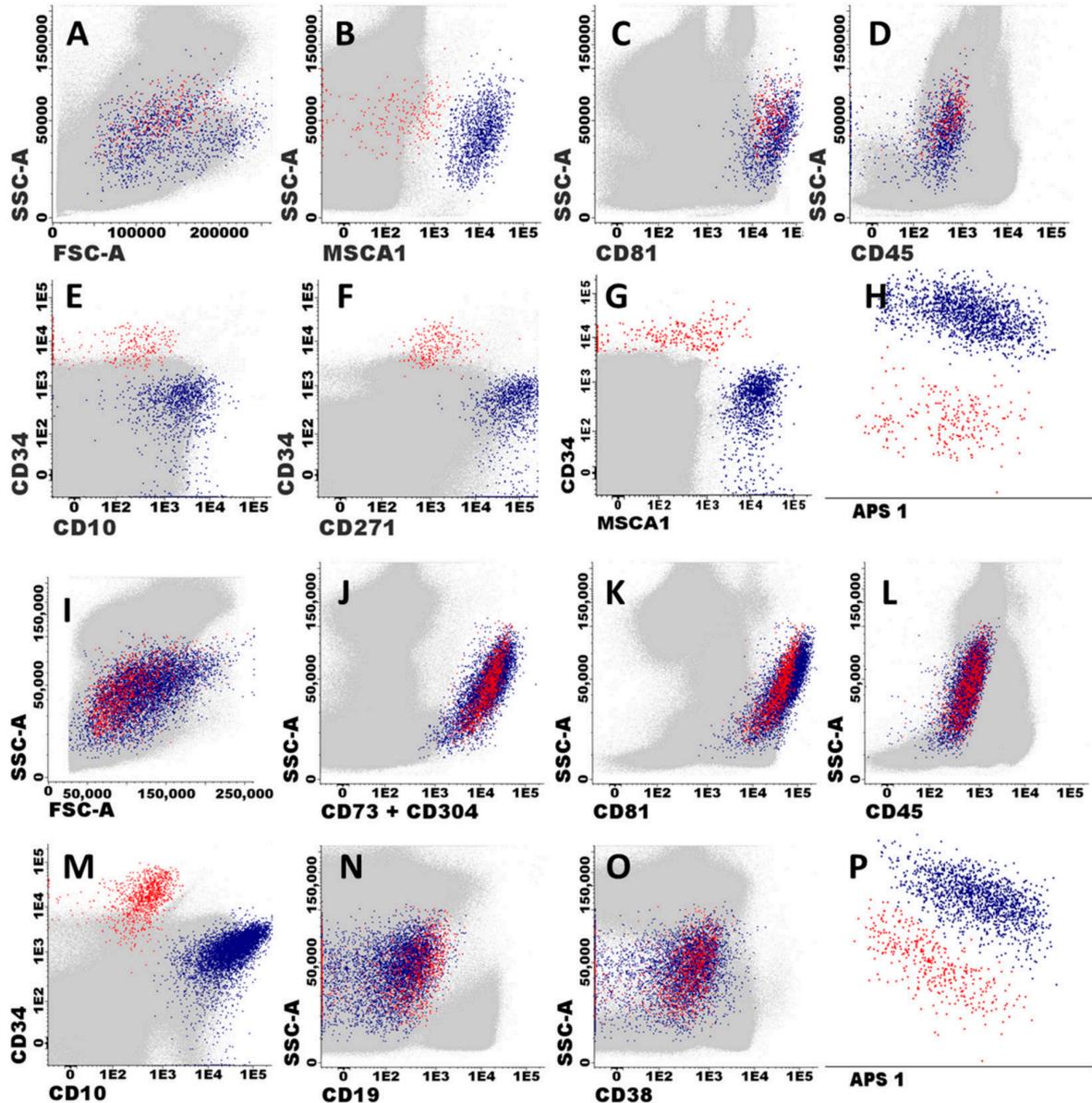
Tabela 2. Painel utilizado para marcação de DRM de LLA-B, adaptado do EuroFlow.

	FITC	PE	PERCP Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7	V450	V500
Tubo 1	CD81	CD66c + CD123	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
Tubo 2	CD81	CD304 + CD73	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45

4.2. Caracterização de células mesenquimais e endoteliais

Para a realização deste trabalho, os arquivos gerados foram posteriormente analisados em mesmo software para caracterização das células mesenquimais e endoteliais. Todas as amostras de DRM foram avaliadas para certificação de que seria possível realizar a análise; amostras cujo painel ainda não contava com o anticorpo CD73+CD304 não passaram pela reanálise devido à impossibilidade de definição das células citadas, que possuem forte expressão deste anticorpo. As células mesenquimais e endoteliais foram classificadas com base na alta expressão de CD81 e CD73 e na ausência de CD19, CD38, CD45, CD66c e CD123. Em seguida, as populações foram separadas pela expressão de CD10 ou CD34, respectivamente (Figura 3) (Dominici et al, 2006; Kobolak et al, 2016; Oliveira et al, 2022).

Figura 3. Caracterização de células endoteliais e mesenquimais a partir de seus perfis imunofenotípicos. Vermelho: células endoteliais; azul: células mesenquimais. A-H: Marcadores clássicos de células estromais. Forte expressão de CD81, na ausência de CD45. A diferenciação entre as células mesenquimais e endoteliais pode ser realizada a partir da expressão de MSCA1, CD271 e CD10 ou de CD34, respectivamente. I-P: identificação de células estromais a partir do painel EuroFlow de DRM de LLA-B pela expressão forte de CD81 e CD73 e ausência de CD45, CD38 e CD19, separando as pela expressão de CD10 ou CD34.



Fonte: Elen et al, 2022.

4.3. Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS Statistics (versão 29.0.0, IBM Corp Inc., Chicago, IL, USA). Para as variáveis categóricas, como sexo, alterações moleculares e status de DRM, foram calculadas frequências (*n* e %), enquanto para as variáveis numéricas, por exemplo DRM e percentual de células estromais, foram calculadas média,

mediana, desvio-padrão e valores mínimo e máximo de cada parâmetro. Foram também realizadas análises de sobrevivência para se estimar as sobrevidas global (SG) e livre de doença (SLD) através do método de Kaplan-Meier, com o fator de log-rank para cálculo da relevância estatística, que consiste na estimativa de sobrevivência de determinado grupo em tempos e condições diferentes (Bland; Altman, 1998; Ferreira; Patino, 2016; Miot, 2017).

Esta estimativa irá gerar um gráfico, chamado de função ou curva de sobrevida ($S(t)$), que é caracterizada por uma função escada com degraus nos tempos observados de falha, neste caso, óbitos ou recaídas. Além disso, é utilizado um sinal de “+”, que representa o tempo de censura (não ocorrência) de uma observação, ou seja, pacientes que seguem em acompanhamento serão representados por este símbolo no tempo alcançado. Para se definir a sobrevida global, foi utilizado o tempo em meses desde o diagnóstico até o óbito do paciente ou, nos pacientes ainda em acompanhamento, a data da última consulta no Hospital. Já para a sobrevida livre de doença foi utilizado o tempo até o desfecho óbito ou recaída.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil dos pacientes

No total, 71 pacientes foram incluídos neste estudo, sendo 35 (49,3%) do sexo feminino e 36 (50,7%) do sexo masculino, com uma média de idade de 5,35 anos e mediana de 4,00 (Tabelas 3 e 4). Quarenta (56,3%) pacientes não apresentaram alterações moleculares, enquanto os demais apresentaram as seguintes alterações: t(12;21) sendo a mais prevalente (31,0%), seguida por t(9;22) (5,6%), t(1;19) (4,2%) e t(4;11) e alteração em IKZF1 (1,4% cada). Apenas 3 pacientes haviam passado por transplante de medula óssea até o momento do estudo. Nenhum dos pacientes que realizaram transplante foram a óbito.

Tabela 3. Análise do perfil dos pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.

		n	%
Sexo	Feminino	35	49,3
	Masculino	36	50,7
Protocolo de tratamento	BFM 95	6	8,5
	BFM 2009	65	91,5

Biologia molecular	Negativa	40	56,3
	t(1;19)	3	4,2
	t(12;21)	22	31,0
	t(9;22)	4	5,6
	t(4;11)	1	1,4
	Alteração IKZF1	1	1,4
Transplante de medula óssea	Sim	3	4,2
	Não	68	95,8
Desfecho	Morte	14	19,7
	Em acompanhamento	53	74,6
	Recaída	4	5,6
Morte	Sim	14	19,7
	Não	57	80,3
Total		71	100,0

Tabela 4. Análise descritiva das variáveis quantitativas de pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.

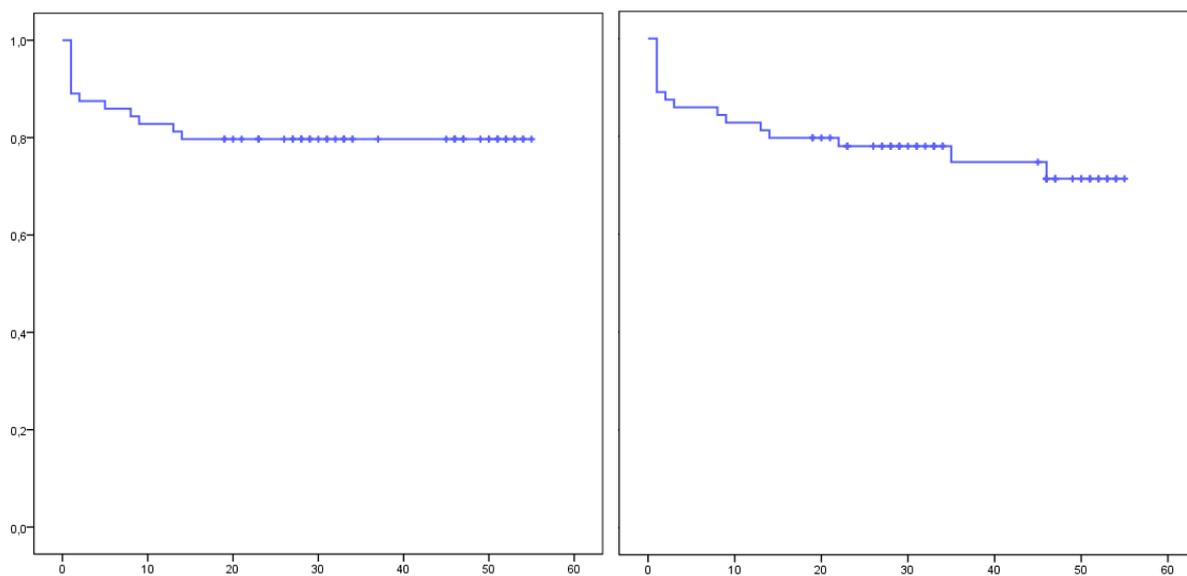
	Média	Mediana	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Amplitude interquartil
Idade ao diagnóstico	5,35	4,00	4,47	1,00	17,00	6,00
Leucometria inicial	31600,00	6130,00	88172,76	580,00	550000,00	12780,00
Sobrevida livre de doença (meses)	31,61	32,00	16,06	1,00	55,00	25,00
Sobrevida global (meses)	32,24	32,00	16,60	1,00	55,00	24,00

As médias de tempo estimadas até o óbito ou recaída entre as crianças diagnosticadas com LLA-B incluídas no estudo foram de 45,29 e 43,51 meses durante o follow-up do estudo (Tabela 5), com sobrevidas global e livre de doença de 80% e 71,6%, respectivamente (Figura 4). Apesar de ainda não ser ideal, as sobrevidas alcançadas superaram as expectativas com relação ao observado em países de baixa e média renda (Ahmad et al, 2023; Erlich et al, 2023; Jaime-Pérez et al, 2016).

Tabela 5. Análise de sobrevivência para pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.

Sobrevida	Estimativa (meses)	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95%	
			Limite inferior	Limite superior
Global	45,29	2,35	40,68	49,89
Livre de doença	43,51	2,39	38,83	48,18

Figura 4. Curvas de probabilidade de sobrevida global (esquerda) e livre de doença (direita) para pacientes com diagnóstico de LLA-B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022. Eixo x: tempo, em meses, após o diagnóstico; eixo y: sobrevivência relativa (máximo: 1,0).

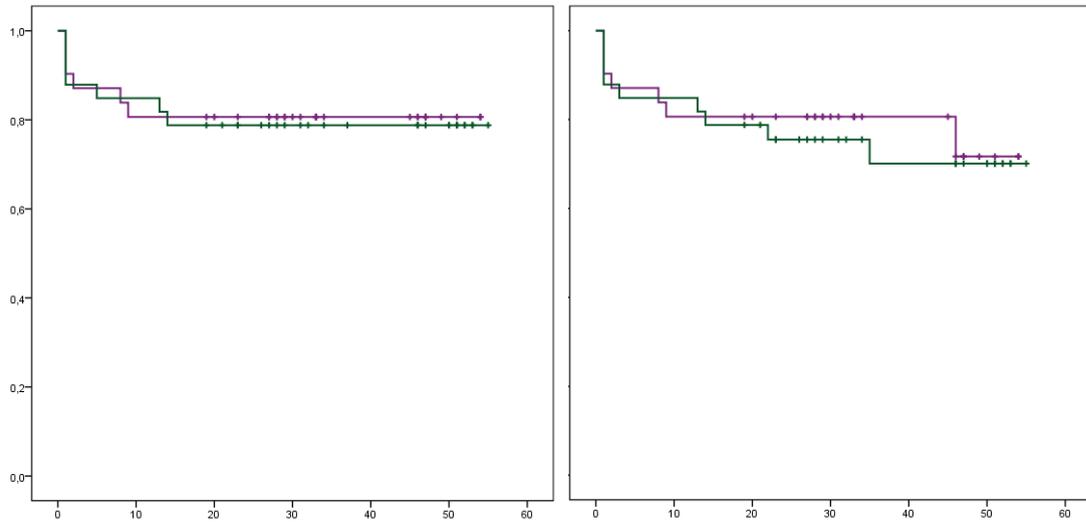


A média estimada para o tempo até o óbito em meninas foi de 45,27 meses e de 43,69 meses para os meninos com o mesmo diagnóstico, enquanto as médias para recaída/óbito foram de 43,54 e 41,92 meses, respectivamente (Tabela 6 e Figura 5). Embora a estimativa de sobrevida para os meninos tenha sido menor, não houve diferença estatística significativa para as curvas de sobrevida ($p = 0,961$).

Tabela 6. Análise de sobrevivência por sexo.

Sexo	Sobrevida	Estimativa	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95%	
				Limite inferior	Limite superior
Feminino	Global	45,27	3,33	38,73	51,80
	Livre de doença	43,54	3,34	36,99	50,10
Masculino	Global	43,69	3,18	37,46	49,93
	Livre de doença	41,92	3,28	35,50	48,34

Figura 5. Curvas de probabilidade de sobrevida global (esquerda) e livre de doença (direita) para pacientes do sexo feminino (roxo) e masculino (verde). Sobrevivência cumulativa final = 0,806 (feminino) e 0,794 (masculino).



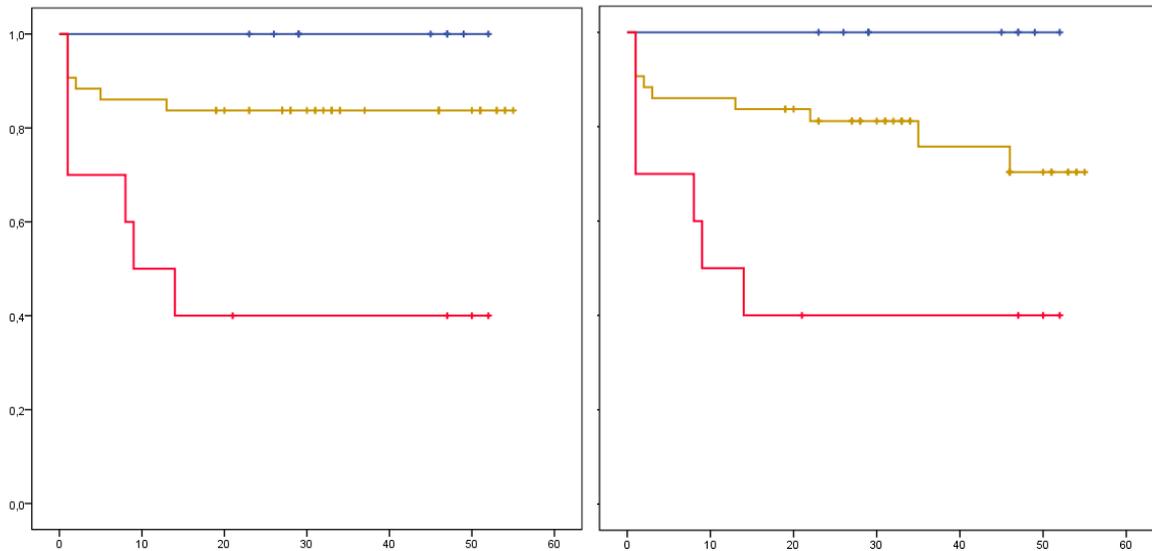
5.2. Estratificação de risco

A estratificação de risco foi realizada seguindo o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique com adaptações definidas pela equipe médica do hospital, como a exclusão do resultado de DRM do D33 como critério para estratificação, de acordo com os seguintes requisitos: pacientes com idade entre 1 e 6 anos, leucometria inicial $< 20.000/\text{mm}^3$, DRM $< 0,1\%$ no D15 e $< 0,01\%$ no D78 e sem alterações genéticas de mau prognóstico tais como $t(9;22)$ ou $t(4;11)$ foram classificados como Baixo Risco (BR); pacientes com DRM D15 $> 5\%$ ou D78 $> 0,01\%$ ou alguma alteração genética desfavorável foram classificados como Alto Risco (AR); os demais pacientes, que não atingiram os critérios anteriores, foram classificados como Risco Intermediário (RI). Quatorze (21,0%) pacientes foram classificados como BR, 46 (64,5%) como RI e 11 (14,5%) como AR.

Tabela 7. Análise de sobrevivência por estratificação de risco.

Estratificação de risco	Sobrevida	Estimativa	Erro Padrão	Média	
				Limite inferior	Limite superior
Intermediário	Global	46,46	2,78	41,00	51,91
	Livre de doença	43,44	2,91	37,75	49,14
Alto	Global	26,73	7,05	12,92	40,54
	Livre de doença	26,73	7,05	12,92	40,54

Figura 6. Curva de probabilidade de sobrevida por estratificação de risco. Azul: baixo risco; amarelo: risco intermediário; vermelho: alto risco. Sobrevivência cumulativa final = 1,000, 0,822 e 0,455, respectivamente.



Observa-se na tabela 7 que a média estimada para o tempo até o óbito de pacientes com risco intermediário foi de 46,46 meses e 26,73 meses para os pacientes com risco alto (mediana = 14,00 meses). Já a sobrevida livre de doença foi de 43,44 e 26,73 meses, respectivamente; para os pacientes classificados como baixo risco não foi possível estimar os tempos de sobrevida, pois todos os casos foram censurados (não houve óbitos ou recaídas). Houve diferença estatística significativa para as curvas de sobrevida ($p = 0,002$). Observa-se que crianças com risco alto apresentaram probabilidade de sobrevivência significativamente menor que as crianças com risco intermediário (Figura 6). Tais resultados confirmam mais uma vez o alto valor prognóstico da estratificação de risco, além da eficácia da estratificação adotada pelo Hospital.

5.3. Doença residual mensurável

Todos os 71 pacientes incluídos neste estudo realizaram imunofenotipagem para doença residual mínima no D15, enquanto apenas 66 (92,95%) e 58 (81,69%) realizaram o exame nos dias D33 e D78, respectivamente (Tabela 8). Foi possível notar um aumento no número de DRMs negativas (inferior a 0,01%) nos três pontos de corte, passando de 15 para 50 e então 55, respectivamente, o que indica a eficácia do tratamento. No entanto, há também aumento no número de pacientes que não realizaram o exame ao longo do

tratamento. Isto se deve pelo crescente número de óbitos e recaídas, que foram mais frequentes nos grupos de maior risco. Apesar de este resultado comprovar a importância da estratificação de risco, é necessário uma melhoria contínua para que a sobrevida dos pacientes seja ainda maior.

Tabela 8. Análise descritiva das variáveis qualitativas de pacientes com diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B em tratamento no Hospital da Criança de Brasília, de maio de 2019 a agosto de 2022.

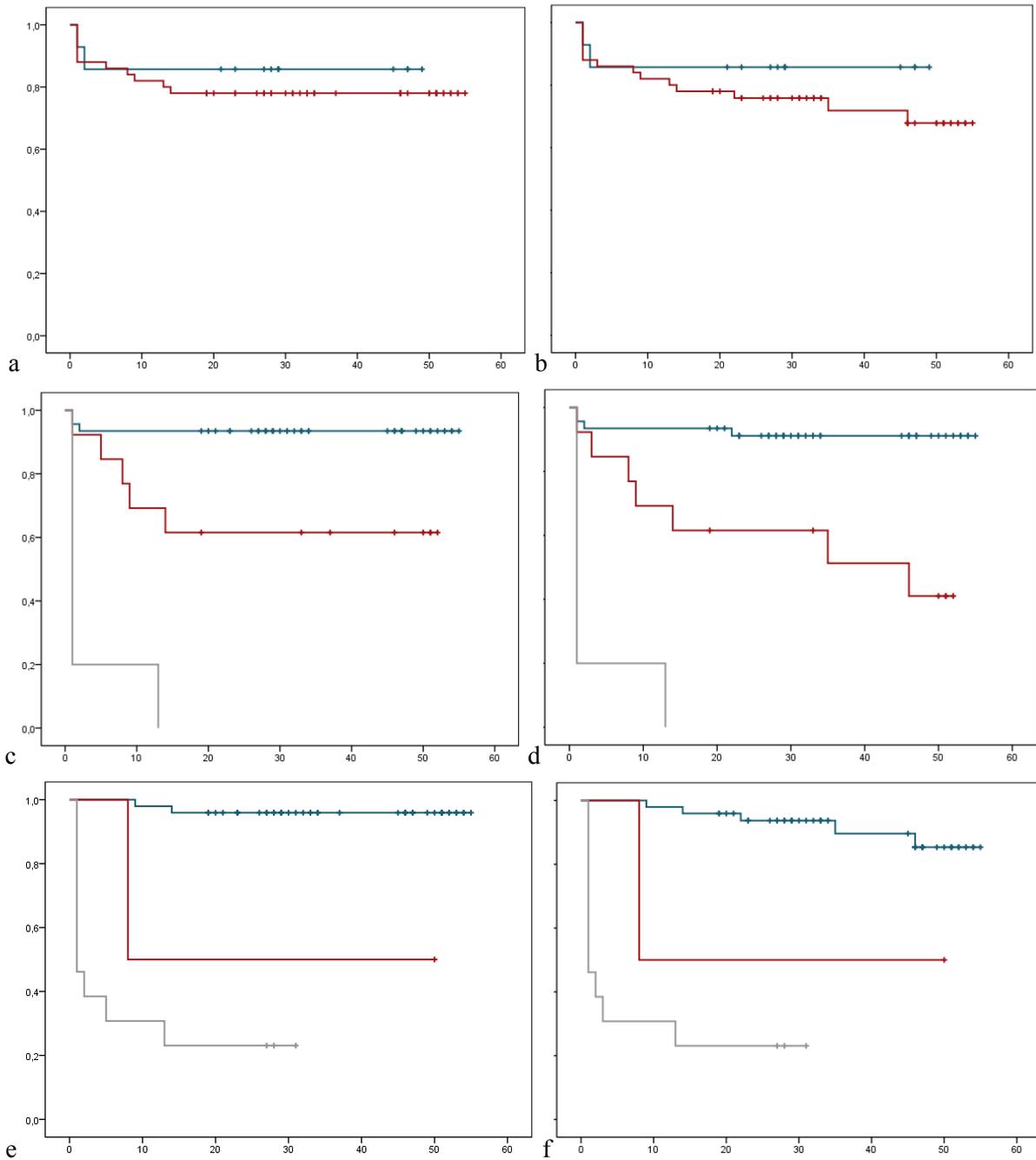
		n	%
DRM D15	Negativa	15	21,1
	Positiva	56	78,9
DRM D33	Negativa	50	75,8
	Positiva	16	24,2
DRM D78	Negativa	55	94,8
	Positiva	3	5,2
Total		71	100,0

Foram então estimadas as sobrevidas a partir do status de doença residual mínima em cada um dos pontos de corte (Tabela 9). Não foi verificada significância estatística entre as curvas de sobrevida global e livre de doença para o status de DRM no D15. Nos três pontos, é possível notar que pacientes que apresentaram DRM positiva ($> 0,01\%$) tiveram sobrevidas global e livre de doença inferiores aos pacientes cuja DRM foi negativa (Figura 7). Estes resultados comprovam mais uma vez a importância da quantificação de células residuais para verificação da resposta ao tratamento (Berry et al, 2017; Ravandi et al, 2015; Short et al, 2022).

Tabela 9. Análise de sobrevivência global por status de DRM.

Sobrevida	Status	Sobrevivência cumulativa final	Estimativa	Erro Padrão	Intervalo de confiança de 95%		
					Limite inferior	Limite superior	
D15	Global	Negativa	0,867	42,67	4,17	34,49	50,84
		Positiva	0,783	44,62	2,69	39,35	49,90
	Livre de doença	Negativa	0,867	42,67	4,17	34,49	50,84
		Positiva	0,681	42,44	2,71	37,12	47,76
D33	Global	Negativa	0,940	51,78	1,80	48,25	55,31
		Positiva	0,619	37,03	5,29	26,67	47,40
	Livre de doença	Negativa	0,919	51,09	1,90	47,36	54,82
		Positiva	0,401	31,06	5,07	21,12	41,00
D78	Global	Negativa	0,941	52,81	1,24	50,39	55,24
		Positiva	0,667	34,00	10,61	13,20	54,80
	Livre de doença	Negativa	0,850	50,20	1,70	46,88	53,53
		Positiva	0,667	34,00	10,61	13,20	54,80

Figura 7. Curva de probabilidade de sobrevida global (esquerda) e livre de doença (direita) a partir do status de DRM. 6a,b: D15; 6c,d: D33; 6e,f: D78. Azul: negativa; vermelha: positiva; cinza: não realizado.



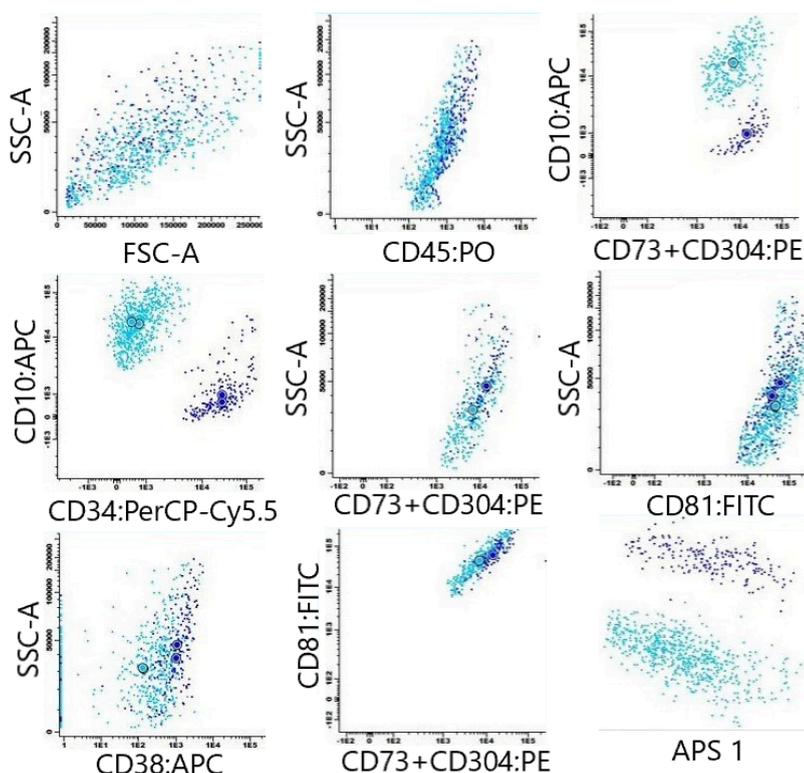
Em relação aos pacientes cuja medula foi analisada no D78 (Figura 7e,f), quatro (6,90%) foram a óbito, dos quais três foram classificados como de alto risco (t(4;11), t(9;22) e DRM positiva no D78), enquanto o quarto havia sido classificado como de risco intermediário, porém apresentou recaída precoce no sistema nervoso central (SNC). Aproximadamente 15% dos pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B recaem, sendo o SNC o sítio extramedular mais comum, e recaídas precoces apresentando pior prognóstico

em relação às tardias (Hunger; Raetz, 2020; Locatelli et al, 2012; Schumich et al., 2019; Sidhu et al, 2024; Zhang et al., 2020).

5.4. Caracterização de células endoteliais e mesenquimais

As amostras foram então reanalisadas a fim de verificar a composição estromal do microambiente medular através da quantificação de células endoteliais e mesenquimais, a partir do perfil de expressão $CD81^+CD73^+CD19^-CD38^-CD45^-CD66c^-CD123^-$ e $CD10^+CD34^-$ ou $CD34^+CD10^-$, respectivamente (Figura 8) (Elen et al, 2022). Vinte e seis amostras não foram realizadas devido a óbitos ou mudanças no protocolo de tratamento, por exemplo, devido à recaída. Além disso, quatorze não foram analisadas devido ao painel utilizado no momento da análise, que ainda não integrava os anticorpos CD73 e CD304. Esta combinação ganhou importância no contexto da doença residual mínima de LLA-B na última década e seu uso no painel utilizado pelo Hospital foi consolidado a partir de 2020 (Theunissen et al, 2017; Verbeek; van der Velden, 2024). No total, 172 amostras foram analisadas, incluindo os três pontos de corte de DRM.

Figura 8. Estratégia de gates para quantificação de células estromais por citometria de fluxo multiparamétrica utilizando painel Euroflow para DRM de LLA-B. Azul claro: células mesenquimais; azul escuro: células endoteliais.



Das 172 amostras analisadas, a maioria (149; 86,63%) apresentou níveis variados de células estromais, com um aumento progressivo ao longo do tratamento, compatível com um perfil de regeneração do ambiente medular (Tabela 10).

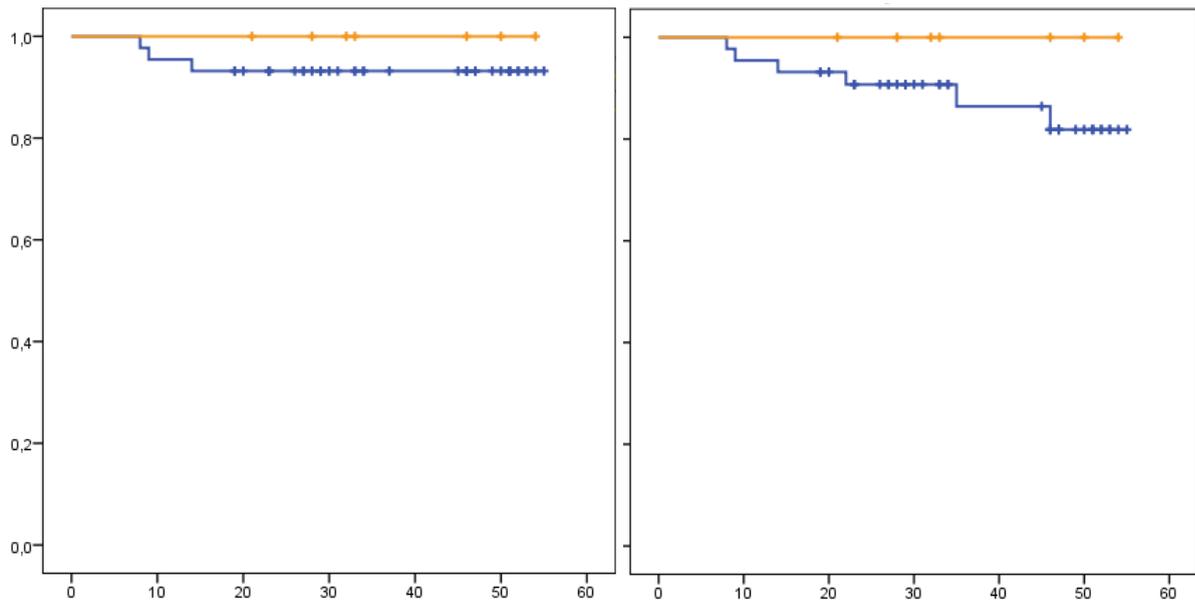
Tabela 10. Quantificação de células estromais endoteliais e mesenquimais. %SCs: Percentual de células estromais; MSCs: percentual de células mesenquimais dentro do compartimento estromal, em comparação com as células endoteliais; CS: percentual de células endoteliais dentro do compartimento estromal, em comparação com as células mesenquimais.

		Média	Mediana	Mín	Máx
D15	% Blastos	2,7173	0,1100	0,0000	95,8000
	%SCs	0,0956	0,0287	0,0008	0,9300
	MSCs	80,5845	82,4324	31,7460	100,0000
	ECs	19,4065	17,5676	0,0000	68,2540
D33	% Blastos	1,2755	0,0000	0,0000	68,9000
	%SCs	0,0355	0,0132	0,0003	0,2100
	MSCs	79,6695	80,1723	20,0000	96,3950
	ECs	20,1141	19,8277	0,0000	80,0000
D78	% Blastos	0,0194	0,0000	0,0000	0,6300
	%SCs	0,0372	0,0135	0,0009	0,2484
	MSCs	79,3054	80,3028	44,9900	100,0000
	ECs	20,6873	19,6972	0,0000	55,0100

* Tabela baseada apenas em amostras que apresentaram células estromais no microambiente medular no momento da coleta.

Um estudo multicêntrico com 229 pacientes diagnosticados com LLA-B, sendo 129 pacientes pediátricos, mostrou que um percentual maior que 32% de células endoteliais no compartimento estromal no D78 estaria relacionado com menores sobrevidas (Elen et al, 2022). Sendo assim, foram calculadas as sobrevidas dos pacientes incluídos no presente estudo para verificar se o resultado iria se reproduzir. No entanto, notou-se que aqueles que possuíam mais de 32% de ECs apresentaram maior sobrevida (Figura 9); não houve, porém, significância estatística em nenhum dos casos ($p = 0,485$ e $0,330$, respectivamente).

Figura 9. Curvas de probabilidade de sobrevida global (esquerda) e livre de doença (direita) de acordo com o percentual de células estromais no compartimento medular no D78. Azul: EC < 32%; laranja: EC > 32%.



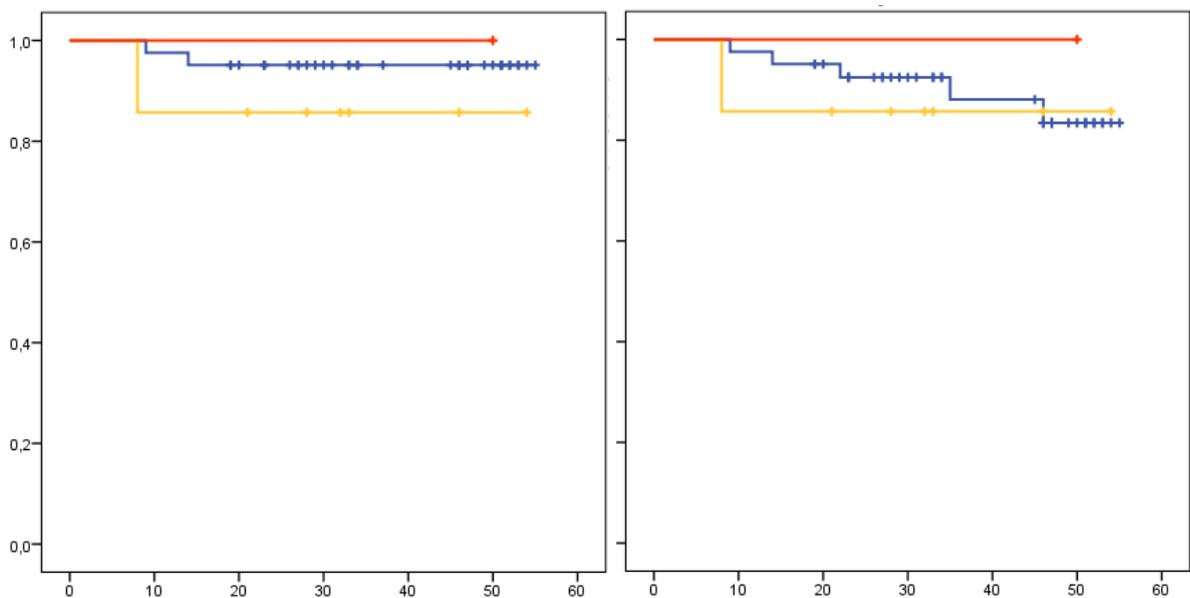
Isto pode ser devido à diferença na amostragem de cada um dos estudos ou ao uso do D33 na estratificação de risco. Conforme citado anteriormente, o protocolo utilizado no Hospital da Criança é uma adaptação dos protocolos BFM 95 e 2009, em que uma das alterações feitas foi a exclusão do D33 como fator de estratificação móvel de risco. Sendo assim, os pacientes podem apresentar diferentes perfis de células estromais de acordo com a intensidade de quimioterapia a que são submetidos. Além disso, em relação à DFS, o resultado pode não ter apresentado significância pois 5 (83,3%) dentre as 6 recaídas foram tardias (após mais de 18 meses), muito após o dia de coleta das amostras, o que pode indicar que este parâmetro pode ser melhor utilizado para predição de recaídas precoces.

Por estarem presentes em diversos tecidos e participarem da resposta imune através da liberação de citocinas importantes, como a IL-6, as células mesenquimais estromais vêm sendo amplamente estudadas no contexto do microambiente tumoral. Sabe-se que as MSCs presentes no microambiente possuem atividade pró-tumorigênica, com capacidade de reduzir a resposta imune e abrigar células leucêmicas, além de promover resistência à quimioterapia (Egan et al, 2023; Fallati et al, 2022; Frisbie et al, 2022; Wang et al, 2023). Além disso, descobriu-se que os fibroblastos associados ao câncer podem ser derivados das MSCs, expressando marcadores similares e mantendo

sua capacidade de diferenciação, além de ter uma atividade pró-tumorigênica (Borriello et al, 2017; Ham et al, 2021). Também foi verificado que em algumas neoplasias, incluindo mieloma múltiplo, os CAFs podem facilitar a progressão tumoral através da redução da resposta imune, assim como as MSCs (Egan et al, 2023).

Os pacientes foram então separados em três grupos de risco, que foram definidos a partir do status de DRM e do perfil de células estromais no D78. Pacientes cuja DRM foi negativa e com EC < 32% foram classificados como risco 1, pacientes com DRM negativa e EC > 32% ou DRM positiva e EC < 32% foram classificados como risco 2 e pacientes com DRM positiva e EC > 32% foram classificados como risco 3. Os pacientes classificados nos grupos de risco 1 e 2 apresentaram sobrevidas livre de doença semelhantes, porém pacientes do risco 1 apresentaram uma maior sobrevida global, apesar de não ter sido encontrada significância entre os grupos ($p_{SG} = 0,576$ e $p_{SLD} = 0,852$) (Figura 10). Apenas um paciente foi classificado como risco 3, que foi inicialmente classificado como de alto risco na estratificação padrão devido à presença de alteração no gene IKZF1 e DRM D15 > 5%; no entanto, foi realizado transplante de medula óssea 13 meses após o diagnóstico, cuja eficácia foi confirmada pela sobrevivência cumulativa de 1,000.

Figura 10. Curvas de probabilidade de sobrevida global (esquerda) e livre de doença (direita) de acordo com o risco estabelecido a partir do percentual de células endoteliais no compartimento medular e status de DRM no D78. Azul: risco 1; amarelo: risco 2; vermelho: risco 3.



Já em relação aos pacientes classificados como grupo 2, apenas dois eram devido à DRM positiva no D78, enquanto os outros sete eram devido a um maior percentual de ECs. Apesar de também não ter sido encontrada significância estatística ($p_{SG} = 0,843$ e $p_{SLD} = 0,576$), a menor SG neste grupo pode estar relacionada à capacidade angiogênica destas células, relacionada com uma maior infiltração tumoral e consequente metástase em tumores sólidos (Arneth, 2019; Dander, 2021). Além disso, já foi demonstrado que as células pré-leucêmicas apresentam uma maior adesão às células endoteliais e que as vesículas extracelulares liberadas pelas ECs podem auxiliar na progressão da doença (Huang et al, 2024; Palmi et al, 2014).

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho mostraram mais uma vez que resultados positivos de doença residual mínima, especialmente no D78 após o início do tratamento, e uma estratificação de risco adequada são fatores importantes para a eficácia do tratamento de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B. O status de DRM no D33 também se mostrou relevante para o desfecho dos pacientes, indicando que seu uso na estratificação móvel de risco e ajuste de tratamento poderia ser restabelecido; no entanto, deve-se avaliar um maior número de pacientes para tal definição.

Através de análises por citometria de fluxo foi possível observar um perfil regenerativo do estroma medular, com aumento nos valores de células endoteliais e mesenquimais. Não foi possível, entretanto, estabelecer uma relação entre os resultados e o prognóstico dos pacientes, o que pode ser devido ao tempo entre a última análise e as recaídas. Desta forma, análises posteriores podem ser importantes para um maior entendimento do microambiente tumoral no contexto das leucemias agudas e seu papel ao longo do curso da doença, como, por exemplo, análise do estroma medular no momento da recaída dos pacientes.

Sendo assim, apesar dos resultados deste trabalho não terem apresentado dados estatisticamente significativos quanto às células estromais, podem servir como ponto de partida para estudos futuros, tendo em vista a importância do assunto e a pouca quantidade de estudos disponíveis que mostram as células do ambiente medular diretamente relacionadas com as leucemias agudas.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia Básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 320 p. ISBN 978-85-352-7110-2.

AHMAD, Ishfaq et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Characteristics, Treatment Outcomes, and Prognostic Factors: 10 Years' Experience From a Low- and Middle-Income Country. **JCO Global Oncology**, [s. l.], v. 9, 8 jun. 2023. DOI [10.1200/GO.22.00288](https://doi.org/10.1200/GO.22.00288). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37290024/>. Acesso em: 6 maio 2024.

ALTHWAIQEB, Sarah A.; FAKOYA, Adegbenro O.; BORDONI, Bruno. **Histology, B-Cell Lymphocyte**. 2024. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560905/>.

ARNETH, Borros. Tumor Microenvironment. **Medicina**, [s. l.], v. 56, n. 15, ed. 1, 30 dez. 2019. DOI [10.3390/medicina56010015](https://doi.org/10.3390/medicina56010015). Disponível em: <https://www.mdpi.com/1648-9144/56/1/15>

BEHRMANN, Lena; WELLBROCK, Jasmin; FIEDLER, Walter. Acute Myeloid Leukemia and the Bone Marrow Niche—Take a Closer Look. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 8, 2018. DOI: [10.3389/fonc.2018.00444](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00444). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30370251/>.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias: French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 33, ed. 4, p. 451-458, agosto 1976. DOI [10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/188440/>.

BERRY, Donald A. et al. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 3, n. 7, 2017. DOI: [10.1001/jamaoncol.2017.0580](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0580). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28494052/>.

BLAND, John M.; ALTMAN, Douglas G. Survival probabilities (the Kaplan-Meier method). **BMJ**, [s. l.], v. 317, p. 1572, 5 dez. 1998. DOI [10.1136/bmj.317.7172.1572](https://doi.org/10.1136/bmj.317.7172.1572). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9836663/>

BORRIELLO, Lucia et al. Cancer-Associated Fibroblasts Share Characteristics and Protumorigenic Activity with Mesenchymal Stromal Cells. **Cancer Research**, [S. l.], v. 77, n. 18, p. 5142–5157, 2017. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-16-2586](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2586)

BRADY, Samuel H. et al. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 54, p. 1376-1389, 01 set 2022. DOI [10.1038/s41588-022-01159-z](https://doi.org/10.1038/s41588-022-01159-z). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36050548/>

BUNN, Howard F. Erythropoietin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S. l.], v. 3, n. 3, 2013. DOI: [10.1101/cshperspect.a011619](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011619). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23457296/>.

CAVENAGH, J. D.; GORDON-SMITH, E. C.; GIBSON, F. M.; GORDON, M. Y. Acute myeloid leukaemia blast cells bind to human endothelium in vitro utilizing E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 85, n. 1, p. 285-291, 10 out. 1993. DOI [10.1111/j.1365-2141.1993.tb03168.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1993.tb03168.x).

CHAPLIN, David D. Overview of the immune response. **The Journal of allergy and clinical immunology**, [s. l.], v. 125, Agosto 2010. DOI [10.1016/j.jaci.2009.12.980](https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.12.980). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20176265/>

CHERIAN, S.; SOMA, L.A. How I Diagnose Minimal/Measurable Residual Disease in B Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma by Flow Cytometry. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 155, ed. 1, p. 155, 38-54, 20 nov 2020. DOI: [10.1093/ajcp/aqaa242](https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa242).

CHUNG, Alicia S.; LEE, John; FERRARA, Napoleone. Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature Reviews Cancer*, [S. l.],

n. 10, p. 505-514, jul. 2010. DOI <https://doi.org/10.1038/nrc2868>.

CORRADO, Chiara; SAIEVA, Laura; RAIMONDO, Stefania; SANTORO, Alessandra; DE LEO, Giacomo; ALESSANDRO, Riccardo. Chronic myelogenous leukaemia exosomes modulate bone marrow microenvironment through activation of epidermal growth factor receptor. **Journal of cellular and molecular medicine**, [S. l.], v. 20, n. 10, p. 1829-1839, 14 maio 2016. DOI [10.1111/jcmm.12873](https://doi.org/10.1111/jcmm.12873). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27196940/>.

DANDER, Erica; PALMI, Chiara; D'AMICO, Giovanna; CAZZANIGA, Giovanni. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 9, p. 4426, 2021. DOI: [10.3390/ijms22094426](https://doi.org/10.3390/ijms22094426). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33922612/>.

DE VASCONCELOS, Jaíra Ferreira; LARANJEIRA, Angelo Brunelli Albertoni; ZANCHIN, Nilson Ivo Tonin; OTUBO, Rosemary; VAZ, Thais Haline; CARDOSO, Angelo Almeida; BRANDALISE, Silvia Regina; YUNES, José Andrés. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 56, p. 568-577, 22 dez. 2010. DOI <https://doi.org/10.1002/pbc.22941>.

DING, Dah-Ching; SHYU, Woei-Cherng; LIN, Shinn-Zong. Mesenchymal Stem Cells. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 20, ed. 1, p. 5-14, 01 fev 2011. DOI <https://doi.org/10.3727/096368910X>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21396235/>

DOMINICI, M.; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [s. l.], v. 8, ed. 4, p. 315-317, 2006: DOI <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/>

EGAN, Hannah et al. Targeting stromal cell sialylation reverses T cell-mediated immunosuppression in the tumor microenvironment. **Cell Reports**, [S. l.], v. 42, n. 5,

2023. DOI: [10.1016/j.celrep.2023.112475](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112475)

EL-SAGHIR, Jamal; NASSAR, Farah; TAWIL, Nadim; EL-SABBAN, Marwan. ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: potential role in leukemia progression. **Retrovirology**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 73-85, 19 out. 2016. DOI [10.1186/s12977-016-0307-4](https://doi.org/10.1186/s12977-016-0307-4). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27760548/>.

ERLICH, Bella S. et al. Treatment-related mortality in children with cancer in low-income and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 24, ed. 9, p. 967-977, 27 jul 2023. DOI [10.1016/S1470-2045\(23\)00318-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(23)00318-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204523003182>

EUROFLOW CONSORTIUM. **EuroFlow Standard Operating Procedure (SOP) for Bulk Lysis for MRD panels**. 25 jun. 2018. Disponível em: <https://app.euroflow.org/downloads/public>.

FALLATI, Alessandra; DI MARZO, Noemi; D'AMICO, Giovanna; DANDER, Erica. Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): An Ally of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Cells in Disease Maintenance and Progression within the Bone Marrow Hematopoietic Niche. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 14, p. 3303–3325, 2022. DOI: [10.3390/cancers14143303](https://doi.org/10.3390/cancers14143303).

FERREIRA, Juliana C.; PATINO, Cecilia M. What is survival analysis, and when should I use it? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s. l.], v. 42, ed. 1, p. 77, Jan-Fev 2016. DOI [10.1590/S1806-37562016000000013](https://doi.org/10.1590/S1806-37562016000000013). Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/s5HBVP7Y9Qx8bNzKNTvjMvv/?lang=en>

FRISBIE, Len; BUCKANOVICH, Ronald J.; COFFMAN, Lan. Carcinoma-Associated Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Architects of the Pro-tumorigenic Tumor Microenvironment. **Stem Cells**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 705–715, 2022. DOI: [10.1093/stmcls/sxac036](https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac036).

FODIL, Sofiane; ARNAUD, Marine; VAGANAY, Camille; PUISSANT, Alexandre; LENGLINE, Etienne; MOONEY, Nuala; ITZYKSON, Raphael; ZAFRANI, Lara. Endothelial cells: major players in acute myeloid leukaemia. **Blood Reviews**, [S. l.], v. 54, jul. 2022. DOI [10.1016/j.blre.2022.100932](https://doi.org/10.1016/j.blre.2022.100932). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268960X22000066>.

GHALEHBANDI, Seyedehdelaram; YUZUGULEN, Jale; PRANJOL, Md Zahidul Islam; POURGHOLAMI, Mohammad Houssein. The role of VEGF in cancer-induced angiogenesis and research progress of drugs targeting VEGF. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 949, p. 1-10, 15 jun. 2023. DOI [10.1016/j.ejphar.2023.175586](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175586). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299923000973>.

HAM, In-Hye; LEE, Dageyong; HUR, Hoon. Cancer-associated fibroblast-induced resistance to chemotherapy and radiotherapy in gastrointestinal cancers. **Cancers**, [s. l.] v. 13, ed. 5, p. 1172-1188, 09 mar 2021. DOI: [10.3390/cancers13051172](https://doi.org/10.3390/cancers13051172). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33803229/>

HINSHAW, Dominique C.; SHEVDE, Lalita A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. **Cancer Research**, [s. l.], v. 79, ed. 18, p. 4557-4566, 13 set 2019. DOI: [10.1158/0008-5472.can-18-3962](https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-18-3962). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31350295/>

HUANG, Dan et al. Endothelial-derived small extracellular vesicles support B-cell acute lymphoblastic leukemia development. **Cellular Oncology**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 129-140, 2024. DOI: [10.1007/s13402-023-00855-0](https://doi.org/10.1007/s13402-023-00855-0). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37751067/>

HUANG, Ruihao et al. Mesenchymal stem cells for prophylaxis of chronic graft-vs-host disease after haploidentical hematopoietic stem cell transplant: An open-label randomized clinical trial. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 220-226, 28 dez. 2023. DOI [10.1001/jamaoncol.2023.5757](https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2023.5757).

HUGHES, Anastasia M.; KUEK, Vincent; OOMMEN, Joyce; CHUA, Grace-Alyssa;

VAN LOENHOUT, Maria; MALINGE, Sebastien; KOTECHA, Rishi S.; CHEUNG, Laurence C. Characterization of mesenchymal stem cells in pre-B acute lymphoblastic leukemia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 11, 2023. DOI: [10.3389/fcell.2023.1005494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36743421/). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36743421/>.

HUNGER, Stephen P.; RAETZ, Elizabeth A. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population. **Blood**, v. 136, ed. 16, p. 1803-1812, 15 out 2020. DOI: [10.1182/blood.2019004043](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589723/). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32589723/>

JAFFE, E. S. et al. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**: WHO Classification of Tumours. 3. ed. [S. l.: s. n.], 2001. v. 3. ISBN 978-92-832-2411-2.

JAFFREDO, Thierry; GAUTIER, Rodolphe; EICHMANN, Anne; DIETERLEN-LIÈVRE, Françoise. Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. **Development**, [S. l.], v. 125, n. 22, p. 4575–4583, 1998. DOI: [10.1242/dev.125.22.4575](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/101242/)

JAIME-PÉREZ, José C. et al. Results of Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-middle Income Country: 10 Year Experience in Northeast Mexico. **Archives of Medical Research**, v. 47, ed. 8, p. 668-676, Novembro 2016: DOI [10.1016/j.arcmed.2017.01.004](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/101016/). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0188440917300140>

JEHA, Sima et al. Improved CNS Control of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Cranial Irradiation: St Jude Total Therapy Study 16. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 37, n. 35, 2019. DOI: [10.1200/JCO.19.01692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/101200/).

JING, Jiajie et al. Acute T-cell lymphoblastic leukemia: chimeric antigen receptor technology may offer a new hope. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 15, 2024. DOI: [10.3389/fimmu.2024.1410519](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/103389/)

KADRI, Nadir; AMU, Sylvie; IACOBÆUS, Ellen; BOBERG, Erik; LE BLANC, Katarina. Current perspectives on mesenchymal stromal cell therapy for graft versus host disease. **Cellular & Molecular Immunology**, [S. l.], v. 20, p. 613-625, 10 maio 2023. DOI [10.1038/s41423-023-01022-z](https://doi.org/10.1038/s41423-023-01022-z).

KALINA, T. et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. **Leukemia**, [S. l.], v. 26, p. 1986–2010, 2012. DOI: [10.1038/leu.2012.122](https://doi.org/10.1038/leu.2012.122). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/leu2012122>.

KELLY, Kilian; RASKO, John E. J. Mesenchymal stromal cells for the treatment of graft versus host disease. **Frontiers in Immunology**, [S. l.], v. 12, 761616, 25 out. 2021. DOI [10.3389/fimmu.2021.761616](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.761616).

KOBOLAK, Julianna; DINNYES, Andras; MEMIC, Adnan; KHADEMHOSEINI, Ali; MOBASHERI, Ali. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. **Methods**, [S. l.], v. 99, p. 62–68, 2016. DOI: [10.1016/j.ymeth.2015.09.016](https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.016). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104620231530092X>

KRUSE, Aaron et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 1054–1068, 2020. DOI: [10.3390/ijms21031054](https://doi.org/10.3390/ijms21031054). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32033444/>.

LEBIEN, Tucker W.; TEDDER, Thomas F. B lymphocytes: how they develop and function. **Blood**, [S. l.], v. 112, n. 5, p. 1570–1580, 2008. DOI: [10.1182/blood-2008-02-078071](https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-078071).

LEJMAN, Monica; CHALUPNIK, Aleksandra; CHILIMONIUK, Zuzanna; DOBOSZ, Maciej. Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 2755–2786, 2022. DOI: [10.3390/ijms23052755](https://doi.org/10.3390/ijms23052755). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35269896/>.

LIANG, Emily C. et al. Next-generation sequencing–based MRD in adults with ALL undergoing hematopoietic cell transplantation. **Blood Advances**, [S. l.], v. 7, n. 14, p. 3395–3402, 2023. DOI: [10.1182/bloodadvances.2023009856](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023009856).

LIZCOVA, Libuse et al. Cytogenomic characterization of pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia reveals TCR rearrangements as predictive factors for exceptional prognosis. **Molecular Cytogenetics**, [S. l.], v. 17, n. 1, 2024. DOI: [10.1186/s13039-024-00682-4](https://doi.org/10.1186/s13039-024-00682-4).

LOCATELLI, Franco; SCHRAPPE, Martin; BERNARDO, Maria Ester; RUTELLA, Sergio. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [S. l.], v. 120, n. 14, p. 2807–2816, 2012. DOI: [10.1182/blood-2012-02-265884](https://doi.org/10.1182/blood-2012-02-265884).

LONGO, Dan L. **Harrison's Hematology and Oncology**. 1. ed. [S. l.]: McGraw-Hill Medical, 2010. 788 p. ISBN 978-0-07-166336-6.

LUCAS, Daniel. Structural organization of the bone marrow and its role in hematopoiesis. **Current Opinion in Hematology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 36–42, 2021. DOI: [10.1097%2FMOH.0000000000000621](https://doi.org/10.1097%2FMOH.0000000000000621).

MA, Zhenling; ZHAO, Xueli; DENG, Mingjiao; HUANG, Zhengjie; WANG, Jing; WU, Yi; CUI, Dan; LIU, Yingfu; LIU, Rushi; OUYANG, Gaoliang. Bone marrow mesenchymal stromal cell-derived periostin promotes B-ALL progression by modulating CCL2 in leukemia cells. **Cell Reports**, [S. l.], v. 26, n. 6, p. 1533-1543, 5 fev. 2019. DOI [10.1016/j.celrep.2019.01.034](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.034). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30726736/>.

MARTI, Luciana Cavalheiro; BACAL, Nydia Strachman; BENTO, Laiz Camarão; CORREIA, Rodolfo Patussi; ROCHA, Fernanda Agostini. Lymphoid Hematopoiesis and Lymphocytes Differentiation and Maturation. *In: Lymphocyte Updates - Cancer, Autoimmunity and Infection*. [s.l.: s.n.]. p. 192. DOI: [10.5772/intechopen.69058](https://doi.org/10.5772/intechopen.69058).

MARZIANO, Corina; GENET, Gael; HIRSCHI, Karen K. Vascular endothelial cell specification in health and disease. **Angiogenesis**, [S. l.], v. 24, p. 213–236, 2021. DOI:

[10.1007/s10456-021-09785-7](https://doi.org/10.1007/s10456-021-09785-7).

MAXIMOV, Alexander A. Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 4, ed. 4, p. 533-563, outubro 1924.

MILANI, Gloria; LANA, Tobia; BRESOLIN, Silvia; AVEIC, Sanja; PASTÒ, Anna; FRASSON, Chiara; TE KRONNIE, Geertruy. Expression profiling of circulating microvesicles reveals intercellular transmission of oncogenic pathways. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 15, n. 6, p. 683-695, 15 fev. 2017. DOI: [10.1158/1541-7786.mcr-16-0307](https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-16-0307). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28202504/>.

MIOT, Hélio Amante. Análise de sobrevivência em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 267–269, 2017. DOI: [10.1590/1677-5449.001604](https://doi.org/10.1590/1677-5449.001604). Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1088978>.

MULLIGHAN, Charles G. Genomic Characterization of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **Seminars in Hematology**, [S. l.], v. 50, n. 4, p. 314–324, 2013. DOI: [10.1053/j.seminhematol.2013.10.001](https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.10.001). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24246699/>.

NISHIKAWA, Shin-Ichi; NISHIKAWA, Satomi; HIRASHIMA, Masanori; MATSUYOSHI, Norihisa; KODAMA, Hiroaki. Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. **Development**, [S. l.], v. 125, n. 9, p. 1747–1757, 1998. DOI: [10.1242/dev.125.9.1747](https://doi.org/10.1242/dev.125.9.1747). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9521912/>.

OBERLIN, Estelle; TAVIAN, Manuela; BLAZSEK, István; PÉAULT, Bruno. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. **Development**, [S. l.], v. 129, n. 17, p. 4147–4157, 2002. DOI: [10.1242/dev.129.17.4147](https://doi.org/10.1242/dev.129.17.4147). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12163416/>.

OLIVEIRA, Elen et al. Bone Marrow Stromal Cell Regeneration Profile in Treated B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Association with MRD Status and Patient Outcome. **Cancers**, [S. l.], v. 14, n. 13, p. 3088–3105, 2022. DOI: [10.3390/cancers14133088](https://doi.org/10.3390/cancers14133088).

OMAR, Abdallah A.; BASIOUNY, Lina; ELNOBY, Ahmed S.; ZAKI, Abeer; ABOUZID, Mohamed. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. **Journal of the Egyptian National Cancer Institute**, [S. l.], v. 34, 2022. DOI: [10.1186/s43046-022-00126-3](https://doi.org/10.1186/s43046-022-00126-3).

ONCIU, Mihaela. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, [S. l.], v. 23, n. 4, p. 655–674, 2009. DOI: [10.1016/j.hoc.2009.04.009](https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19577163/>.

ORKIN, Stuart H.; ZON, Leonard I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, [S. l.], v. 132, n. 4, p. 631–644, 2008. DOI: [10.1016/j.cell.2008.01.025](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025).

PADUA, David; ZHANG, Xiang H-F; WANG, Qiongqing; NADAL, Cristina; GERALD, William L; GOMIS, Roger R; MASSAGUÉ, Joan. TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. **Cell**, [S. l.], v. 133, n. 1, p. 66-77, 4 abr. 2008. DOI [10.1016/j.cell.2008.01.046](https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.046). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394990/>.

PALMI, Chiara et al. Cytoskeletal Regulatory Gene Expression and Migratory Properties of B-cell Progenitors Are Affected by the ETV6–RUNX1 Rearrangement. **Molecular Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 12, p. 1796–1806, 2014. DOI: [10.1158/1541-7786.MCR-14-0056-T](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0056-T)

PAVON, Lorena Favaro et al. Tropism of mesenchymal stem cell toward CD133⁺ stem cell of glioblastoma in vitro and promote tumor proliferation in vivo. **Stem Cell Research & Therapy**, [S. l.], v. 9, 2018. DOI: [10.1186/s13287-018-1049-0](https://doi.org/10.1186/s13287-018-1049-0).

POBER, Jordan S.; SESSA, William C. Evolving functions of endothelial cells in

inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 7, p. 803–815, 2007. DOI: [10.1038/nri2171](https://doi.org/10.1038/nri2171).

PORTALE, Federica et al. ActivinA: a new leukemia-promoting factor conferring migratory advantage to B-cell precursor-acute lymphoblastic leukemic cells. **Haematologica**, [S. l.], v. 104, n. 3, mar. 2019. DOI [10.3324/haematol.2018.188664](https://doi.org/10.3324/haematol.2018.188664).

PUI, Ching-Hon et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 465–474, 2015. DOI: [10.1016/S1470-2045\(15\)70082-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70082-3)

RAETZ, Elizabeth A.; TEACHEY, David T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Hematology**, [S. l.], v. 2016, n. 1, p. 580–588, 2016. DOI: [10.1182/asheducation-2016.1.580](https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.580)

RAVANDI, Farhad et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 909–915, 2015. DOI: [10.1111/bjh.13834](https://doi.org/10.1111/bjh.13834).

REISSMANN, Kurt R. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. **Blood**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 372–380, 1950. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15411424>.

RIBATTI, D.; VACCA, A. Models for Studying Angiogenesis in Vivo. **The International Journal of Biological Markers**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 207–213, 1999. DOI: [10.1177/172460089901400403](https://doi.org/10.1177/172460089901400403). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10669948/>.

RIBERA, Josep-Maria et al. Treatment of High-Risk Philadelphia Chromosome–Negative Acute Lymphoblastic Leukemia in Adolescents and Adults According to Early Cytologic Response and Minimal Residual Disease After Consolidation Assessed by Flow Cytometry: Final Results of the PETHEMA

ALL-AR-03 Trial. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 32, n. 15, p. 1595–1604, 2014. DOI: [10.1200/JCO.2013.52.2425](https://doi.org/10.1200/JCO.2013.52.2425).

RUHENSTROTH-BAUER, G. Reticulocyte and erythrocyte longevity. **Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 28, p. 780–783, 1950. DOI: <https://doi.org/10.1007/bf01482817>.

SAGE, Elizabeth K.; THAKRAR, Ricky M.; JANES, Sam M. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. **Cytotherapy**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 1435–1445, 2016. DOI: [10.1016/j.jcyt.2016.09.003](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.003).

SCHNITTGER, Susanne. Minimal residual disease monitoring: a new era for childhood ALL. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 16, n. 4, p. 362–364, 2015. DOI: [10.1016/S1470-2045\(15\)70123-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70123-3)

SCHUMICH, Angela et al. Flow-cytometric minimal residual disease monitoring in blood predicts relapse risk in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in trial AIEOP-BFM-ALL 2000. **Pediatric Blood & Cancer**, [S. l.], v. 66, n. 5, 2019. DOI: [10.1002/pbc.27590](https://doi.org/10.1002/pbc.27590)

SHORT, Nicholas J. et al. High-sensitivity next-generation sequencing MRD assessment in ALL identifies patients at very low risk of relapse. **Blood Advances**, [S. l.], v. 6, n. 13, p. 4006–4014, 2022. DOI: [10.1182/bloodadvances.2022007378](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007378).

SIDHU, Jasmeet; GOGOI, Manash Pratim; KRISHNAN, Shekhar; SAHA, Vaskar. Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. **Indian Journal of Pediatrics**, [S. l.], v. 91, n. 2, p. 158–167, 2024. DOI: [10.1007/s12098-023-04635-4](https://doi.org/10.1007/s12098-023-04635-4). Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s12098-023-04635-4>.

SIERRA-FILARDI, Elena et al. CCL2 shapes macrophage polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-dependent gene expression profile. **The Journal of Immunology**, [S. l.], v. 192, n. 8, p. 3858–3867, 15 abr. 2014. DOI [10.4049/jimmunol.1302821](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302821). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24639350/>.

TAVERNA, Simona; FLUGY, Anna; SAIEVA, Laura; KOHN, Elise C.; SANTORO, Alessandra; MERAVIDGLIA, Serena; DE LEO, Giacomo; ALESSANDRO, Riccardo. Role of exosomes released by chronic myelogenous leukemia cells in angiogenesis. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 130, n. 9, p. 2033-2043, 22 fev. 2012. DOI [10.1002/ijc.26217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21630268). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21630268>.

THEUNISSEN, Prisca et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, [S. l.], v. 129, n. 3, p. 347–357, 2017. DOI: 10.1182/blood-2016-07-726307. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/129/3/347/36021/Standardized-flow-cytometry-for-highly-sensitive>.

TRIMM, Emily; RED-HORSE, Kristy. Vascular endothelial cell development and diversity. **Nature Reviews Cardiology**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 197–210, 2023. DOI: [10.1038/s41569-022-00770-1](https://doi.org/10.1038/s41569-022-00770-1).

VALENCIA, Jaris; FERNÁNDEZ-SEVILLA, Lidia M.; FRAILE-RAMOS, Alberto; SACEDÓN, Rosa; JIMÉNEZ, Eva; VICENTE, Angeles; VARAS, Alberto. Acute lymphoblastic leukaemia cells impair dendritic cell and macrophage differentiation: Role of BMP4. **Cells**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. 533-545, 14 jul. 2019. DOI [10.3390/cells8070722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337120/). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337120/>.

VAN DONGEN, Jacques J. M.; VAN DER VELDEN, Vincent H. J.; BRÜGGEMANN, Monika; ORFAO, Alberto. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. **Blood**, [S. l.], v. 125, n. 26, p. 3996–4009, 2015. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/125/26/3996/34323/Minimal-residual-disease-diagnostics-in-acute>.

VAN ZIJL, Franziska; KRUPITZA, Georg; MIKULITS, Wolfgang. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, [S. l.], v. 728, n. 1-2, p. 23-34, jul.-out. 2011. DOI

[10.1016/j.mrrev.2011.05.002](https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2011.05.002).

Disponível

em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21605699/>.

VERBEEK, Martjin W. C.; VAN DER VELDEN, Vincent H. J. The Evolving Landscape of Flowcytometric Minimal Residual Disease Monitoring in B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 4889, ed. 9, 30 abr. 2024. DOI [10.3390/ijms25094881](https://doi.org/10.3390/ijms25094881). Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/9/4881>. Acesso em: 23 ago. 2024.

WANG, Jinheng; HENDRIX, An; HERNOT, Sophie; LEMAIRE, Miguel; DE BRUYNE, Elke; VAN VALCKENBORGH, Els; LAHOUTTE, Tony; DE WEVER, Olivier; VANDERKERKEN, Karin; MENU, Eline. Bone marrow stromal cell-derived exosomes as communicators in drug resistance in multiple myeloma cells. **Blood**, [S. l.], v. 124, n. 4, p. 555-566, 24 jul. 2014. DOI <https://doi.org/10.1182/blood-2014-03-562439>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120399377>.

WANG, Lei; YI, Weijun; MA, Li; LECEA, Emily; HAZLEHURST, Lori A.; ADJEROH, Donald A.; HU, Gangqing. Inflammatory Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Multiple Myeloma: Transcriptional Signature and In Vitro Modeling. **Cancers**, [S. l.], v. 15, n. 21, p. 5148–5163, 2023. DOI: [10.3390/cancers15215148](https://doi.org/10.3390/cancers15215148).

XU, Maosen; ZHANG, Tao; XIA, Ruolan; WEI, Yuquan; WEI, Xiawei. Targeting the tumor stroma for cancer therapy. **Molecular Cancer**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 208, 2022. DOI: 10.1186/s12943-022-01670-1. Disponível em: <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-022-01670-1>.

ZHANG, Rongrong; ZHU, Haiyan; YUAN, Yufang; ZHAO, Jiou; YANG, Xiaochun; TIAN, Zhaofang. Risk Factors for Relapse of Childhood B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Medical Science Monitor**, [S. l.], v. 26, 2020. DOI: 10.12659/MSM.923271. Disponível em: <https://www.medscimonit.com/abstract/index/idArt/923271>.