



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA - PPGIBA



**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO-FUNCIONAL DE
CÉLULAS T $\gamma\delta$ EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

MATEUS DE SOUZA BARROS

Manaus – AM

2024

MATEUS DE SOUZA BARROS

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO-FUNCIONAL DE
CÉLULAS T $\gamma\delta$ EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. JERUSA ARAÚJO QUINTÃO ARANTES FARIA

Manaus – AM

2024

Ficha Catalográfica

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

Barros, Mateus de Souza
B277c Caracterização do perfil fenotípico-funcional de células T gama-delta em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células B / Mateus de Souza Barros . 2024
178 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa
Coorientadora: Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Leucemia. 2. Microambiente tumoral. 3. Células T gama-delta.
4. Imunovigilância. 5. Perfil imunológico. I. Costa, Allyson
Guimarães da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB-UFAM)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA (PPGIBA)**

MATEUS DE SOUZA BARROS

Caracterização do perfil fenotípico-funcional de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células B

ORIENTADOR: Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria

BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

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

Prof^a. Dr^a. Aya Sadahiro – Membro Titular Interno
Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza – Membro Titular Externo
Centro de Terapia Celular da Universidade de São Paulo (CTC-USP) / Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FHRP)

DEDICATÓRIA

Ninguém se torna quem é sozinho. Acho que, da mesma forma, ninguém faz ciência sozinho. Durante toda a nossa jornada, inúmeros acontecimentos contribuem para a nossa construção, muitas vezes passando despercebidos. Quero dedicar este espaço às pessoas que sempre foram essenciais em minha vida, sobretudo àquelas que me desejaram o melhor sempre. Além disso, gostaria de incluir nesta dedicatória aqueles que duvidaram de mim, que não se contentaram ou não se alegraram com meu crescimento e com as minhas conquistas, pois foram eles que, de certa forma, me fortaleceram. Este trabalho é também para aqueles que acreditaram na minha capacidade de superação e sabem do meu potencial e da relevância deste projeto.

À minha mãe, dona Adriana, e ao meu pai, senhor Chagas, por devotarem parte da vida, do tempo, do espaço, muito suor e muito trabalho, ensinando-me a trilhar meus caminhos com educação, honestidade, humildade, responsabilidade e muita determinação. Com amor incondicional, me deram forças para chegar até aqui. Dedico a cada lágrima, suor, suspiro, alegrias e tristezas que já passamos.

Ao meu irmão Elias (meu sócia!), à minha irmã Camila, e, agora, à minha sobrinha Ana (Pitica!), pelas conversas, desabafos e reflexões sobre tudo e todos (haha!). Absolutamente vitais para a manutenção da minha saúde mental e felicidade! Muita coisa já aconteceu, mas sempre permanecemos unidos.

Às inúmeras amigadas que já passaram por minha vida e às poucas que permaneceram. Da Graduação, da Especialização, do Mestrado e além!

Ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB-UFAM) e à Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). Espero profundamente que a pesquisa, o desenvolvimento científico e a inovação tecnológica os posicionem futuramente no topo dos centros de geração de conhecimento na Amazônia, pois são ambientes extraordinariamente catalisadores para jovens cientistas, permitindo a integração do trabalho clínico e laboratorial de uma forma muito profícua.

Por fim, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Lembrem-se que “Pesquisador é a espécie mais rara da Amazônia”. Fazemos muito do pouco. Cada recurso subtraído é uma oportunidade perdida de desvendar os mistérios da natureza, de inovar e transformar realidades.

A todos vocês,

sinceramente,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

De uma forma muito carinhosa, queria expressar minha gratidão aos meus pais, **Chagas e Adriana**, aos meus irmãos **Elias e Camila**, e aos meus familiares, em especial à **Raqueane**, que foi a primeira pessoa que me iniciou na busca por estudos e trabalho nessa vida louca que são as coisas aqui na capital, longe da tranquilidade do interior. Vocês são a minha base. Obrigado por tudo e por me apoiarem a todo momento, mesmo quando estive, muitas vezes, ausente.

Gostaria também de agradecer aos **colegas e amigos** do HEMOAM e do ICB-UFAM pela parceria durante as disciplinas da pós-graduação e no desenvolvimento desse projeto de pesquisa. São muitas pessoas envolvidas, e não conseguirei citar cada uma delas aqui. Entretanto, não meço esforços para ressaltar o quanto sou grato por ter feito parte de um grupo de pesquisa tão importante, agora recém-nomeado “Grupo Amazônico de Pesquisa Interdisciplinar em Saúde – **Amazon InterScience**”. Lembro-me de quando me juntei à equipe, apenas eu e mais três pessoas no Grupo de Imunologia das Leucemias. Hoje já somos mais de trinta.

Ao Prof. Dr. **Allyson Guimarães da Costa**, por confiar nesta pesquisa e no meu trabalho. Talvez eu não tenha sido um aluno muito comunicativo, mas saiba que sou extremamente grato pela confiança em mim depositada, pelas oportunidades concedidas, lições aprendidas e por contribuir com meu aperfeiçoamento como profissional e como pessoa. MUITO OBRIGADO!

À Prof^a Dr^a **Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria**, por aceitar me coorientar neste projeto de pesquisa. As aulas e as nossas discussões na disciplina de Imunologia de Tumores foram o ponto de virada para determinar o quanto eu amo fazer pesquisa científica nessa área. Adorei nossas poucas (mas valiosíssimas) conversas sobre o projeto, o microambiente do tumor, as células T e a imunoterapia do câncer. Sou grato pela primeira reunião empolgante que tivemos no Laboratório de Bioquímica Molecular do ICB-UFAM. Foi muito importante!! Também não esqueço da experiência que tive no curso de células-tronco (Escola Paulista de Medicina - UNIFESP/FAPESP). Sou grato pela ajuda. Voltei com novas expectativas de pesquisa. MUITO OBRIGADO MESMO!

Um agradecimento especial à minha primeira aluna de iniciação científica (embora não tenha sido oficializado, hihi!), **Yasmim Vidinha de Paula**, pela dedicação e comprometimento no seu primeiro estudo científico. Fiquei feliz porque já não estava mais sozinho estudando os linfócitos T e tinha agora com quem compartilhar um pequeno braço da minha pesquisa sobre as minhas células favoritas. Obrigado por toda a ajuda com os inúmeros tubos de citometria, parceira! Você vai longe! Te desejo muito sucesso na sua vida acadêmica e profissional.

Ao **Programa de Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)** do ICB-UFAM, do qual fiz parte durante todo este tempo, pela excelente formação que tive. Em especial, quero agradecer à Prof^a Dr^a **Aya Sadahiro**. Lembro de tê-la ouvido dizer (mais de uma vez!), após minha aula no estágio docência, que me considera seu neto científico (haha!). Sou muito grato pelos conselhos e pelos vastos elogios que dela recebi. Me ajudaram a tomar decisões que antes eu relutava, mas que agora estou confiante do que decidi. Foi uma experiência de vida muito importante os três meses no estágio docência. MINHA MAIS FORTE GRATIDÃO E CARINHO!

À **Secretaria do PPGIBA**, especialmente ao **Edson**, à **Ana Paula** e à **Magda**, pela ajuda com os assuntos burocráticos relacionados ao programa, do início ao fim do mestrado.

À **Fundação HEMOAM**, que se tornou minha segunda casa. Nunca imaginei que um dia atravessaria os portões da fundação para fazer ciência, logo eu, na época, recém-chegado na graduação, cheio de medos, inseguranças, mas também cheio de esperança de mudar de vida. Carrego meu crachá com muito orgulho. Foram muitos plantões de virada na frente do citômetro de fluxo, madrugadas adentro, lendo os numerosos tubos de citometria. Agradeço especialmente às Enfermeiras **Josema**, **Hilma**, **Ivani**, **Nazaré** e aos demais dos laboratórios de diagnóstico, pela parceria na obtenção de amostras para a realização desse estudo. Sem vocês, este trabalho sequer veria a luz do dia. VALEUZÃO, EQUIPE!

Aos **pacientes pediátricos e seus responsáveis** pelo aceite em participar do presente estudo e contribuir para o desenvolvimento e progresso da ciência. Também agradeço profundamente às crianças recrutadas para o nosso estudo, que, infelizmente, não conseguiram vencer essa difícil batalha contra o câncer (*in memoriam*). Essa luta começa e termina com as pessoas. No meio da abstração científica, às vezes é possível que a gente esqueça desse fato básico... tenho a firme expectativa de que os frutos dessa dissertação irão contribuir para a geração de novas terapias que, num futuro muito próximo, poderão beneficiar muitos pacientes que são diagnosticados com essa doença a cada ano. MUITO OBRIGADO A CADA UM DE VOCÊS!

Ao **ICB-UFAM**, que foi, de certa forma, minha terceira casa. Tive ótimas experiências indo à UFAM para assistir os muitos congressos, simpósios, aulas e cursos. De lá saiu meu primeiro prêmio/reconhecimento científico, quando eu ainda estava engatinhando na iniciação científica. Sou muito grato por isso, pois me motivou a retornar, anos mais tarde, como aluno de mestrado. Ambiente super catalisador para a educação e ciência!!

À **FAPEAM**, pela bolsa de mestrado e auxílio financeiro ao nosso grupo de pesquisa.

Aos **membros da banca**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho. Sou extremamente grato pelo aceite, pelos feedbacks construtivos e críticas valiosas sobre o presente estudo.

E, por fim, agradeço a todos os que não nomeei, mas que estiveram envolvidos de forma direta ou indireta na realização deste projeto... deste sonho.

A todos serei sempre grato! Muito obrigado!!

Com sincero carinho,

Mateus Barros.

“A ciência tornou-se uma realidade para mim. No meio de tudo isso, acho que consigo identificar alguma poesia. Somos uma espécie de poema e, assim como um poema deve terminar, somos a última estrofe que chegou ao fim. Posso não ter ido aonde eu pretendia ir, mas sinto que cheguei aonde eu deveria estar. Que esta dissertação seja um convite à reflexão, à pesquisa, à inovação, à expansão do horizonte do saber, guiando os passos daqueles que virão depois. Ainda há muito o que descobrir, um longo caminho a percorrer. A resposta está no sangue, circulando dentro de cada um de nós...”

O autor

DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa de estudos concedida por meio do Programa POSGRAD, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos, ainda, à FAPEAM, que, por meio das resoluções de nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 (Programa PRÓ-ESTADO), financiou indiretamente esta pesquisa.

Caracterização do perfil fenotípico-funcional de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células B

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

MATEUS DE SOUZA BARROS

RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) é o tipo mais comum de câncer na infância, caracterizado pela alta contagem de células leucêmicas na medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), levando ao recrutamento de células imunes que podem contribuir para o controle do tumor. Enquanto células T alfa-beta ($\alpha\beta$) são fortemente afetadas pela doença, as células T gama-delta ($\gamma\delta$) mostraram ser citotóxicas e menos suscetíveis à exaustão, mas sua relevância funcional na leucemia permanece elusiva. Nesse sentido, nosso estudo buscou caracterizar o perfil fenotípico-funcional de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B submetidos a quimioterapia de remissão. Foi realizado um estudo exploratório, longitudinal e prospectivo na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) com a colaboração do Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (IRR/Fiocruz-Minas). A partir de amostras de MO e SP de pacientes pediátricos com LLA-B ao longo do tratamento e amostras de SP de crianças saudáveis, foi realizada uma avaliação robusta do perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ V δ 1 e V δ 2 por citometria de fluxo e quantificados mediadores imunológicos solúveis relacionados através da plataforma Luminex. No geral, os resultados demonstraram que os pacientes com LLA-B, em comparação com o grupo controle, apresentaram um aumento significativo de células V δ 2 expressando marcadores de ativação e citotoxicidade. A avaliação da cinética durante a quimioterapia demonstrou que este subconjunto manteve um fenótipo ligado a citotoxicidade e não a exaustão. Além disso, a expressão de CD69 e NKG2D foi enriquecida em células T $\gamma\delta$ de pacientes com baixa carga tumoral e baixo risco, enquanto pacientes sem doença residual mensurável (DRM) ao D35 exibiram maior frequência de células V δ 1 CXCR3⁺CXCR4⁺ na MO. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que descreve a frequência e perfil imunológico dos subconjuntos de células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B pediátrica.

Palavras-chave: Leucemia; Microambiente tumoral; Células T gama-delta; Imunovigilância; Perfil imunológico.

Phenotypic and functional characterization of $\gamma\delta$ T cells in pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia

MASTER THESIS

MATEUS DE SOUZA BARROS

ABSTRACT

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common type of childhood cancer, characterized by the high presence of leukemic cells in the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB), leading to the recruitment of immune cells that may contribute to tumor control. While alpha-beta ($\alpha\beta$) T cells are strongly affected by the disease, gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells are cytotoxic and less susceptible to exhaustion, but their functional relevance in leukemia remains elusive. This work aimed to characterize the phenotypic and functional profile of $\gamma\delta$ T cells in pediatric patients with B-ALL undergoing remission chemotherapy. It is an exploratory, longitudinal, and prospective study, carried out at the Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) in partnership with the Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (IRR-Fiocruz Minas). Using BM and PB samples from pediatric patients with B-ALL, obtained during chemotherapy treatment, and PB samples from healthy children, a robust evaluation of the immunological profile of V δ 1 and V δ 2 cells was performed by flow cytometry and different soluble immune mediators were measured through the Luminex platform. Our results demonstrated that patients with B-ALL, compared to the control group, presented a significant increase in V δ 2 cells expressing activation and cytotoxicity markers. The kinetic evaluation during chemotherapy demonstrated that this subset maintained a phenotype linked to cytotoxicity and not exhaustion. Furthermore, the expression of CD69 and NKG2D was enriched in $\gamma\delta$ T cells from patients with low tumor burden and low risk, while patients that did not exhibit measurable residual disease (MRD) at D35 exhibited a higher frequency of CXCR3⁺ CXCR4⁺ V δ 1 cells in the BM. This is the first study describing the frequency and immunological profile of $\gamma\delta$ T cells in patients with pediatric B-ALL.

Keywords: Leukemia; Tumor microenvironment; gamma-delta T cells; Immunosurveillance; Immunological profile.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Principais subtipos de leucemia aguda na infância.....	23
Figura 2. Avanços na sobrevida global da LLA pediátrica ao longo do tempo	24
Figura 3. Incidência de LLA no estado do Amazonas	25
Figura 4. Fatores de risco potenciais e estabelecidos para a LLA-B na infância.....	26
Figura 5. Um modelo para a tumorigênese e evolução da LLA-B na infância.....	28
Figura 6. Microarquitetura da medula óssea	38
Figura 7. Hematopoiese normal e leucêmica	41
Figura 8. Imunoedição do câncer	45
Figura 9. Inibição da imunovigilância por checkpoints imunológicos	51
Figura 10. Fluxograma de obtenção das amostras	63
Figura 11. Estratégia de identificação de células T $\gamma\delta$	65
Figura 12. Caracterização da frequência de células T $\gamma\delta$ nos pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B	73
Figura 13. Análise do perfil de mediadores imunológicos solúveis ao diagnóstico	74
Figura 14. Análise do estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico	75
Figura 15. Análise do estado de ativação das células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico	77
Figura 16. Expressão de marcadores associados a capacidade citotóxica em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico	78
Figura 17. Expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico	79
Figura 18. Expressão de receptores de quimiocina em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico.....	81
Figura 19. Cinética das células T $\gamma\delta$ durante a quimioterapia de remissão.....	82
Figura 20. Cinética dos mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão.....	84
Figura 21. Cinética dos marcadores de ativação em células V δ 1 durante a quimioterapia de remissão	86
Figura 22. Cinética dos marcadores associados a capacidade citotóxica em células V δ 1 durante a quimioterapia de remissão.....	87
Figura 23. Cinética dos <i>checkpoints</i> imunológicos em células V δ 1 durante a quimioterapia de remissão	88

Figura 24. Cinética dos receptores de quimiocina em células Vδ1 durante a quimioterapia de remissão	89
Figura 25. Cinética de diferenciação das células Vδ1 durante a quimioterapia de remissão	91
Figura 26. Cinética dos marcadores de ativação em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão	92
Figura 27. Cinética dos marcadores associados a capacidade citotóxica em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão	93
Figura 28. Cinética dos <i>checkpoints</i> imunológicos em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão	95
Figura 29. Cinética dos receptores de quimiocina em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão	96
Figura 30. Cinética de diferenciação das células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão	97
Figura 31. Frequência de células T γδ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	98
Figura 32. Perfil de ativação das células Vδ1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	99
Figura 33. Perfil de citotoxicidade das células Vδ1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	100
Figura 34. Perfil da expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos em células Vδ1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	101
Figura 35. Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células Vδ1 de pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	102
Figura 36. Estado de diferenciação das células Vδ1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	103
Figura 37. Perfil de ativação das células Vδ2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	104
Figura 38. Perfil de citotoxicidade das células Vδ2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	105
Figura 39. Perfil da expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos em células Vδ2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	106
Figura 40. Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células Vδ2 de pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	107
Figura 41. Estado de diferenciação das células Vδ2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica	108
Figura 42. Frequência de células T γδ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	109

Figura 43. Perfil de ativação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	110
Figura 44. Perfil de citotoxicidade das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	111
Figura 45. Perfil da expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos em células V δ 1 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	112
Figura 46. Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 1 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	113
Figura 47. Estado de diferenciação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	114
Figura 48. Perfil de ativação das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	115
Figura 49. Perfil de citotoxicidade das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	116
Figura 50. Perfil da expressão de <i>checkpoints</i> imunológicos em células V δ 2 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	117
Figura 51. Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 2 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	118
Figura 52. Estado de diferenciação das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15	119
Figura 53. Frequência de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	120
Figura 54. Perfil de ativação das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	121
Figura 55. Perfil de citotoxicidade das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	122
Figura 56. Perfil de expressão dos <i>checkpoints</i> imunológicos em células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	123
Figura 57. Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células T $\gamma\delta$ de pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	124
Figura 58. Estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35	125
Figura 59. Redes biológicas de células T $\gamma\delta$ durante a quimioterapia de remissão	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Perfil imunofenotípico das leucemias de linhagem B e T.....	31
Quadro 2. Classificação da LLA, conforme a OMS.	32
Quadro 3. Critérios para estratificação de grupos de risco ao diagnóstico (GBTLI-2009). ...	34
Quadro 4. Critérios para estratificação de grupos de risco (BFM-2009).	35
Quadro 5. Painel de marcadores para a imunofenotipagem de células T $\gamma\delta$	63
Quadro 6. Titulação dos anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sociodemográficas da população de estudo.	68
Tabela 2. Características hematológicas da população de estudo.	69
Tabela 3. Características clínico-patológicas da população de estudo ao diagnóstico.....	70
Tabela 4. Estratificação de risco e DRM medular durante a quimioterapia de remissão.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células apresentadoras de antígenos (<i>Antigen presenting cells</i>)
AR	Alto risco
BR	Baixo risco
BTN	Butirofilina
BTLA	Atenuador de linfócitos T e B (<i>B and T lymphocyte attenuator</i>)
CAAE	Certificado de apresentação de apreciação ética
CAR-T	Células T expressando receptores quiméricos de antígeno
CD	Cluster de diferenciação
CTHs	Células-Tronco hematopoiéticas
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CLs	Células leucêmicas
CTMs	Células-Tronco mesenquimais
CTLA4	Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico (<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i>)
CXCL	Ligante de quimiocina C-X-C (<i>C-X-C motif chemokine ligand</i>)
D0	Dia do diagnóstico do protocolo de tratamento
D8	Dia 8 da terapia de indução da remissão do protocolo de tratamento
D15	Dia 15 da terapia de indução da remissão do protocolo de tratamento
D35	Dia 35 da terapia de indução da remissão do protocolo de tratamento
D84	Dia 84 da terapia de consolidação da remissão do protocolo de tratamento
DNAM-1	Molécula acessória 1 DNAX (<i>DNAX accessory molecule-1</i>)
DRM	Doença residual mensurável
FasL	Ligante de Fas
FcγRIII	Receptor fagocítico Fc gama R tipo III (<i>Phagocytic receptor Fc gamma R type III</i>)
GBTLI	Grupo brasileiro de tratamento da leucemia infantil
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HMBPP	(E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN-γ	Interferon-gama
IPP	Isopentenil pirofosfato
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células B
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras
LLC	Leucemia linfocítica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LAG3	Gene de ativação de linfócitos 3 (<i>Lymphocyte activation gene-3</i>)
MDSC	Células supressoras derivadas de mieloide
MAIT	T invariante associada a mucosa
MICA/B	Proteínas A/B relacionadas ao MHC-I (<i>MHC-I polypeptide-related sequence A/B</i>)
MO	Medula óssea
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MR1	Proteína relacionada ao MHC-I (<i>MHC class I-related protein</i>)
NCRs	Receptores naturais de citotoxicidade (<i>Natural cytotoxicity receptors</i>)
NK	Assassina natural (<i>Natural Killer</i>)
NKRs	Receptores de células NK
NKT	T assassina natural (<i>Natural Killer T</i>)
NKG2D	Receptor de células NK membro D do grupo 2 (<i>Natural killer group 2 member D</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAgs	Fosfoantígenos
PD1	Proteína de morte celular programada 1 (<i>Programmed cell death 1</i>)
PDL1/2	Ligante 1/2 de PD1 (<i>PD1 ligand 1/2</i>)
PLC	Precursor linfoide comum
PMIL	Precursor multipotente com iniciação linfoide
PPP	Plasma pobre em plaquetas
SAME	Setor de Atendimento Médico e Estatístico
SNC	Sistema nervoso central
SCF	Fator de células-tronco
SP	Sangue periférico
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tdt	Transferase desoxinucleotidil terminal
TGFβ	Fator de crescimento transformante beta
TILs	Linfócitos infiltrantes de tumor
TIGIT	Imunorreceptor de células T com domínios ITIM e Ig (<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>)
TIM3	Imunoglobulina de células T e mucina 3 (<i>T-cell immunoglobulin mucin-3</i>)
TME	Microambiente tumoral
TMO	Transplante de medula óssea
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (<i>Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Th	Linfócitos T helper / auxiliar
Th1	Linfócitos T helper 1
Th2	Linfócitos T helper 2
Th17	Linfócitos T helper 17
Tregs	Linfócitos T regulatórios
TCR	Receptor de célula T
ULBP	Proteínas de ligação a UL16 (<i>UL16-binding proteins</i>)
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
αβ	Alfa-beta
γδ	Gama-delta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B.....	22
2.1.1. Epidemiologia.....	22
2.1.2. Fatores de risco	25
2.1.3. Etiologia genética e patogênese.....	27
2.1.4. Diagnóstico e classificação.....	30
2.1.5. Manejo clínico e prognóstico	32
2.2. NICHOS E MICROAMBIENTES DA MEDULA ÓSSEA	36
2.2.1. Arquitetura anatômica e funcional	36
2.1.1. Na hematopoiese normal	37
2.1.2. No nicho transformado	40
2.2. VIGILÂNCIA IMUNOLÓGICA NA LEUCEMIA	44
2.2.1. Interação células imunes–células leucêmicas.....	47
2.2.2. <i>Checkpoints</i> da imunovigilância.....	49
2.2.3. Resposta imune mediada por células T não convencionais.....	52
2.3. CÉLULAS T $\gamma\delta$	53
2.3.1. Desenvolvimento e diferenciação.....	53
2.3.2. Diversidade fenotípica e funcional	55
2.3.3. Funções das células T $\gamma\delta$ no câncer.....	57
2.3.4. Células T $\gamma\delta$ na leucemia.....	58
3. OBJETIVOS	59
3.1. Objetivo geral	59
3.2. Objetivos Específicos	59
4. MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1. Aspectos éticos	60
4.2. Modelo de estudo	60
4.3. População de estudo	61
4.4. Tamanho amostral e tipo de amostragem do estudo.....	61
4.5. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão	61
4.6. Obtenção e Processamento das amostras	62
4.7. Imunofenotipagem de células T $\gamma\delta$	63
4.8. Dosagem de mediadores imunológicos solúveis	66

4.9. Obtenção dos dados sociodemográficos, hematológicos e clínico-patológicos	66
4.10. Análise descritiva e estatística	67
5. RESULTADOS	68
5.1. Características da população de estudo	68
5.2. Análise do perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ e mediadores imunológicos solúveis ao diagnóstico	72
5.3. Análise do perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ e mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão	81
5.4. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a carga tumoral ao diagnóstico	98
5.5. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a estratificação do grupo de risco no D15 da quimioterapia de remissão	109
5.6. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a detecção de DRM medular no D35 da quimioterapia de remissão	120
5.7. Análise das redes biológicas integrativas de células T $\gamma\delta$ e os mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão	126
6. DISCUSSÃO	127
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	138
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
9. FINANCIAMENTO E INFRAESTRUTURA	140
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141
11. ANEXOS.....	170

1. INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) é uma neoplasia hematológica caracterizada por um bloqueio no desenvolvimento de células B precursoras e representa o tipo de câncer mais comum na infância (1). A proliferação rápida e descontrolada dessas células B malignas (linfoblastos) resulta na diminuição de eritrócitos, plaquetas e leucócitos diferenciados na medula óssea (MO), comprometendo a função hematopoiética normal (2). Consequentemente, essas células leucêmicas (CLs) são liberadas no sangue periférico (SP) e infiltram diferentes tecidos periféricos, já que elas retêm características intrínsecas essenciais como capacidade proliferativa e migratória, além de forte resistência aos mecanismos de imunovigilância e apoptose (3).

Em diferentes tecidos, as CLs constantemente interagem com diferentes tipos celulares derivados do estroma e do sistema imunológico (4). Durante a progressão da doença, elas sequestram muitas funções homeostáticas dos diferentes nichos teciduais para proliferar, sobreviver e evitar seu reconhecimento e eliminação (5). Apesar disso, em alguns casos, essas interações resultam num processo inflamatório que se manifesta mais proeminentemente em uma mobilização de células T para o microambiente do tumor (TME), com potencial de iniciar uma resposta antitumoral (6–9). Portanto, a inflamação é um constituinte-chave na progressão ou controle da doença e determina o prognóstico clínico em diferentes tipos de câncer, incluindo leucemias (10,11).

Há mais de três décadas, tem sido apreciado que a presença desses ‘linfócitos infiltrantes de tumor’ (TILs) pode, paradoxalmente, restringir e promover o desenvolvimento e progressão do câncer. Pesquisas no campo destacaram que o recrutamento dessas células efetoras transcende o tipo de tumor e sugere um sinal importante de imunidade antitumoral (12–14). Na leucemia, as células T mobilizadas para a MO são capazes de detectar e eliminar CLs e essas respostas geralmente são mediadas por moléculas individuais de alta ou baixa diversidade, como o receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ (9,15–18). Embora a biologia e potencial terapêutico das células T $\alpha\beta$ ($CD4^+/CD8^+$) estejam bem reconhecidas nesse contexto, relatórios recentes revelaram uma importância sem precedentes para as células T $\gamma\delta$, uma subpopulação única de linfócitos com forte participação na imunovigilância de tumores (19).

Diferentemente das células T $\alpha\beta$ convencionais, restritas a detecção de antígenos peptídicos apresentados pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC), as células T $\gamma\delta$ reconhecem diferentes ligantes de forma irrestrita ao MHC e suas funções efetoras dependem de alvos mais ubíquos e monomórficos (20). Nesse contexto, uma terapia potencial contra

tumores como a leucemia pode depender da mobilização e direcionamento de células efetoras capazes de produzir fatores antitumorais e eliminar CLs em diferentes tecidos na ausência de toxicidade ou alorreatividade. Sendo assim, as células T $\gamma\delta$ apresentam um alto potencial para o desenvolvimento promissor de uma terapia celular “de prateleira” (*off-the-shelf*) (16), uma vez que esses linfócitos exibem uma potente resposta imune através de mecanismos de alta citotoxicidade e forte produção de mediadores imunológicos antitumorais, independentemente da carga de neoantígenos e da apresentação convencional de peptídeos via MHC (19,21).

As células T $\gamma\delta$ correspondem a uma parcela importante de células imunes associadas a um prognóstico favorável em diferentes tipos de câncer (22–24). Há evidências, portanto, de que esses linfócitos exibem respostas antileucêmicas persistentes, mas pouco se sabe sobre os mecanismos adjacentes (16). Em teoria, a atividade efetora das células T $\gamma\delta$ pode influenciar criticamente na resposta à terapia, no desfecho clínico e sobrevida, visto que a compreensão da relevância funcional dessa população celular terá implicações importantes, uma vez que estamos próximos da ascensão sem precedentes de terapias baseadas em células T e de seu posicionamento como componentes-chave para melhorar a imunoterapia contra o câncer.

Além disso, a morbidade consequente do tratamento quimioterápico convencional encontra-se como um fator importante por deixar sequelas em crianças com alta expectativa de vida. Nesse sentido, abordagens que poderiam superar essas limitações do tratamento convencional por meio da imunoterapia estão sendo agora exploradas na maioria dos ambientes clínicos. Especificamente, devido as suas características inatas e adaptativas, há um interesse crescente nas células T $\gamma\delta$ e seus papéis na imunidade ao câncer e imunoterapia (16).

A pesquisa básica e clínica de células T $\gamma\delta$ na LLA-B está sendo discretamente realizada, em grande parte, devido ao conhecimento limitado sobre esse subconjunto de linfócitos T. Desta forma, investigar a diversidade fenotípica e funcional das células T $\gamma\delta$ apresenta-se como um objeto de grande importância para melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na resposta imune contra a doença, fornecendo assim subsídios para a projeção de novas estratégias que possam auxiliar no tratamento convencional e no futuro desenvolvimento de novas plataformas de imunoterapia baseada em células T.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B

2.1.1. Epidemiologia

A leucemia é um tipo de malignidade hematológica que surge em todas as idades, mas predominantemente ocorre na população mais jovem (~5–15 anos de idade) (25–28). Com as maiores taxas de ocorrência no grupo infantojuvenil (28,29), essa doença atualmente representa mais de um terço de todos os casos pediátricos de câncer (30,31), especialmente em sociedades desenvolvidas e industrializadas, seguidas daquelas em desenvolvimento (32–34). Nos últimos levantamentos epidemiológicos, a leucemia ocupou o 15º lugar no ranking de tumores mais comumente diagnosticados e o 11º lugar como a maior causa de mortalidade relacionada ao câncer em esfera global, respondendo por aproximadamente 475.000 novos casos e mais de 310.000 óbitos, os quais vêm aumentando expressivamente ao longo dos anos (25,26,33,35,36), chegando a ser considerada um problema de saúde pública, de acordo com alguns relatórios.

No Brasil, a incidência de leucemia cresceu significativamente nas últimas décadas, a ponto de ser atualmente considerada o 9º tipo de câncer mais diagnosticado (27). As tendências nacionais de casos e mortalidade por essa doença são monitoradas usando dados estaduais de câncer baseados na população, por meio do Instituto Nacional de Câncer (INCA). De acordo com o INCA, os números de incidência de leucemia estimados para cada ano do triênio 2023–2025 são de 4.43 novos casos por 100 mil habitantes, ajustados para 4.75 e 3.95 em homens e mulheres, respectivamente (37).

A distribuição geográfica da leucemia no Brasil é diversa entre as regiões e tem aumentado gradualmente, conforme os últimos relatórios anuais (27,38,39). A região norte do país foi apontada como tendo o segundo maior número de casos em 2010 (40), ocupando a primeira posição no ano seguinte (41,42). Com a maior carga dos casos da doença, o estado do Amazonas, especificamente a capital Manaus, exibiu a segunda maior taxa de incidência ajustada à idade (<14 anos) na população infantojuvenil em escala nacional, com cerca de 76.8 casos por 1 milhão de habitantes (40,43,44).

Estima-se que mais da metade dos casos de leucemia infantil sejam de leucemias agudas (27,36,45), que respondem por um terço de todos os casos, com números próximos a 50.000 crianças diagnosticadas por ano (30,36,46). O tipo de leucemia aguda mais comum, a leucemia linfoblástica aguda (LLA) (**Figura 1**), é intrinsecamente letal quando não tratada e abrange mais de 75% dos casos em crianças com idade <15 anos, embora também exiba um segundo

pico de ocorrência na idade adulta (>50 anos) (1,27,29,30,34). O restante dos casos, quando definidos, geralmente são de leucemia mieloide aguda (LMA), que é menos frequente e representa ~25% dos casos infantis abaixo dos 2 anos de idade (**Fig. 1a**) (34,36,47).

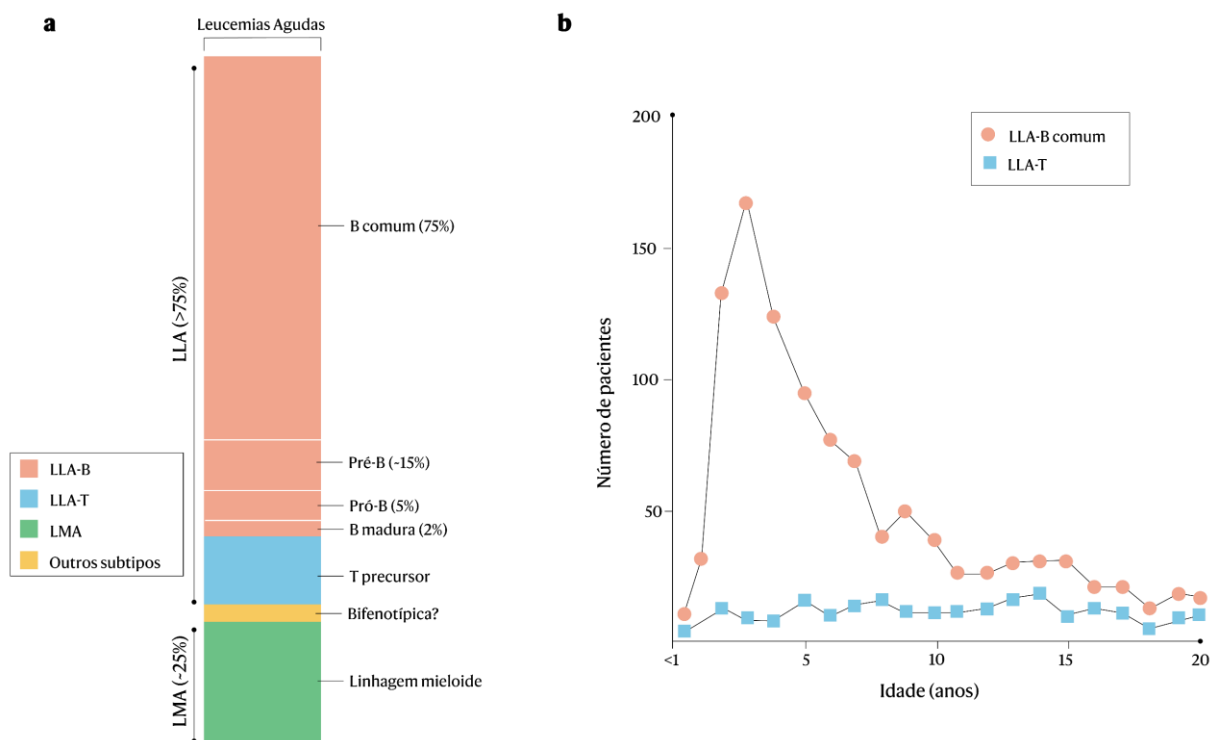


Figura 1: Principais subtipos de leucemia aguda na infância. a | Muitos anos de pesquisa permitiram estabelecer que as leucemias agudas podem ser divididas em subconjuntos que correspondem aos compartimentos de desenvolvimento inicial de células B, células T e células mieloides na medula óssea ou no timo. Conforme ilustrado, a LLA é fenotipicamente diversa, podendo ser derivada tanto de células B (em torno de 75% dos casos) quanto de células T precursoras. **b** | O tipo mais prevalente de leucemias agudas de linhagem B é a LLA-B comum, que exibe um imunofenótipo de células B imaturas com expressão de CD10, CD19, CD22 e/ou CD20, e responde por 75% dos casos de LLA, sendo bastante incidente na população pediátrica, que exibe uma distribuição etária com pico de incidência marcante entre 2 e 5 anos de idade. LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; LLA-T, leucemia linfoblástica aguda de células T precursoras; LMA, leucemia mieloide aguda. Fonte: adaptado de Greaves et al., 1985 (48); Farias et al., 2004 (49) e Greaves, 2018 (30).

A LLA é um dos principais subtipos de leucemia aguda na infância e a maioria deles, ~80% dos casos, são derivados de células B – a LLA-B (**Fig. 1a**), caracterizada pela alta proliferação de células blásticas que são fenotipicamente semelhantes a células B normais em estágio inicial de diferenciação (1,49,50). Apesar da heterogeneidade desses tumores, é importante notar que a LLA-B exibe características biológicas comuns. Primeiramente, possui

uma modesta predominância no sexo masculino e distribuição etária distinta, com idade mediana ao diagnóstico de 2–5 anos (**Fig. 1b**). Além disso, os pacientes com essa doença são, geralmente, bastante responsivos ao tratamento, o que levou a um aumento importante nas taxas de sobrevida global pediátrica (em torno de 90%), representando, de fato, um grande sucesso clínico para a oncologia (**Figura 2**).

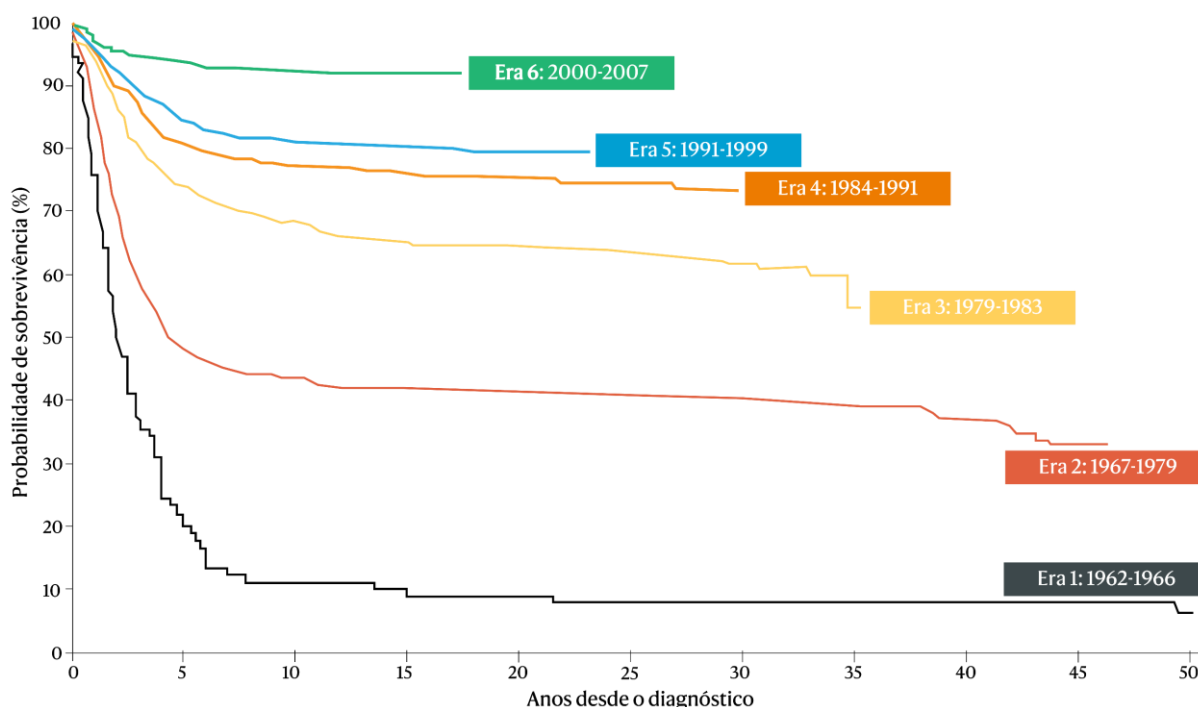


Figura 2: Avanços na sobrevida global da LLA pediátrica ao longo do tempo. Os últimos 50 anos foram marcados por uma intensa melhoria na sobrevida global de pacientes pediátricos com LLA ao longo do tempo. Isso ocorreu principalmente devido a evolução no tratamento, que passou por 6 eras de intensa reinvenção/inação, rumo à novas estratégias terapêuticas que hoje se baseiam nas características clínicas do paciente e nas características biológicas do tumor. O uso da quimioterapia combinada (Era 1), o tratamento adequado direcionado ao sistema nervoso central (SNC) (Era 2), a inclusão de parâmetros hematológicos na abordagem clínica (contagem de leucócitos, avaliação do líquido cefalorraquidiano e imunofenótipo) (Era 3), as características genéticas do tumor (Era 4), o exame morfológico do mielograma (Era 5) e os níveis de doença residual mínima (Era 6) contribuíram criticamente para a melhora do manejo clínico de pacientes com LLA, tornando essa doença mais curável. Fonte: adaptado de Pui et al., 2019 (51) e Omar et al., 2022 (52).

Uma investigação abrangente dos casos de leucemia aguda no estado do Amazonas, realizada por nosso grupo de pesquisa da Fundação HEMOAM, demonstrou que a incidência de LLA-B vem aumentando ao longo dos anos (**Figura 3**) (27). Quase 460 pacientes receberam o diagnóstico de LLA-B entre 2005 e 2015, correspondendo a um percentual de ~80% dos 577

casos de LLA registrados neste período. A principal faixa etária identificada era ≤ 10 anos, com crianças do sexo masculino compondo a maior parte desses casos (27). Isso revelou, portanto, que o comportamento biológico e epidemiológico dessa doença no maior estado da região amazônica é bastante corroborativo, à luz dos dados disponíveis em diferentes relatórios ao redor do mundo (34,36).



Figura 3: Incidência de LLA no estado do Amazonas. O gráfico ilustra o número de casos (linha azul) e óbitos (linha vermelha) anuais de pacientes diagnosticados com LLA entre os anos de 2005 e 2015, abrangidos no estudo realizado pela Fundação HEMOAM. Fonte: adaptado de Silva-Junior et al., 2019 (27).

2.1.2. Fatores de risco

Embora a paisagem biológica celular e molecular de pacientes com LLA-B tenha sido extensamente investigada (2,51,53), os fatores externos subjacentes ao desenvolvimento da doença, incluindo a fase de transformação oncogênica (isto é, quando uma célula saudável se torna um clone pré-leucêmico e assim evolui para uma leucemia), ainda permanecem pouco compreendidos. Diferentes determinantes ambientais e genéticos já foram propostos como prováveis causas da leucemia infantil (**Figura 4**) (54,55). No entanto, até agora, apenas uma

pequena parte desses diferentes fatores têm sido claramente relacionados com o surgimento da LLA-B na infância.

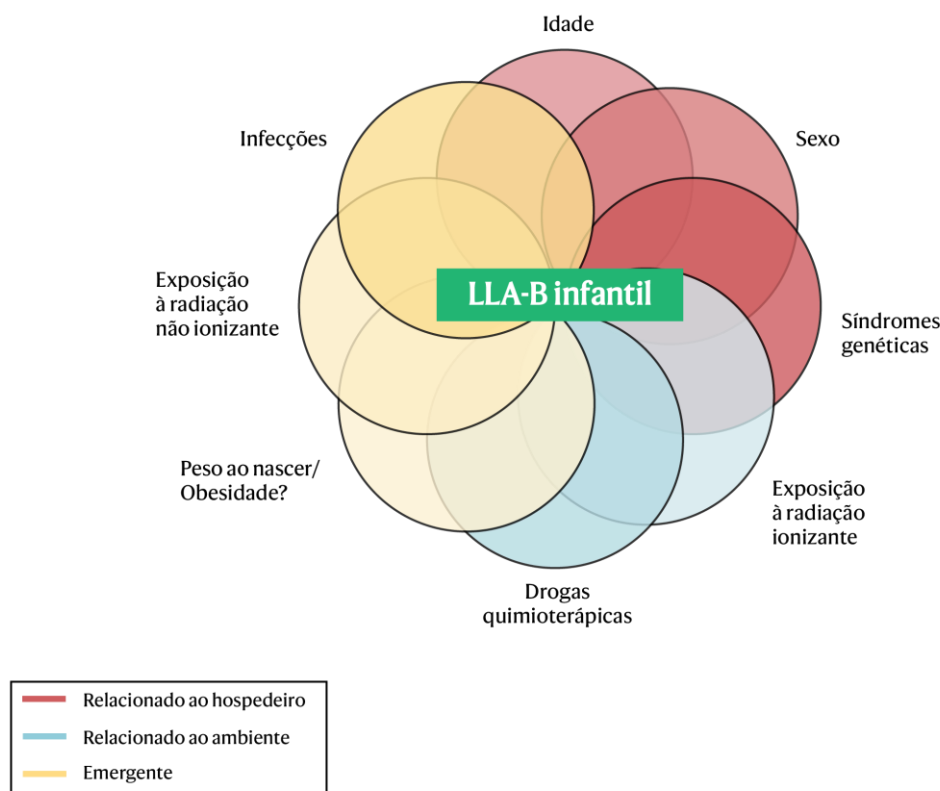


Figura 4: Fatores de risco potenciais e estabelecidos para a LLA-B na infância. Um corpo robusto de pesquisas trouxe uma ampla gama de possíveis fatores de risco para o desenvolvimento da LLA-B infantil, incluindo fatores relacionados ao hospedeiro (em **vermelho**), ao ambiente (em **azul**) e os fatores de risco emergentes (em **amarelo**). A interação desses determinantes pode ter impacto no desenvolvimento do tumor. Entre os fatores de risco reconhecidos estão a idade e o sexo, assim como a presença de síndromes genéticas e exposição à radiação ionizante ou drogas quimioterápicas que causam danos genéticos. A relevância das infecções como fator de risco aumentou consideravelmente nos últimos anos. Em contraste, evidências de uma associação entre um risco maior de LLA e exposição à radiação não ionizante, alto peso ao nascer, obesidade e outros fatores de risco estão sendo investigados. Fonte: adaptado de Schmidt et al., 2021 (56) e Bhatia & Sklar, 2002 (57).

Os únicos fatores de risco significativamente associados a LLA-B pediátrica são: sexo masculino (com meninos sendo 1,2 vezes mais afetados que meninas), síndrome de Down (com incidência 20 vezes maior que a esperada na população geral) (58), drogas quimioterápicas (59) e exposição grave à radiação ionizante, embora o risco aumentado também esteja associado a exposições mais leves de radiação (60,61). A radiação não ionizante também foi sugerida por investigações epidemiológicas como um fator de risco para leucemias na infância, mas até o

momento as evidências são insuficientes para apoiar tal ideia (56,62). Por fim, o sobrepeso ao nascer e a obesidade também foram consistentemente sugeridos como determinantes do risco de leucemia (63), no entanto, a potencial contribuição desses parâmetros no desenvolvimento da LLA-B infantil ainda permanece indefinida.

Um ponto muito importante que tem sido alvo de discussão há mais de um século é a ideia de que a exposição a agentes infecciosos também possa ser um gatilho para o desenvolvimento da LLA-B na infância, sugerindo um papel determinante do sistema imune na biologia desses tumores (30,64,65). Alguns estudos indicam que a estimulação imunológica precoce (exposição à infecção, por exemplo) pode exercer um papel protetivo contra o desenvolvimento da LLA-B e várias hipóteses formuladas ao longo dos anos articulam o impacto disso como um mecanismo etiológico da doença (30,66,67). O fato é que as evidências apontam um aumento na incidência de LLA-B infantil à medida em que os níveis cada vez maiores de limpeza associados ao estilo de vida contemporâneo também estejam mais presentes na sociedade (28,36,67,68).

2.1.3. Etiologia genética e patogênese

Os conhecimentos emergentes sobre a genética e a biologia da LLA-B indicam que essa malignidade hematológica não é homogênea (64,69,70). As células B leucêmicas, assim como outros tipos de células cancerosas, são caracterizadas por anormalidades em sua diferenciação, sobrevivência e proliferação (71,72). Essas mudanças, marcas importantes da leucemia, são coordenadas por um conjunto complexo de mutações genéticas, que, por sua vez, estão fortemente relacionadas com a sua patogênese (30,51,53,69).

Talvez, a marca mais intrigante da LLA-B infantil seja a existência de uma fase latente e clinicamente silenciosa na qual a tumorigênese inicial está presente, mas não é suficiente para que a leucemia se desenvolva (30,64). Aparentemente, o tumor evolui após o acúmulo progressivo de mutações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais que fornecem o gatilho ideal para o estabelecimento da doença (**Figura 5**) (64). Relatórios pioneiros mostraram que mais de uma mutação é necessária para o desenvolvimento da LLA-B e que essas condições pré-leucêmicas estão presentes em torno de 5% da população pediátrica saudável, que, na maioria dos casos, não evoluirá para a doença (73–75). Em outras palavras, os recém-nascidos carregam clones pré-leucêmicos originados ainda na fase fetal (primeiro *hit*), mas apenas 1% deles desenvolverá a LLA-B evidente (após um segundo *hit*) (30,64,74).

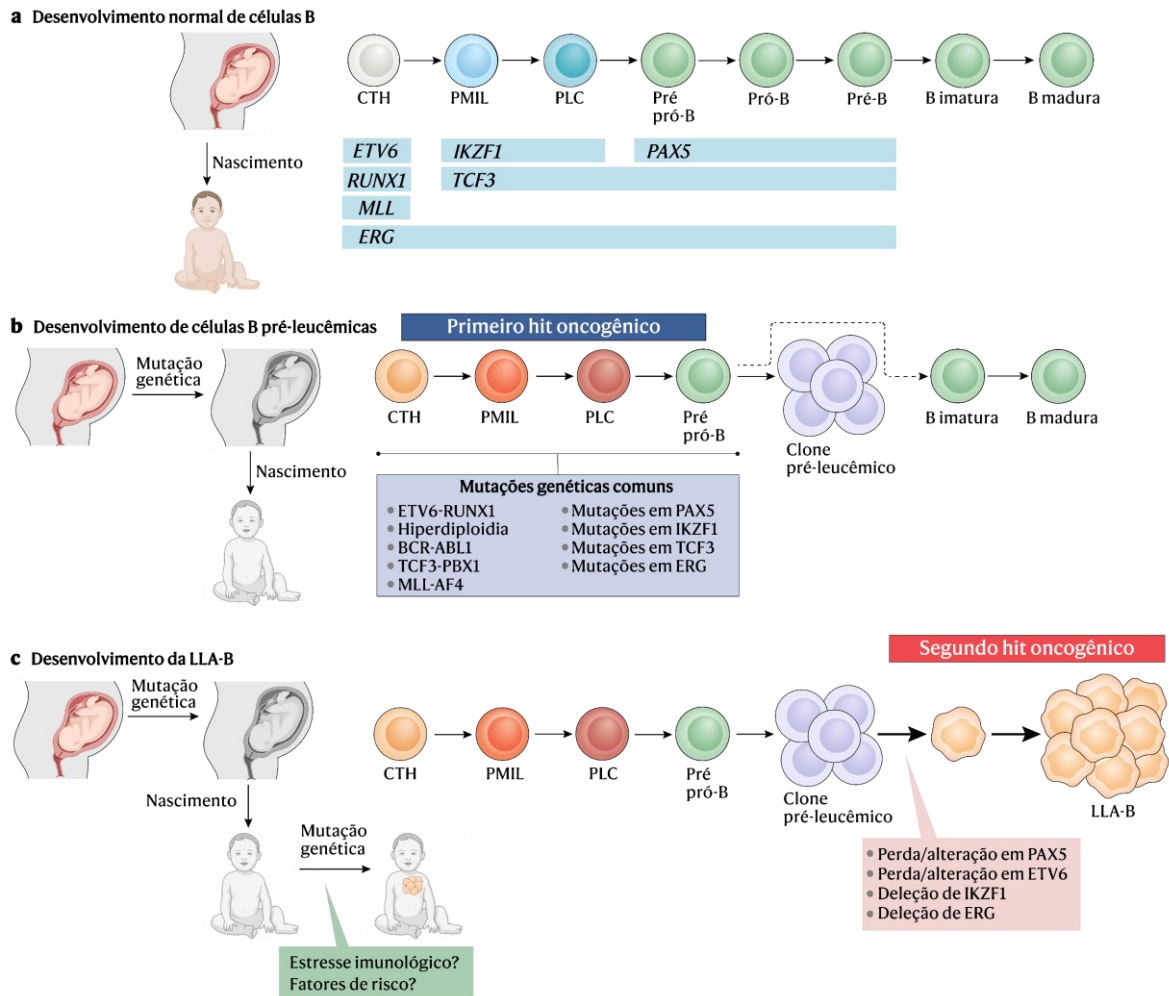


Figura 5: Um modelo para a tumorigênese e evolução da LLA-B na infância. **a** | A diferenciação normal das células B é um processo altamente regulado por circuitos transcricionais e epigenéticos que induzem o comprometimento das células-tronco hematopoiéticas (CTHs) para a linhagem linfóide B. **b** | No entanto, um primeiro hit oncogênico (por exemplo, uma translocação cromossômica *ETV6-RUNX1*), geralmente adquirido na fase fetal, surge no início do desenvolvimento hematopoiético ou ontogenia de células B. Isso, no geral, ocorre em ~5% dos recém-nascidos que, na maioria dos casos, introduzirá uma susceptibilidade à transformação oncogênica através da geração de clones pré-leucêmicos, mas que ainda assim permitem o desenvolvimento normal das células B; sendo, portanto, clinicamente silenciosos e não desenvolverão a leucemia evidente. **c** | Em cerca de 1% desses portadores, somente sob certas condições (exposições ambientais? fatores de risco?), o clone pré-leucêmico adquire um segundo hit oncogênico (por exemplo, mutações em genes-chave da diferenciação, como *PAX5*), evoluindo para o desenvolvimento total da LLA-B. PLC, progenitor linfóide comum; PMIL, progenitor multipotente com iniciação linfóide. Fonte: adaptado de Cobaleda et al., 2021 (64).

A paisagem genômica da leucemia inclui diferentes alterações genéticas estruturais (inserções, deleções, translocações e inversões) e no número de cópias de cromossomos (hiperdiploide, pseudodiploide e hipodiploide), características presentes na LLA (50,51,53,69). Não é surpreendente, portanto, que essas mutações envolvam genes que regulam o

desenvolvimento hematopoiético das células B (**Fig. 5a**), levando à diferenciação desregulada desses linfócitos (64,74,76–78). Isso, de certa forma, confere uma suscetibilidade à transformação oncogênica nas células B em desenvolvimento, ocasionada pela disfunção desses genes que, conseqüentemente, geram um bloqueio parcial nas etapas normais de diferenciação, caracterizando então o primeiro *hit* e o estágio pré-leucêmico (**Fig. 5b**) (30,64).

As mutações genéticas comuns na LLA-B ocorrem em diferentes *locus* e afetam genes como *PAX5* (78), *ERG* (79), *ARID5B* (80), *EBF1* (81), *IKZF1* (82), *SH2B3* (83) e o surgimento de fusões cromossômicas como *ETV6–RUNX1* (73,84), *TCF3–PBX1* (74), *BCR–ABL1* (85) e *MLL–AF4* (86). Todos fortemente envolvidos como reguladores importantes da ontogenia de células B, influenciando certamente a susceptibilidade genética da célula à tumorigênese, seja por meio da desregulação/bloqueio do seu desenvolvimento, dos mecanismos de apoptose, ou sinalização do ciclo celular.

Em geral, aceita-se que o primeiro *hit* oncogênico tenha um papel inicialmente instrutivo na tumorigênese, especificando a identidade da célula B pré-leucêmica. Em termos de exemplo, os genes fusionados (como *ETV6–RUNX1*) aparentemente tendem a regular os eventos precoces da transformação leucêmica das células B precursoras, interferindo no seu correto desenvolvimento e, portanto, bloqueando sua diferenciação (71,87). Por sua vez, o segundo *hit* oncogênico é mais permissivo e parece derivar de pequenas alterações genômicas (*PAX5*, por exemplo) que ocorrem mais frequentemente como eventos secundários tardios, promovendo efeitos oncogênicos que finalmente resultam na expansão proliferativa (**Fig. 5c**) (64,88).

Com base em intensas investigações epidemiológicas e biológicas da LLA-B, hoje há algumas conclusões relevantes sobre os mecanismos por trás do desenvolvimento e progressão tumoral dessa malignidade hematológica. Primeiro: um estresse imunológico parece ser crucial para a transição de uma fase pré-leucemia para a evolução completa do tumor (**Figura 5**). Segundo: os achados biológicos conciliam com a robusta carga de dados epidemiológicos obtidos ao longo dos anos, mostrando que a exposição de um sistema imune despreparado (como o das crianças) a um ambiente natural infeccioso pode levar ao surgimento da doença, eventos que ocorrem principalmente entre os 2 e 5 anos de idade, corroborando os dados epidemiológicos (**Fig. 1b**) (89,90). E, em terceiro lugar, a natureza do segundo *hit* oncogênico parece ser determinada pela soma das interações entre o primeiro *hit* oncogênico e o estressor imunológico, mas a base mecanicista para isso, no entanto, ainda permanece desconhecida (64).

2.1.4. Diagnóstico e classificação

O surgimento de células B leucêmicas que se acumulam na MO, SP e em diferentes tecidos extramedulares hematopoiéticos (linfonodos, baço, amígdalas e fígado) e não-hematopoiéticos (sistema nervoso e testículos) define a trajetória clínica da LLA-B. Os pacientes com essa doença geralmente apresentam sintomas inespecíficos, como a perda de peso sem motivo aparente, sudorese noturna e febre (conhecidos como ‘sintomas B’), assim como palidez, fadiga, dispneia, hemorragias ou hematomas, perda de apetite e uma susceptibilidade maior a infecções graves. Outras características comumente encontradas são linfadenopatia, esplenomegalia ou hepatomegalia, que ocorre em muitos pacientes (1,2,91).

Os achados de sangue total e MO incluem uma alteração quantitativa em todas as três linhagens celulares (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) e é o achado mais comum no SP. Um hemograma revela principalmente um quadro de pancitopenia, com anemia (normocítica e normocrômica), trombocitopenia (<100.000 plaquetas/mm³) e neutropenia, uma combinação de eventos conhecidos como tríade da leucemia, que reflete a insuficiência da MO. A contagem de leucócitos também pode encontrar-se frequentemente diminuída, no entanto, uma contagem global alta pode ser evidente em alguns casos, com a presença rara de blastos naqueles pacientes leucopênicos, mas uma presença numerosa naqueles com leucocitose (1,49,92).

A aspiração da MO é crucial, pois, além da morfologia e citoquímica, também facilita a realização de testes aprimorados de citogenética e biologia molecular, bem como a imunofenotipagem por citometria de fluxo. Atualmente, a suspeita inicial de leucemias agudas é principalmente determinada pela presença $\geq 20\%$ de blastos no compartimento medular, embora um percentual mais baixo não exclua o diagnóstico. Na avaliação morfológica, o acúmulo de blastos é muitas vezes reconhecível em baixa ampliação (10x ou 20x) por sua hipercelularidade e uniformidade, onde os pacientes exibem maior celularidade com substituição do tecido adiposo e elementos normais por clones leucêmicos, com alguns precursores de linhagem mieloide residuais de aspecto normal e megacariócitos diminuídos ou ausentes (49,91).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo emergiu como um pilar central na caracterização imunofenotípica do SP e do aspirado medular, sendo crucial para especificar a linhagem celular transformada e facilitar a subclassificação dos diferentes subtipos de LLA-B, isto é, o estágio maturativo da célula maligna (80). Isso geralmente é feito através da identificação de antígenos de membrana, citoplasmáticos ou nucleares, também conhecidos como clusters de diferenciação (CD), presentes na superfície das CLs ou em seu compartimento

intracelular. Portanto, a LLA-B pode ter sua subclassificação feita avaliando o fenótipo em: Pró-B, B comum, pré-B e B madura (**Quadro 1**) (49,93,94).

Quadro 1. Perfil imunofenotípico das leucemias de linhagem B e T.

Linhagem B	CD10	CD19	CD22	CD79a	Tdt	Ig
Pró-B	-	+	+	+	+	-
B Comum	+	+	+	+	+	-
Pré-B	±	+	+	+	+	C- μ
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; *não são duplo-positivos (CD4⁺CD8⁺). Fonte: adaptado de McGregor et al., 2012 (95).

Em uma análise de triagem de leucemia aguda, o primeiro momento inclui a identificação imunofenotípica da ampla linhagem linfóide seguida da identificação precisa do subtipo (**Quadro 1**). Na LLA-B, os marcadores mais importantes para a triagem e diagnóstico incluem CD10, CD19, CD22, CD79a e Tdt, por exemplo (96,97). O pool menos diferenciado da linhagem B expressa marcadores mais precoces, que são CD19, CD22 e CD79a, definindo, portanto, a LLA Pró-B. A positividade para CD10 (antígeno *Calla*) define o subtipo LLA-B comum e a expressão da cadeia μ pesada citoplasmática de imunoglobulina (Ig) define o subtipo Pré-B, enquanto a expressão adicional de Ig de superfície, com expressão fraca ou ausente de CD10, define a LLA-B madura (96,98,99).

A análise de anormalidades genéticas, realizada por meio dos testes de citogenética e biologia molecular, foi recém reconhecida como importante no diagnóstico, prognóstico e na seleção do tratamento mais adequado (49). Esses parâmetros foram incorporados pela primeira vez na classificação da LLA pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2008 (100). Desde então, a segunda categoria de LLA-B referida como '*Leucemia Linfoblástica de células B, com anormalidades genéticas recorrentes*' tem sido baseada em achados citogenéticos específicos, com uma gama mais ampla de anormalidades recorrentes adicionadas à classificação da OMS de 2016 e de 2022, que incluíram novos diferentes subtipos (**Quadro 2**).

Quadro 2. Classificação da LLA, conforme a OMS.

Leucemia aguda de células B
Leucemia Linfoblástica de células B, sem outra especificação <i>Leucemia Linfoblástica de células B, com anormalidades genéticas recorrentes</i> Leucemia Linfoblástica B com alta hiperdiploidia Leucemia Linfoblástica B com hipodiploidia Leucemia Linfoblástica B com <i>BCR::ABL1</i> fusionado Leucemia Linfoblástica B, <i>BCR::ABL1</i> -like Leucemia Linfoblástica B com rearranjo <i>KMT2A</i> Leucemia Linfoblástica B com <i>ETV6::RUNX1</i> fusionado Leucemia Linfoblástica B, <i>ETV6::RUNX1</i> -like Leucemia Linfoblástica B com <i>TCF3::PBX1</i> fusionado Leucemia Linfoblástica B com <i>IGH::IL3</i> fusionado Leucemia Linfoblástica B com <i>TCF3::HLF</i> fusionado
Leucemia aguda de células T
Leucemia Linfoblástica de células T, sem outra especificação Leucemia Linfoblástica precursora de células T precoce

Fonte: adaptado de Arber et al., 2016 (93), Terwilliger & Abdul-Hay, 2017 (1) e Alaggio et al., 2022 (101).

2.1.5. Manejo clínico e prognóstico

O tratamento da LLA-B ainda é, no geral, baseado no uso combinado de fármacos quimioterápicos. Normalmente, o amplo espectro de protocolos de quimioterapia existentes para essa doença adota uma estratégia de várias etapas no manejo do paciente, que inclui diferentes fases com objetivos específicos, como as terapias de Indução, Consolidação e Manutenção, contendo etapas de profilaxia do SNC em intervalos ao longo do tratamento do paciente (1,102).

A indução geralmente segue um curso de 3–4 semanas e refere-se a um primeiro momento em que o objetivo é induzir o controle total da carga leucêmica por meio do uso de quimioterapia citotóxica, de modo que o paciente atinja a remissão clínica completa sem que haja a positividade para a doença residual mensurável (DRM), ou seja, presença de células leucêmicas remanescentes. Nessa fase, o fármaco, dosagem e o momento da administração são baseados em vários critérios de estratificação de risco ao diagnóstico, como idade, contagem global de leucócitos, infiltração do SNC e presença de anormalidade cromossômica (103–105).

A fase de consolidação, por sua vez, é geralmente de intensidade semelhante ou ligeiramente menor que a terapia de indução e dura de 4–6 meses. Ela tem por objetivo eliminar possíveis cargas de tumor remanescentes que persistem após o início da fase de indução. Assim como na fase anterior, alguns critérios como idade, capacidade de tolerar o tratamento intensivo

e citogenética podem influenciar na estratégia terapêutica. A terapia de consolidação é aplicada somente quando a doença já está em remissão e os quimioterápicos administrados são combinados em doses mais altas que na terapia de indução, para evitar a quimiorresistência das CLs. Após essa fase, alguns protocolos realizam uma reindução, que consiste num tratamento intensificado, usando quimioterápicos semelhantes aos da fase de indução (105–108).

Por fim, na fase de manutenção, o objetivo consiste em prevenir a recaída da doença após as etapas anteriores. A intensidade da quimioterapia nessa fase é consideravelmente menor do que nas etapas anteriores, sendo, no geral, baseada em doses mais baixas de quimioterápicos, durando em torno de 1–2 anos. Em alguns casos, a quimioterapia de manutenção também pode incluir novos fármacos que não foram utilizados durante o tratamento de indução ou consolidação. A intensidade da dose de quimioterapia citotóxica que pode ser administrada também pode variar de acordo com o estado de desempenho e bem-estar geral do paciente, que estão ligados a idade e a outros parâmetros (105,109).

No Brasil, o tratamento baseado em quimioterapia para leucemias na infância avançou significativamente após mais de 40 anos de pesquisa clínica. Brandalise et al. (110) foram os pioneiros neste segmento, estabelecendo os primeiros protocolos nacionais direcionados ao manejo clínico da LLA. Em 1993, a equipe iniciou os primeiros protocolos multicêntricos de tratamento da LLA infantil, estabelecendo o Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemias na Infância (GBTLI), que realizaram diferentes investigações entre os anos de 1982, 1985, 1993 e 1999.

Uma década depois, em 2009, o GBTLI estabeleceu uma nova estratégia terapêutica que, em menos de 10 anos de seguimento, elevou significativamente as taxas de sobrevida livre em crianças tratadas com esse protocolo. Esta nova proposta de tratamento, chamada de GBTLI-2009, estratificava os grupos terapêuticos em baixo risco (BR) e alto risco (AR) com base em diferentes parâmetros clínicos e fatores de prognóstico (**Quadro 3**). Os pacientes tratados pelo GBTLI-2009 foram profundamente beneficiados com ~76,3% de aumento da taxa de sobrevida livre de eventos para o grupo BR e 59,8% para o grupo AR (111).

Quadro 3. Critérios para estratificação de grupos de risco ao diagnóstico (GBTLI-2009).

Parâmetros clínicos	Baixo Risco	Alto Risco
<i>Idade</i>	≥ 1 e < 9 anos	< 1 ou ≥ 9 anos
<i>Contagem global de leucócitos</i>	$< 50.000 / \text{mm}^3$	$\geq 50.000 / \text{mm}^3$
<i>Infiltração no SNC</i>	Ausente	Presente
<i>Anormalidades genéticas</i>	Ausência de achados citogenéticos de AR	Presença de anormalidades de AR: t(9;22) <i>BCR-ABL</i> ou t(4;11) <i>MLL-AF4</i>

Abreviações: AR, alto risco; BR, baixo risco; SNC, sistema nervoso central. Fonte: adaptado de Salina et al., 2016 (111).

Outro protocolo com grande reconhecimento internacional é o do grupo alemão Berlim-Frankfurt-Munich (BFM) chamado, em sua versão de 2009, de BFM-2009. Esse regime terapêutico utiliza uma abordagem de estratificação de pacientes em grupos de risco para recidiva (112). Através desse protocolo, foi introduzida uma nova combinação de fármacos distribuídos em dois blocos distintos de quimioterapia, com um foco principal no uso do metotrexato (MTX), criando-se então o protocolo BFM. Devido à notável eficácia, redução do tempo de tratamento e aumento de sobrevida, esse regime de tratamento foi amplamente adotado, especialmente para aqueles pacientes com leucemias de alto risco (113).

No protocolo BFM-2009, os critérios de estratificação de risco (**Quadro 4**) incluem a avaliação do envolvimento do SNC, a imunofenotipagem das CLs, a presença de translocações como a t(9;22), o quantitativo de blastos na circulação periférica ao D8 e o alcance da remissão no D33. O tratamento baseado no protocolo BFM-2009 é dividido em quatro fases principais: Indução, Consolidação, Reindução e Consolidação Intensiva, além das fases de Manutenção e Profilaxia do SNC (112–114).

Quadro 4. Critérios para estratificação de grupos de risco (BFM-2009).

Baixo Risco*	Risco Intermediário	Alto Risco [#]
- Idade: ≥ 1 a < 6 anos - SP no D8: < 1.000 blastos/μL - Contagem de leucócitos: $< 20.000/\mu$L - DRM $< 0.1\%$ ou MO M1/M2 no D15 - MO M1 no D33 da quimioterapia	- Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR.	- RI: DRM $> 10\%$ ou MO M3 no D15 - BR: DRM $> 10\%$ - SP no D8: > 1.000 blastos/μL - MO M2/M3 no D33 da quimioterapia - Translocações: t(9;22) ou t(4;11) - Hipodiploidia: ≤ 44

Abreviações: AR, alto risco, BR, baixo risco; DRM, doença residual mensurável; MO, medula óssea; RI, risco intermediário; SP, sangue periférico. Notas: Medula M1, $< 5\%$ blastos; Medula M2, 5% a $< 25\%$ de blastos; Medula M3, $\geq 25\%$ de blastos. *Todos os critérios devem ser preenchidos. [#]Somente um destes critérios já classifica como alto risco. Fonte: Adaptado de Laks et al., 2003 (114) e Gonçalves et al., 2024 (113).

Representando a principal instituição de diagnóstico e tratamento de leucemias infantis da região norte do Brasil, a Fundação HEMOAM atualmente adota os critérios estabelecidos pelo GBTLI e BFM na rotina clínica para o tratamento da LLA-B. Este protocolo é organizado em 6 fases, sendo elas as terapias de Pré-fase, Indução da Remissão, Consolidação da Remissão, Intensificação, Consolidação Tardia, e, por último, Manutenção. Neste protocolo, a estratificação de grupos de risco baseia-se na resposta à terapia, avaliada no 8º dia da fase de indução (D8) pela contagem de blastos no SP, no 15º dia da fase de indução (D15) pela avaliação morfológica da MO e DRM por citometria de fluxo, e no 35º dia da terapia de indução (D35) através da análise morfológica da MO, DRM por citometria de fluxo e biologia molecular. A análise desses parâmetros pode indicar a necessidade de mudanças na abordagem terapêutica e no grupo de risco, de modo a melhorar o suporte clínico e aumentar a sobrevida dos pacientes (97,110,115).

A análise de DRM é um importante indicador clínico de resposta à terapia, pois consiste na avaliação de CLs residuais sobreviventes à quimioterapia e que são capazes de repovoar a MO, resultando em episódios de recidiva da doença, caso não tratada. Dessa forma, quando um paciente exibe níveis tecnicamente “positivos” de DRM, isto é, valor $\geq 0.01\%$ (10^{-4}) de CLs na MO, o risco de recidiva é significativamente maior do que aqueles pacientes que exibem níveis “negativos” ou inferiores a 0.01% . Portanto, quanto maior o valor de DRM ao final da fase de indução, maior é o risco de recaída e menor é a taxa de sobrevida, de acordo com diferentes relatórios (97,116).

A adoção de todos esses critérios nos regimes terapêuticos contemporâneos tornou as taxas de sobrevivência de crianças com LLA-B bem maiores, conforme já mencionado. Embora isso seja clinicamente encorajador, em torno de 20% dos pacientes ainda assim não conseguem responder à quimioterapia padrão, permanecendo refratários à terapia primária ou entrando em recaída após a remissão completa inicial, sendo, portanto, indivíduos com pior prognóstico (117,118). Dessa forma, a exploração de novas abordagens terapêuticas para LLA-B pediátrica é urgentemente necessária e no futuro poderá beneficiar todos os grupos terapêuticos.

2.2. NICHOS E MICROAMBIENTES DA MEDULA ÓSSEA

As CLs dependem de diferentes interações dentro de microambientes constituídos de células estromais, hematopoiéticas e/ou imunológicas que regulam a sua sobrevivência, expansão proliferativa e disseminação metastática. Esses microambientes especializados são amplamente referidos como ‘nicho’, um conceito inicialmente proposto por Schofield há mais de 50 anos (119). Um representante importante desses nichos é a MO, compartimento que basicamente suporta muitas funções das células-tronco na hematopoiese e no reparo tecidual. Durante a progressão do tumor, as CLs sequestram muitas funções homeostáticas para promover o crescimento tumoral. Neste sentido, o microambiente da MO está posicionado no centro dos mecanismos de patogênese, progressão e quimiorresistência dessas malignidades hematológicas (4,120,121). Compreender como as CLs e os diferentes reguladores celulares e moleculares derivados do nicho interagem requer um conhecimento amplo da organização microanatômica e propriedades funcionais da MO.

2.2.1. Arquitetura anatômica e funcional

A MO é um tecido notavelmente multifuncional que engloba muitos tipos de células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, interligadas por uma rede vascular e innervada dentro de cavidades nos ossos longos e axiais em humanos e camundongos (**Figura 6**) (122). O esqueleto axial, composto pelo crânio, osso esterno, costelas, vértebras e ílio, é o principal sítio hematopoiético em humanos e a porção funcional desse compartimento é conhecida como ‘medula vermelha’ que, ao longo da vida, é progressivamente substituída por tecido adiposo (‘medula amarela’) com pouca ou nenhuma atividade hematopoiética (122–124).

Os conhecimentos atuais sobre a MO são principalmente baseados em estudos de ossos longos, como o fêmur. Esse compartimento é composto por uma camada periosteal altamente

vascularizada e innervada que recobre a superfície externa do osso, permitindo a entrada e saída de vasos sanguíneos e fibras nervosas para a cavidade óssea e medular (**Fig. 6a**) (125–127). Além disso, essa camada, chamada de periosteio, está localizada juntamente com uma camada endosteal, o endosteio, que, por sua vez, encontra-se na interface entre o osso e a própria medula (122,128,129). No compartimento central, artérias e veias ramificadas (arteríolas e sinusóides) correm em paralelo com o eixo medular, geralmente mais próximas da parede do endosteio (122,128). Essa rede de vascularização permite a remoção eficiente de produtos residuais da MO, assim como a entrega ideal de nutrientes, oxigênio, hormônios, neurotransmissores e fatores de crescimento (130,131).

Existem dois nichos medulares anatomicamente distintos que geralmente estão situados na diáfise (parte central) e epífise (extremidades) de ossos longos (126,132) (**Fig. 6a**). O nicho central, localizado no centro da cavidade medular, recebe a maior parte da rede de vasos sanguíneos e compõe >90% do volume medular (**Fig. 6c**). Cerca de 85% das células-tronco hematopoiéticas (CTHs) estão abrigadas nesse nicho, responsável pela produção diária de células sanguíneas, especialmente de linhagem mieloide (132–134). Por outro lado, o nicho endosteal, localizado próximo ao endosteio, ocupa <10% do volume medular e é enriquecido com ~15% de CTHs (132,135). Curiosamente, estudos destacam o papel desse nicho como compartimento reserva, já que ele regula a autorrenovação, diferenciação e quiescência de células-tronco, e mostrou ser importante na regeneração hematopoiética após dano tecidual, em particular para a linhagem linfóide (127,136).

2.1.1. Na hematopoiese normal

O estroma da MO contém uma diversidade de células que suportam as propriedades funcionais das células-tronco ao longo da vida, como a autorrenovação, maturação, apoptose, repouso e tráfego, conhecidas em conjunto como os papéis clássicos do microambiente medular (**Fig. 6b**). Em homeostase, esses componentes formam uma unidade anatômica e funcional que integra diferentes sinalizações de origem endócrina, autócrina e parácrina para atender às necessidades do organismo como um todo, seja sustentando o pool local de CTHs ou induzindo a diferenciação desses progenitores em células sanguíneas maduras e funcionais para abastecer os diversos tecidos da periferia (132,135).

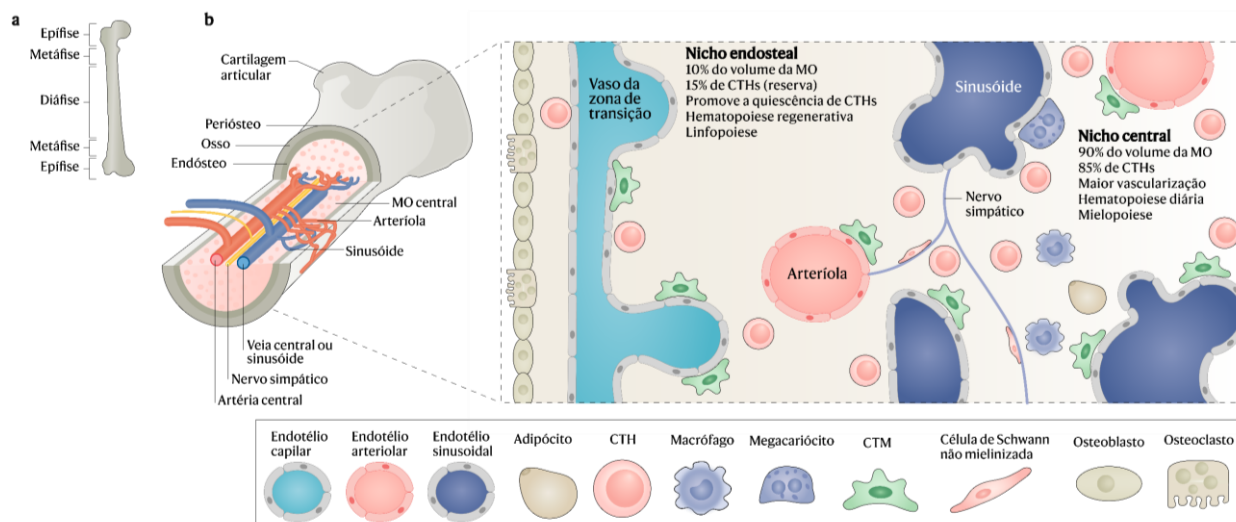


Figura 6: Microarquitetura da medula óssea. **a** | O principal sítio de hematopoiese após o nascimento é a medula óssea, presente no interior de vários ossos, como o fêmur. Na epífise e diáfise desses ossos longos, geralmente estão localizados os nichos hematopoiéticos do compartimento medular. **b** | Próximo ao endóstio, o nicho endosteal ocupa o menor espaço da medula (<10%) e abriga um pequeno pool reserva (~15%) de células-tronco hematopoiéticas (CTHs). Este compartimento recebe menos vascularização e parece regular a quiescência de CTHs e atuar na regeneração hematopoiética, especialmente da linhagem mieloide. Já o nicho central, que possui a maior rede de vascularização e ocupa 90% do volume da medula óssea, abriga mais de 85% das CTHs e atua na produção diária de células sanguíneas, principalmente de linhagem mieloide. Fonte: adaptado de Pinho et al., 2019 (122) e Méndez-Ferrer et al., 2020 (132).

Os principais componentes do nicho tecidual hematopoiético incluem as próprias CTHs, células-tronco mesenquimais (CTMs), células de revestimento ósseo, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, pericitos, células de Schwann não mielinizantes, adipócitos, megacariócitos e macrófagos residentes de tecido, assim como diferentes tipos de células imunes (121,137). Todas foram reconhecidas como críticas na manutenção do nicho hematopoiético saudável, sendo simultaneamente dependentes desse microambiente para regulação de suas funções.

As CTHs são precursores multipotentes que se diferenciam em células de linhagem mieloide ou linfóide (**Figura 7**) e possuem capacidades regenerativas de curto e longo prazo. Essas células, portanto, podem exibir um estado proliferativo ou quiescente, definindo pequenos pools de CTHs ‘autorrenováveis transitórias’ ou ‘quiescentes’ (138,139). O atributo único das CTHs de dar origem a todos os subtipos de células sanguíneas maduras as colocam no topo da hierarquia hematopoiética (**Fig. 7a**). Além disso, o fato de serem autorrenováveis permite que, durante sua divisão assimétrica, uma fração das células-filhas geradas retenham

suas propriedades de origem, para que assim o compartimento de CTHs não seja esgotado (140).

As CTMs, de forma semelhante às CTHs, também são multipotentes e autorrenováveis, mas dão origem a outros tipos de células que atuam, por exemplo, na remodelação óssea ou na formação de tecido adiposo, como os osteoblastos e os adipócitos, respectivamente (141). Essas células-tronco também exibem capacidade de diferenciar-se em pericitos, fibroblastos e células endoteliais; portanto, representam um componente essencial para a formação do nicho medular que suporta a hematopoiese (142). Alguns relatórios mostraram que as CTMs preservam o pool de CTHs, regulando sua quiescência, proliferação, diferenciação e mobilização dentro do nicho medular, seja no contexto da produção diária de células sanguíneas ou na hematopoiese regenerativa após dano tecidual (143). Especificamente, um subconjunto de CTMs, conhecido como células reticulares abundantes em CXCL12 tem se mostrado essencial para manter a sobrevivências de CTHs *in vivo*, em parte devido à alta produção dessa quimiocina e de outras moléculas solúveis no microambiente medular, como o fator de células-tronco (SCF) (144).

As células de revestimento ósseo (*Bone-lining cells*) são precursoras de osteoblastos e osteócitos, e estão localizadas na superfície endosteal juntamente com os osteoclastos (145). Todas essas células atuam na remodelação óssea e são parte integrante do estroma medular, já que eles possuem funções importantes na hematopoiese; talvez por regular um microambiente indutor de sobrevivência, expansão e mobilização de CTHs para preservar a homeostase local (146).

Os adipócitos derivados da MO que ao longo do tempo povoam esse compartimento já foram simplesmente considerados como um “preenchimento”, sem relevância funcional no nicho medular. Essa visão mudou nos últimos anos e um papel muito mais complexo foi proposto. Alguns relatórios mostraram que eles regulam negativamente a hematopoiese, possivelmente por manter as CTHs em um estado quiescente (147). Isso coincide, portanto, com o fato de que a substituição da medula vermelha por tecido adiposo causa um impacto funcional relevante no tecido hematopoiético ao longo da vida, sugerindo, assim, uma atuação crucial dos adipócitos nesse processo.

As células endoteliais e os pericitos, que formam os capilares especializados da MO, isto é, os sinusóides e as arteríolas, são componentes importantes do nicho para controlar o *homing* das CTHs e de outras células derivadas. Além da função clássica de fornecer suprimentos para a MO, as células endoteliais também suportam a proliferação de progenitores hematopoiéticos. Sabe-se hoje que em torno de 60% das CTHs estão aderidas ao endotélio sinusoidal medular, que também exibe uma alta produção de CXCL12 e SCF (148).

Outros tipos de componentes-chave que contribuem na regulação do nicho são os megacariócitos e os macrófagos residentes do tecido. Os megacariócitos contribuem regulando a quiescência homeostática das CTHs por meio da produção de CXCL4 e fator transformador de crescimento (TGF) β (149). Já os macrófagos locais mostraram ser críticos na manutenção do nicho endosteal, já que a ausência dessas células na MO leva à mobilização de CTHs para a circulação sanguínea periférica (150). De fato, essas células inatas facilitam o *homing*, a expansão e a quiescência das CTHs, e são essenciais para a diferenciação de CTMs em células osteogênicas, apoiando, portanto, a remodelação óssea (151).

2.1.2. No nicho transformado

Diferentes descobertas sugerem que malignidades hematológicas podem se originar dos nichos hematopoiéticos ou que certas alterações genéticas e funcionais nesses nichos influenciam no surgimento desses tumores. Até o momento, o potencial do nicho estromal como um condutor etiológico e/ou facilitador da progressão leucêmica ainda não foi totalmente esclarecido, mas representa uma questão paralela ao antigo enigma do “ovo ou a galinha” (132,152–154).

Em linha com essas ideias iniciais, agora se sabe que os nichos hematopoiéticos exercem contribuições críticas no contexto da tumorigênese na LLA-B: a aquisição de mutações genéticas ou disfunções em componentes do nicho, que predispõem ao desenvolvimento do tumor, e a conversão do microambiente normal em compartimentos “leucêmicos” pelas células B malignas, que sequestram suas funções homeostáticas por meio da remodelação do nicho para se expandir e sobreviver (154). Nesse sentido, a LLA-B é agora considerada uma doença sistêmica que induz muitas alterações funcionais e de composição não somente do nicho hematopoiético, mas do sistema imunológico como um todo.

As propriedades únicas do compartimento medular, em especial, o conferem excepcionalmente um potencial de ser um “solo fértil” para o desenvolvimento e progressão tumoral. Isso vem sendo apoiado por diferentes investigações que indicam claramente o impacto profundo desse compartimento na proliferação, sobrevivência, quimiorresistência e disseminação metastática de CLs, independentemente da paisagem genética da doença (154). Além disso, estudos posteriores mostram claramente que as populações celulares do microambiente participam e suportam esses mecanismos, como uma consequência do nicho transformado (132).

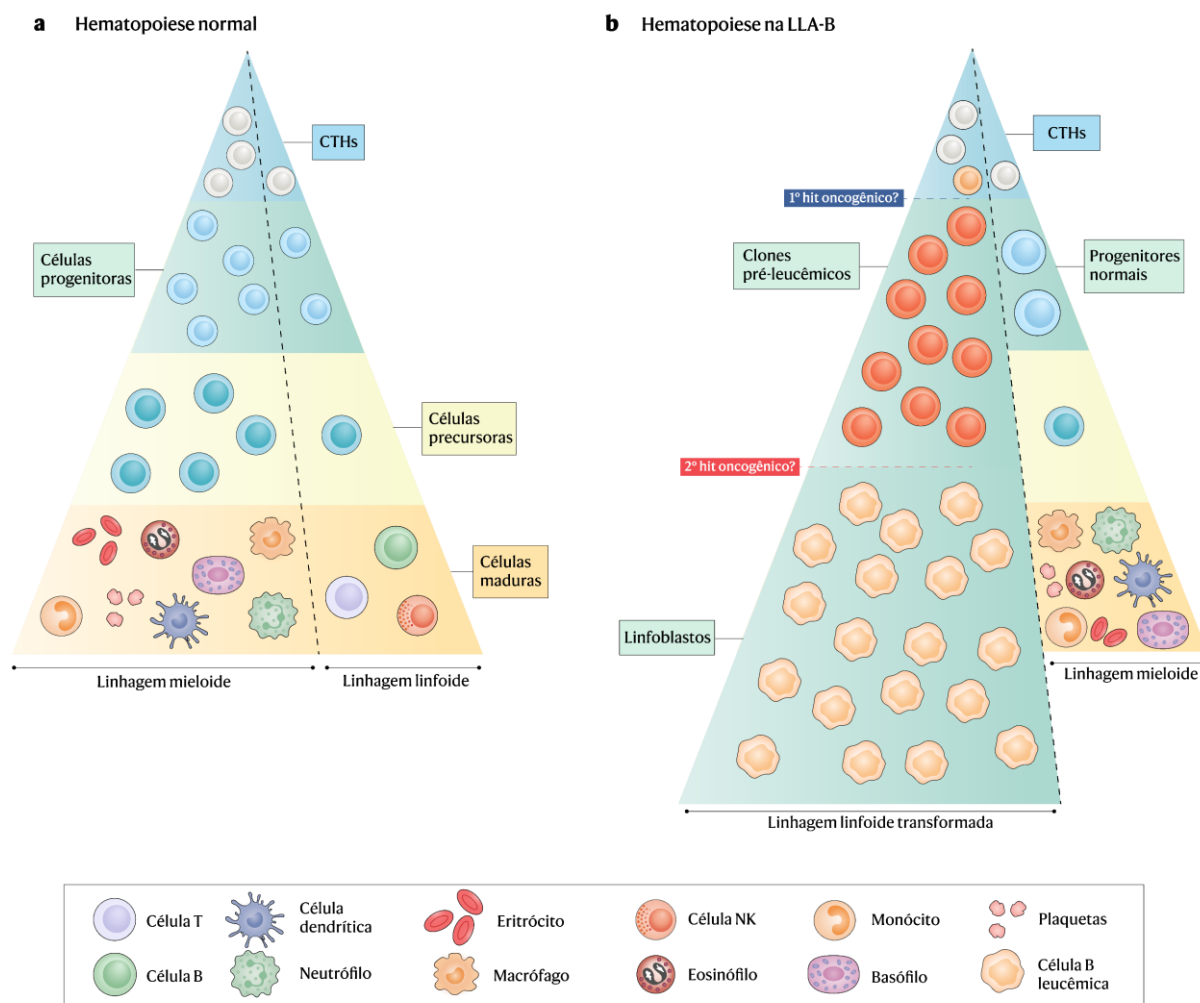


Figura 7: Hematopoiese normal e leucêmica. a | A estrutura hierárquica da hematopoiese normal é mantida pelas células-tronco hematopoiéticas (CTHs), que possuem capacidades únicas de autorrenovação e de originar várias células progenitoras multipotentes. Essas células progenitoras, por sua vez, exibem potencial proliferativo, mas estão agora comprometidas com uma ou mais linhagens celulares. Os progenitores então produzem diferentes células precursoras que, em seguida, originam vários tipos de células hematopoiéticas terminalmente diferenciadas, que são a base da pirâmide hematopoiética. **b** | A hematopoiese desordenada característica da leucemia é mostrada no contexto da LLA-B. As CTHs residem no topo dessa pirâmide de desenvolvimento, mas apenas algumas delas podem ser levadas à transformação maligna após um primeiro hit oncogênico e dar origem a clones pré-leucêmicos. Estes, sob certas condições (após um segundo hit oncogênico), originam as células B leucêmicas de fenótipo e morfologia primitiva, que caracterizam esse tipo de malignidade hematológica. Portanto, o acúmulo dessas células leucêmicas suprime o desenvolvimento de outras células sanguíneas, embora uma parte seja relativamente preservada. LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; NK, natural killer. Fonte: adaptado de Khwaja et al., 2016 (47) e Cobaleda et al., 2021 (64).

As CTMs, conforme já discutido, representam componentes-chave na regulação da hematopoiese normal. Não é surpreendente, portanto, que exista uma comunicação intrínseca

entre essas células multipotentes e CLs que leva à geração de um microambiente de suporte à leucemia. Embora algumas análises citogenéticas tenham descartado a presença de alterações cromossômicas em CTMs na maioria dos casos de LLA-B (155), exceto a translocação $t(4;11)$ *MLL-AF4* (155), uma maior atividade regulatória e capacidade proliferativa reduzida foi observada em CTMs da MO em pacientes com LLA-B ao diagnóstico (156). Isso foi apoiado por relatórios subsequentes que indicaram menor capacidade de produção de CXCL12 em comparação a CTMs de MO saudável (157), mas uma produção robusta de mediadores solúveis como CCL2, CXCL9, CXCL10, interleucina (IL)-6 e IL-8 (CXCL8) (158).

As células osteogênicas são potencialmente alteradas durante a progressão da LLA-B, sendo descrito estudos que indicam a influência direta das CLs na formação e manutenção da matriz óssea, resultando em perda óssea grave (159). Esses eventos relacionados a tumorigênese foram documentados em modelo murino de LLA-B/BCR-ABL⁺, como resultado da ativação intensa de osteoclastos que induzem a reabsorção óssea (160). Em parte, isso pode ser explicado pela capacidade das CLs em inibir a diferenciação das CTMs em osteoblastos (161).

A angiogênese é uma característica comum em muitas malignidades hematológicas. Na leucemia, as CLs consomem muito oxigênio, secretam moléculas pró-angiogênicas, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), e mostraram moldar a vascularização do compartimento medular (162). Um aumento na fração de células endoteliais foi observado na MO de camundongos enxertados com CLs derivadas de LLA-B (163). Alinhado a isso, uma angiogênese aumentada na MO de crianças com LLA é claramente comparável com um grupo saudável de mesma idade e com pacientes em fase de remissão da doença, embora o seu valor prognóstico não tenha sido determinado (164). Outro papel emergente das células endoteliais é na disseminação metastática de CLs, já que elas impulsionam a transmigração endotelial por meio da secreção de diferentes quimiocinas, como CXCL12 (165).

Um sistema imune alterado também é, de longe, uma característica marcante para o desenvolvimento e progressão de tumores. No contexto da LLA-B, a contribuição das células imunes inatas, adaptativas e de seus produtos (citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento) para a conversão do microambiente normal em nichos leucêmicos é um tópico ainda distante de ser totalmente elucidado, mas tornou-se nos últimos anos um alvo atraente em termos de pesquisa básica e clínica para melhorar o manejo clínico da doença (166).

As células mieloides são componentes-chave nesse contexto, já que elas são quase sempre recrutadas em larga escala para o TME em diferentes tipos de câncer. O papel dessas células inatas na leucemia é agora um ponto de extrema relevância. Macrófagos e monócitos, por exemplo, mostraram proteger CLs em diferentes sítios extramedulares, além do

compartimento central da MO, e esses mecanismos ocorrem tanto pela produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios como pelo contato célula-célula (167,168). Curiosamente, a monocitose em pacientes com LLA-B mostrou ser um fator preditivo de sobrevida global significativamente reduzida e maior risco de recaída, enquanto a eliminação de monócitos em modelos murinos de leucemia resultaram em sobrevida global aumentada (169).

Alguns relatórios adicionais também mostraram concordantemente que células supressoras de origem mieloide (MDSC), neutrófilos e células dendríticas também atuam na proliferação de CLs e utilizam diferentes mecanismos inibitórios para interromper a ativação de células T, dificultando a iniciação de respostas antileucêmicas (166). Um aumento na frequência de MDSCs na MO e SP é comum em pacientes com LLA-B e foi fortemente relacionado com a quimiorresistência, presença de DRM e carga tumoral elevada. Em contraste, uma baixa frequência dessas células foi relacionada a um melhor prognóstico (170).

Os neutrófilos, embora tenham sido pouco estudados até o momento, exibem alterações funcionais importantes na leucemia e mostraram reduzir a capacidade proliferativa das células T e sua produção de interferon ($IFN\gamma$). Da mesma forma, as células dendríticas são funcionalmente comprometidas e essas mudanças parecem ser específicas da LLA-B, já que pacientes com LLA-T, no geral, exibem números comparáveis ou até aumentados dessas células apresentadoras de antígeno (APCs) (171). Neste contexto, é concebível propor que um comprometimento geral da função dessas células imunes inatas possa ser relevante na inibição de novas respostas antileucêmicas (ou pré-existentes) no curso da doença.

De fato, o crescimento progressivo das CLs leva à expansão de células T regulatórias (Treg) que tornam o microambiente mais tolerogênico, evitando assim o ataque mediado por células imunes antitumorais. Uma proporção maior de células T (mas não de células Treg) no compartimento da MO, ao diagnóstico, foi capaz de prever uma resposta medular favorável à quimioterapia (6). Embora isso seja atraente, a maioria dos relatórios disponíveis apontam que as células Treg estão frequentemente elevadas na LLA-B e que esse aumento impacta negativamente na resposta terapêutica. Isso é explicado, em parte, pela alta concentração de IL-10 e $TGF-\beta$ na MO desses pacientes, produzida em larga escala por células Treg no microambiente transformado (5).

Em resumo, por meio de intensas investigações, o conhecimento sobre o nicho medular progrediu muito nos últimos anos, revelando uma rede complexa de constituintes que interagem de forma dinâmica e específica com células hematopoiéticas normais enquanto preparam um microambiente permissivo para suas contrapartes malignas na LLA-B. Portanto, o conceito de que a sobrevivência/evolução de células B malignas (isto é, em fase pré-leucêmica para a

leucemia desenvolvida) seja estritamente dependente da soma entre alterações genéticas e fatores externos ambientais, sugere novas ideias de terapias direcionadas e terá implicações clínicas muito importantes neste campo de pesquisa.

2.2. VIGILÂNCIA IMUNOLÓGICA NA LEUCEMIA

As 'marcas do câncer' foram propostas pela primeira vez há mais de duas décadas como uma ampla gama de alterações funcionais adquiridas pelas células saudáveis à medida que elas progridem de um estado de normalidade rumo a um estado de transformação maligna: a tumorigênese (172). Na revisão mais recente deste conceito, após mais de uma década de intensas investigações biológicas, a importância do microambiente no desenvolvimento e progressão de tumores hoje é finalmente reconhecida (173). Considerando seu impacto sistêmico, é importante notar que o câncer induz mudanças funcionais no sistema imunológico como um todo; portanto, a imunidade é regulada por interações entre células de diferentes tecidos periféricos, além do microambiente tumoral (174).

Já se passaram mais de um século desde que Paul Ehrlich [1909] propôs as primeiras ideias acerca desses eventos, embora tenham ficado bastante tempo inertes devido à ausência de ferramentas adequadas para investigação científica (175). Mais tarde, Lewis Thomas [1959] reforçou essas hipóteses apontando para um potencial mecanismo imunológico direcionado especificamente pelo antígeno (175,176); mas é a partir das investigações de Burnet [1970] mostrando que essas moléculas (referidas como 'neoantígenos') induzem uma reação imune contra o câncer é que foi formulada a teoria da vigilância imunológica (177).

A ideia de um sistema de vigilância se tornou então a base da imunologia do câncer, com evidências indicando concordantemente que a inflamação prolongada e o escape do tumor são característicos de sua evolução (173). Assim, há agora um envolvimento direto de células imunes, incluindo subconjuntos especializados em vigiar a transformação celular oncogênica, restringir o crescimento da célula transformada e erradicar carga de tumor subsequente (**Figura 8**) (174,178). Resultados de experimentos em camundongos imunocomprometidos ajudaram, portanto, a desvendar a complexidade desses fenômenos e forneceram explicações mecanicistas para observações semelhantes encontradas em humanos (22,175).

Vários tipos de células imunes foram implicados no controle da progressão tumoral, sendo apoiado por diferentes estudos que incluíram camundongos deficientes de células T e B; camundongos sem IFN γ , IL-12 ou seus receptores; camundongos ausentes de perforinas e granzimas que não tinham função citotóxica de células T e NK, assim como camundongos

depletados especificamente para células T ou seus subconjuntos (179–182). Cada um desses experimentos relatou maior suscetibilidade ao surgimento e/ou evolução de tumores espontâneos ou quimicamente induzidos e, portanto, mostraram o impacto de uma imunovigilância considerada deficiente.

Após a introdução formalizada desse conceito, muito se especulou sobre o motivo de indivíduos imunocompetentes ainda desenvolverem tumores, já que teoricamente eles exibem um sistema imune íntegro e funcional (175). A partir de então, iniciou-se um novo renascimento da ideia de que a imunidade controla o desenvolvimento de tumores (**Fig. 8a**), mas que, durante a pressão evolutiva desse embate (**Fig. 8b**), a imunovigilância é suprimida, resultando na fuga das células tumorais que transformam o microambiente (**Fig. 8c**). Surge, a partir de então, uma teoria nova e complementada da vigilância imunológica – a ‘**imunoedição do câncer**’ – proposta há duas décadas por Dunn & Schreiber (176,183).

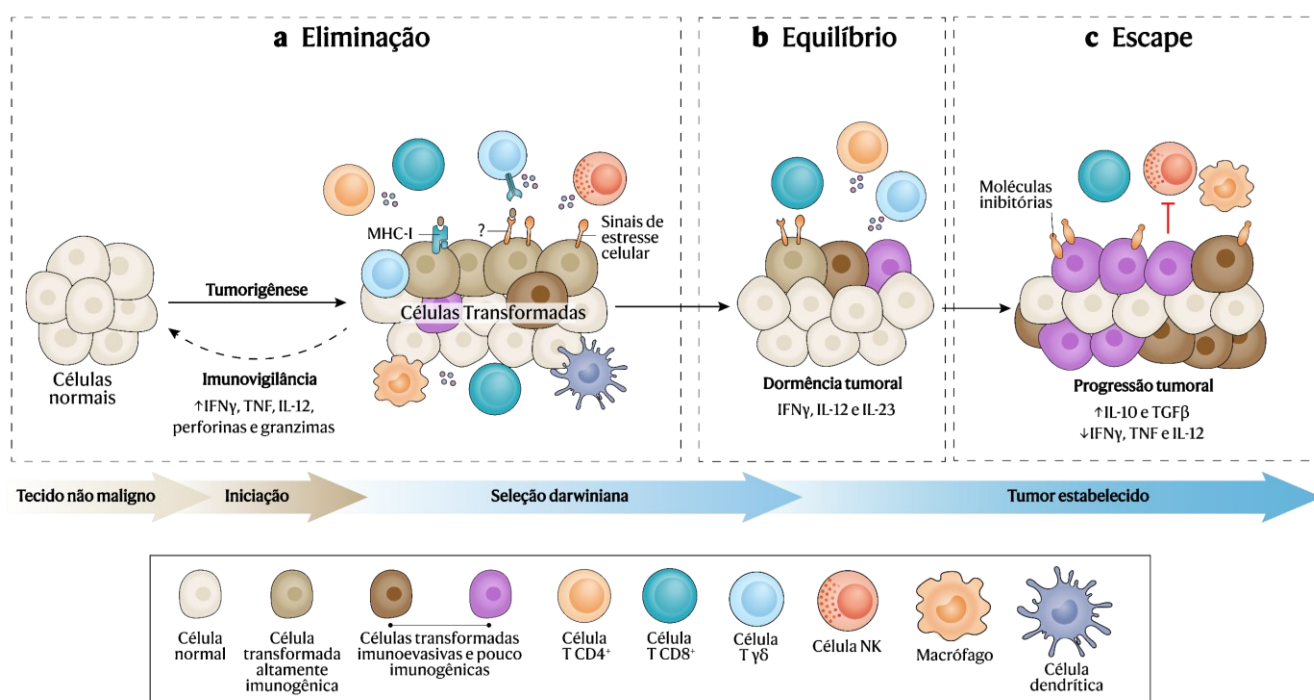


Figura 8: Imunoedição do câncer. **a** | A fim de garantir a homeostase de um tecido recém-transformado pelo processo de tumorigênese, o sistema imune é alertado sobre a presença de células malignas que expressam sinais de perigo característicos que são reconhecidos por células imunes, resultando na fase de eliminação (ou imunovigilância, propriamente dita). **b** | Ao longo do tempo, a pressão exercida pelo sistema imune (seleção darwiniana) leva à edição da imunogenicidade do tumor, o que torna as células tumorais menos detectáveis pelas células imunes e mais evasivas, resultando em um processo de equilíbrio entre as duas partes. **c** | Após a etapa de equilíbrio, os tumores editados, ou seja, aqueles com maiores capacidades imunoevasivas, entram em um ciclo de crescimento desenfreado, levando a mudanças importantes no microambiente que favorecem seu escape, proliferação e disseminação metastática. Fonte: adaptado de Dunn et al., 2002 (183) e O'Donnell et al., 2019 (184).

A interação entre a imunidade e o câncer é hoje paradoxalmente incorporada ao longo de três fases distintas, onde a imunogenicidade do tumor é editada e diferentes mecanismos de imunossupressão são adquiridos, permitindo a progressão da doença. Esses três processos, abreviados como os “três Es do câncer” são denominados: Eliminação, Equilíbrio e Escape (183). A fase de eliminação do tumor tem como base o “modelo do perigo”, ideal estabelecido e defendido inicialmente por Polly Matzinger [1994], onde, para o sistema imune, aquilo que é “estranho” se torna muito mais importante quando causa danos ao tecido normal (185). Isso ajudou a resgatar o conceito claro de que tumores podem prejudicar muitos tecidos e que isso seria importante para a imunidade.

À luz dessas discussões, é evidente que as células imunes são alertadas sobre a presença do tumor quando este começa a exercer pressão fisiológica anormal sob os tecidos saudáveis adjacentes, isto é, à medida em que se torna “perigoso”. Muitos sinais governam o desencadeamento da resposta antitumoral e é agora conhecido, portanto, que os braços inatos e adaptativos do sistema imune cooperam entre si para reconhecer as células transformadas que escaparam dos mecanismos intrínsecos de apoptose e eliminá-las antes que se tornem clinicamente detectáveis (183).

A segunda fase é marcada pelo equilíbrio dinâmico entre o sistema imune e o tumor. Neste processo, as células tumorais com maior capacidade de sobrevivência à pressão imunológica (resposta imune antitumoral) são selecionadas para reconstituir uma carga neoplásica menos imunogênica e com capacidades invasivas aprimoradas (176,183). Essas conclusões foram baseadas em estudos seminais que mostraram que a imunidade pode conter o crescimento do tumor e mantê-lo oculto em um estado de equilíbrio, de forma dependente de células T, IFN γ , IL-12 e IL-23, por exemplo (186–188).

Consequentemente, esses eventos levam à terceira fase, que é a fuga do controle imunológico. Neste processo de escape, as células tumorais sobreviventes que adquiriram resistência à imunidade se proliferam de maneira descontrolada e transformam o microambiente para sustentar sua expansão e disseminação metastática, resultando na doença clinicamente observável (183). Ao longo dos últimos anos, essas características foram finalmente reconhecidas como as principais marcas do câncer.

Em malignidades hematológicas, essas características ainda não foram exploradas ou debatidas com clareza, mas é importante notar que esses diferentes processos de imunoedição são preservados não somente em tumores sólidos, mas também em malignidades hematológicas como a leucemia (4). Diferentes investigações mostram que as CLs podem ser eliminadas por células imunes citotóxicas (14,189) e que, com o passar do tempo, essas células tumorais

adquirem capacidades de escape através do aumento da expressão de receptores e mediadores solúveis inibitórios, que atenuam a imunovigilância e promovem a evolução da doença em diferentes compartimentos extramedulares (3,5).

2.2.1. Interação células imunes–células leucêmicas

Ao longo do processo de imunoedição, as células imunes, em particular as células T citotóxicas e células NK, são importantes para restringir o crescimento tumoral, especialmente na primeira fase (**Fig. 8a**). Enquanto a ideia inicial de vigilância imunológica estava sendo intensamente debatida, os achados de Stutman et al. (190) e Barnd et al. (191) impulsionaram o corpo crescente de evidências que apoiam este conceito, demonstrando que essas duas populações celulares são indispensáveis para evitar o surgimento e a evolução de tumores.

As células NK foram descobertas como braços especializados da imunidade inata, devido aos seus mecanismos únicos de detectar e eliminar células-alvo. Atualmente, a frequência, infiltração e diferentes características dessas células citotóxicas em muitos tipos de câncer são reconhecidas como protetivas no contexto do desfecho clínico. Isso inclui um sistema de reconhecimento regulado por receptores/correceptores de ativação e inibição que juntos determinam a morte ou a sobrevivência do alvo, destinos garantidos principalmente pela expressão ou ausência de MHC de classe I (MHC-I) (192).

Alguns estudos importantes demonstraram que, na LLA-B, as CLs expressam diferentes moléculas relacionadas ao estresse celular que são ligantes para receptores de células NK (NKR) (193,194). No entanto, a expressão desses NKRs pode ser moldada de modo a evitar seu reconhecimento e eliminação (195). As CLs não só escapam da imunovigilância pela diminuição desses sinais característicos, mas também pela indução da expressão alterada de receptores de ativação em células NK, evidenciada pela redução de NKRs, como o *natural killer group 2 member D* (NKG2D), *DNAX accessory molecule 1* (DNAM-1) e os receptores naturais de citotoxicidade (NCR): NKp30, NKp44 e NKp46. Isso é principalmente mediado pela ação de TGF β , produzido pelas CLs no microambiente (196).

Os ligantes para grande parte desses receptores de ativação não estão bem definidos. No entanto, sabe-se que o receptor NKG2D reconhece MIC-A/B (*MHC class I polypeptide-related sequence A/B*) e ULBP (*UL16 binding proteins*), enquanto DNAM-1 reconhece o receptor poliovírus (PVR) e nectina-2 (197). A expressão aumentada desses ligantes foi observada em pacientes pediátricos com LLA-B e foi relacionada à uma maior susceptibilidade tumoral à resposta imunológica (193). Por outro lado, células NK exibindo expressão desregulada de

receptores de ativação foram relacionadas com uma maior resistência tumoral e DRM persistente após a terapia de indução da remissão (198).

As células T também são fundamentais para reconhecer e erradicar células transformadas ao longo de todas as fases da imunoeedição (**Figura 8**). Moléculas de MHC-I portando antígenos peptídicos podem ser detectadas por células T CD8⁺ e estão presentes em células tumorais de vários tipos de câncer (199). No entanto, o potencial característico dos tumores de modular a expressão de MHC-I frequentemente leva à uma regulação negativa dessas moléculas e, como consequência, leva ao escape da imunovigilância adaptativa (200).

A ideia de que essas células T exibem reatividade contra CLs foi delineada ao longo dos anos após muitos achados importantes. Em 1957, Edward Thomas (201) realizou o primeiro transplante de medula óssea (TMO) registrado e os mecanismos adjacentes ao seu sucesso clínico foram associados a uma reação anti-infecciosa e antileucêmica das células imunes derivadas do doador no recipiente, ligada, mais tarde, à presença enriquecida de células T no enxerto (202). Estudos posteriores identificaram que essas células T citotóxicas tinham capacidade de reconhecer antígenos específicos do tumor (os neoantígenos), proteínas aberrantes resultadas da tradução de genes mutados durante a tumorigênese (203,204). Isso forneceu evidências inequívocas de que as células T são capazes de travar uma guerra contra as células tumorais, inclusive na leucemia.

Uma visão mais profunda sobre a ocorrência desses fenômenos foi fornecida em um estudo recente de Zamora et al. (17). Os autores identificaram neoantígenos imunogênicos na MO de pacientes pediátricos com LLA capazes de induzir uma expansão robusta de TILs (em particular, células T CD8⁺ citotóxicas) e gerar respostas antitumorais específicas do tumor, direcionadas a uma proteína aberrante derivada da fusão *ETV6-RUNX1*. Embora isso seja muito atraente, a simples geração e apresentação desses neoantígenos não garante a ativação persistente das células T e nem a erradicação total da carga neoplásica (205).

Investigações aprofundadas usando modelos murinos de LLA-B revelaram que as CLs que não são eliminadas pela vigilância imunológica exibem um estado de dormência e capacidades evasivas aumentadas, devido à baixa produção ou perda de neoantígenos imunogênicos e ausência de moléculas coestimulatórias como CD80, que consequentemente levam à uma deficiência de sinais de ativação para células T (206,207). Uma forte evidência disso é que na LLA-B as células T citotóxicas específicas do tumor nunca são adequadamente ativadas, já que sofrem apoptose ou entram em anergia durante a apresentação inicial de antígenos via MHC, eventos que foram intimamente relacionados a uma alta presença da citocina IL-10 (208).

Em parte, esses fenômenos explicam o porquê que os pacientes com essa doença exibem alta tolerância imunológica e como isso impacta na resposta antitumoral, já que é resultado de uma baixa carga mutagênica do tumor e de um estado de ativação deficiente das células T CD8⁺ citotóxicas. Um mecanismo emergente nesses processos é a expressão dos ‘*checkpoints* imunológicos’, reconhecidos hoje como reguladores críticos da imunidade mediada por células T (200).

2.2.2. *Checkpoints* da imunovigilância

Os *checkpoints* imunológicos são moléculas de superfície expressas por células imunes que permitem o ajuste da resposta celular e o controle da hiperativação (200). De modo particular, esses reguladores evolutivamente conservados são críticos para o estado fenotípico e funcional das células T, exercendo seus efeitos biológicos em diferentes configurações espaço-temporais da sua vida útil (209). Apesar da presença das células T citotóxicas, os tumores ainda assim progridem e essa coexistência de crescimento tumoral e células T é uma evidência forte de que, conforme inicialmente proposto no ‘paradoxo de Hellström’ [1968], os linfócitos T se tornam disfuncionais ao longo da imunoedição (210). Neste sentido, os *checkpoints* imunológicos têm um papel central nesse processo ao modular a amplitude das respostas das células T e colocar “freios” na imunidade celular contra o câncer (200).

Os receptores CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) e PD1 (*programmed cell death 1*) são os principais e mais potentes *checkpoints* imunológicos das células T. Eles se complementam entre si para garantir que suas respostas funcionais preservem a autotolerância enquanto eliminam patógenos e tumores (211). Nas últimas duas décadas, PD1 (CD279) e CTLA4 (CD152) foram visados com sucesso por muitos grupos de pesquisa, os quais cabem destacar os pioneiros James P. Allison (CTLA4) e Tasuku Honjo (PD1), reconhecidos com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2018 pela descoberta da imunoterapia baseada no bloqueio de *checkpoints* imunológicos, mostrando que a inibição dessas moléculas permite a erradicação durável do tumor e melhora drasticamente o desfecho clínico de pacientes com câncer (212).

Os mecanismos e diferenças de efeito biológico entre essas duas moléculas são baseados no tempo e no espaço (**Figura 9**). Primeiro, o compartimento de células T *naive*, durante sua iniciação, requer sinais distintos derivados de células apresentadoras de antígeno (APCs) dentro de órgãos linfoides secundários. Após reconhecer o complexo peptídeo-MHC (sinal 1), as células T *naive* recebem um sinal coestimulatório quando CD80 ou CD86 na membrana da

APC se liga ao CD28 expresso na superfície desses linfócitos (sinal 2). Níveis adequados dessas sinalizações resultam na expansão clonal, aumento de sobrevivência e diferenciação das células T por meio da produção de citocinas instrutivas (sinal 3) pelas APCs e/ou produção de IL-2 pela própria célula T recém-ativada (213).

Durante os estágios iniciais dessa ativação, o CTLA4 está contido dentro de vesículas intracelulares e é fortemente induzido na superfície de membrana das células T após iniciação com o antígeno cognato (214). Esse *checkpoint* imunológico é estruturalmente semelhante ao CD28 e compete, com maior afinidade, pela ligação com CD80 e CD86 (215). Essa competitividade pode impedir o sinal coestimulatório normalmente fornecido pela ligação CD28:CD80/CD86, inibindo assim a ativação sustentada das células T, secreção de IL-2 e expansão proliferativa (216). Por outro lado, PD1 é expresso durante os estágios tardios da resposta imune das células T previamente ativadas, principalmente nos tecidos periféricos, facilitando a tolerância imunológica (214). Semelhante à via de sinalização de CTLA4, o engajamento de PD1 com seus ligantes PDL1 e PDL2, constitutivamente presentes nas APCs, inibe a proliferação e sobrevivência das células T e reduz a produção de citocinas como IFN γ , IL-2 e fator de necrose tumoral (TNF) (214).

A alta expressão desses *checkpoints* imunológicos é uma marca registrada de um fenômeno conhecido como “exaustão de células T” (209). Esse estado fenotípico-funcional é caracterizado pela disfunção progressiva desses linfócitos T que exibem funções efetoras prejudicadas, seja na expansão proliferativa, autorrenovação, citotoxicidade ou produção de moléculas imunológicas (200). A presença dessas células T “exaustas” implica no controle ineficiente de infecções e na persistência de tumores. Seu revigoramento, portanto, pode restabelecer a imunidade e permitir que as células T citotóxicas continuem suas respostas efetoras contra o tumor (209).

Conforme descrito para outros tipos de câncer, as células T na leucemia expressam esses receptores inibitórios e perdem sua capacidade funcional, resultando na aquisição de um fenótipo de exaustão celular que se mostrou mais grave em células T derivadas da MO do que de tecidos periféricos (217). Essas alterações fenotípico-funcionais mostraram ter um impacto clínico significativo na LLA-B, já que a exaustão de TILs foi fortemente relacionada ao risco aumentado de recidiva e DRM persistente (218). Além disso, a expressão robusta de PD1 e CTLA4 em células T foi relatada em pacientes de alto risco, e, junto com a presença elevada de PDL1 e CD86 em CLs, foi significativamente ligada à recidiva da doença e diminuição da sobrevida geral (219).

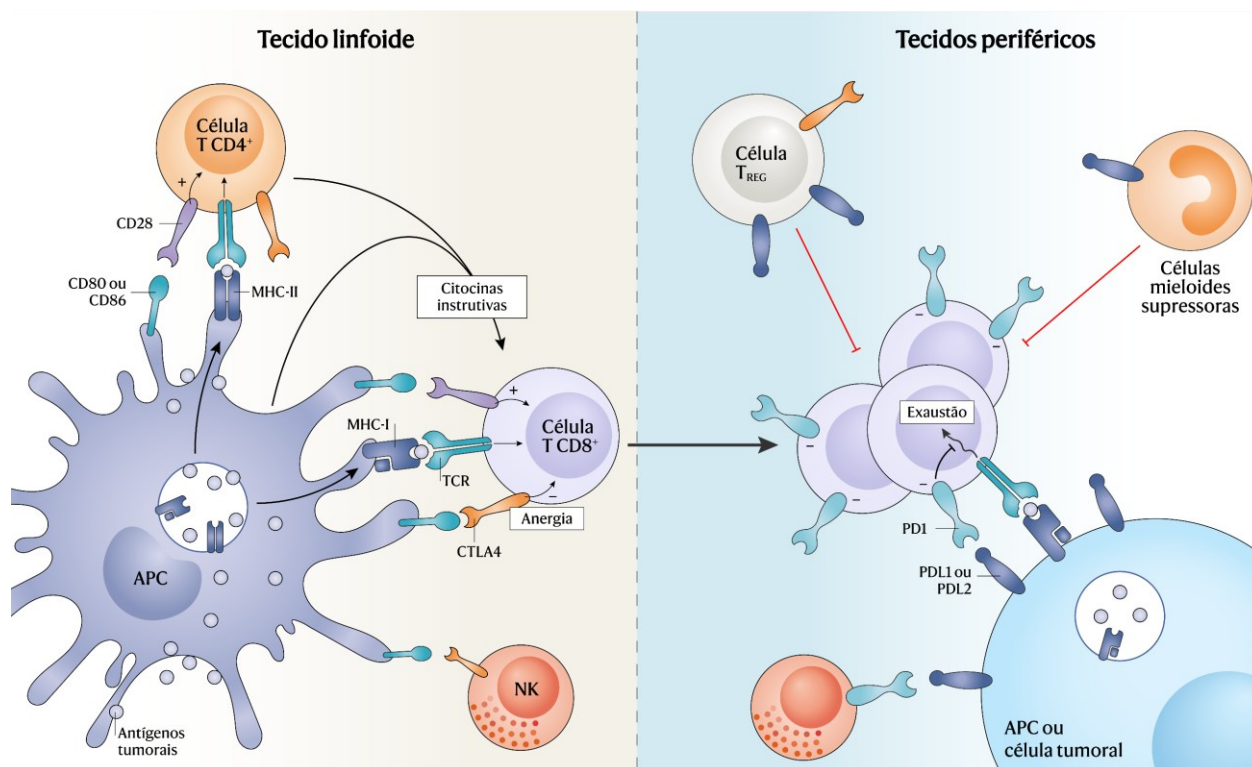


Figura 9: Inibição da imunovigilância por *checkpoints* imunológicos. A iniciação das células T requer o reconhecimento de antígenos tumorais processados e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). A iniciação dessas células T geralmente ocorre nos tecidos linfoides e as células T CD4⁺ junto com as APCs fornecem ajuda para a iniciação das células T CD8⁺ na forma de citocinas instrutivas. Esses linfócitos são então ativados por meio de vias coestimulatórias, como CD28–CD80/CD86, fazendo com que proliferem, secretem citocinas inflamatórias, adquiram propriedades citotóxicas e migrem para os tecidos periféricos onde há a exibição de antígenos. O CTLA4 tem um papel importante em regular a amplitude de iniciação das células T no tecido linfoide, competindo pela ligação com CD80 ou CD86. Dentro de horas a dias, as células T ativadas também começam a expressar o receptor inibitório PD1, que encontra seus ligantes PDL1 ou PDL2 em diferentes células imunológicas e células tumorais, resultando na atenuação de suas funções efetoras. Fonte: adaptado de Topalian et al., 2016 (220).

Além dos eixos PD1–PDL1/PDL2 e CTLA4–CD80/CD86, outros receptores inibitórios como LAG3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*), TIM3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain 3*) e BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) são altamente regulados durante a exaustão das células T (221). Seus impactos funcionais no contexto de tumores sólidos ou hematológicos estão sendo intensamente explorados. Essas descobertas reforçam a importância da expressão dos *checkpoints* imunológicos na imunidade antitumoral e de investigar suas bases mecanicistas, uma vez que essas moléculas provavelmente impedem a resposta antileucêmica mediada por células T. Este é um dos vários mecanismos de escape tumoral que são comumente observados em recentes e

inovadoras modalidades de tratamento, que incluem a plataforma de imunoterapia baseada em células T expressando receptores quiméricos de antígeno (CAR-T) (222).

2.2.3. Resposta imune mediada por células T não convencionais

As células T se adaptaram para antecipar o fato de que cada patógeno pode possuir uma assinatura antigênica distinta, e, portanto, surgem na escala de bilhões de clones, singularmente projetados com uma especificidade única (223). Os primeiros estudos focaram em subconjuntos que reconhecem antígenos peptídicos processados e apresentados através das moléculas polimórficas do MHC, ou antígeno leucocitário humano (HLA), e que expressam um receptor de células T (TCR) $\alpha\beta$ de alta diversidade (224,225).

Fenotipicamente e funcionalmente, essas células T clássicas são definidas através da expressão canônica dos correceptores CD4 e CD8 (226). As células T CD4⁺ são ativadas após reconhecimento de peptídeos antigênicos exógenos apresentados por moléculas de MHC-II e exibem funcionalidade plástica que envolve a diferenciação em vários subconjuntos efetores de células T auxiliares que produzem citocinas do tipo Th1, Th2 e Th17 para coordenar a resposta imune (227–229). As células T CD8⁺, por sua vez, reconhecem peptídeos antigênicos degradados pelo complexo proteassoma e apresentados por moléculas de MHC-I, dão origem às células T citotóxicas e eliminam o alvo por citotoxicidade direta (230).

Muitos subconjuntos de células T não se encaixam nesse paradigma. Desde a descoberta inicial de novos padrões evolutivamente conservados de TCRs invariantes ou semi-invariantes em algumas células T com atributos mais “inatos” até a caracterização dos eventos regulatórios que controlam seu desenvolvimento e funções, nossa compreensão da imunobiologia desses linfócitos melhorou drasticamente nos últimos anos (231). Ao contrário das células T $\alpha\beta$ clássicas, esses subconjuntos de células T considerados “não convencionais” têm padrões de TCR mais simplificados e reconhecem coletivamente uma ampla gama de antígenos não peptídicos apresentados por moléculas monomórficas semelhantes ao MHC/HLA que são mais onipresentes e exibem um alto nível de conservação entre as espécies, destacando, portanto, a relevância funcional dessas populações únicas de células T ao longo da evolução (232).

Apesar dos avanços recentes, a identidade das estruturas antigênicas reconhecidas pelo TCR permanece desconhecida para a maioria das células T não convencionais e nossa compreensão do que essas células fazem, e quando, é limitada. Essa lacuna de conhecimento é expandida pelo fato de que muitos subconjuntos de células T não convencionais são exclusivos dos seres humanos e, portanto, são notoriamente difíceis de estudar.

Nos últimos anos, uma série de novas descobertas chamou a atenção para esse grupo até então subestimado de linfócitos T relativamente raros, que não podem ser simplesmente classificados como “auxiliares”, “citotóxicos” ou “regulatórios” e geralmente não são restritos a antígenos peptídicos, respondendo de forma rápida e potente. Essas populações incluem as células T natural killer (NKT) e células T invariantes associadas à mucosa (MAIT), que são semelhantes às células T clássicas na medida em que expressam um TCR $\alpha\beta$, embora seja de cadeias invariantes ou semi-invariantes (232). Além disso, há também um tipo único de células T não convencionais que expressa um TCR $\gamma\delta$ totalmente distinto, denominadas ‘células T $\gamma\delta$ ’, que representam agora um braço importante da resposta imune (19).

2.3. CÉLULAS T $\gamma\delta$

A imunidade adaptativa, baseada na recombinação somática de segmentos gênicos de receptores de antígeno, manteve conservada durante sua evolução uma linhagem menor de células T expressando o TCR $\gamma\delta$. Essa população de células T com atributos mais “ínatos” é um dos três tipos de células imunes que realizam rearranjos gênicos para expressar receptores relativamente diversos, juntamente com células B e células T $\alpha\beta$ (233). Os papéis únicos dessas células permanecem uma questão aberta para pesquisa e especulação. No entanto, sua migração preferencial para diferentes tecidos da periferia ao invés de órgãos linfoides, pode nos fornecer pistas importantes. Sua relevância funcional é fortemente baseada na sua capacidade de expandir a resposta imune para diferentes locais de baixa disponibilidade de células T $\alpha\beta$, células NK e células B, de forma que o alcance da resposta imune seja maior, mesmo em diferentes compartimentos do organismo (234). Este plano anatômico peculiar para células T $\gamma\delta$ é, curiosamente, orquestrado ainda no timo (235).

2.3.1. Desenvolvimento e diferenciação

Uma das principais questões na biologia dos linfócitos T tem sido desvendar os determinantes moleculares que governam o comprometimento de timócitos rumo ao desenvolvimento e diferenciação de células T $\gamma\delta$. Muitos mecanismos foram propostos para explicar como essas células T surgem, mas a programação tímica adjacente, incluindo as sinalizações dependentes ou independentes do TCR, ainda permanecem um tópico quente para esse campo de pesquisa. Hoje, sabe-se que as células T $\gamma\delta$ são produzidas em janelas de desenvolvimento “espaço-temporais” específicas dentro do timo e que, em sequência, elas

migram seletivamente para vários compartimentos periféricos, onde desempenham papéis fundamentais na fisiologia dos tecidos e vigilância imunológica (236).

A classificação atual das células T $\gamma\delta$ humanas é baseada na expressão do segmento V δ do TCR, de acordo com a nomenclatura de Lefranc & Rabitts (237), enquanto suas contrapartes murinas são categorizadas com base na expressão de segmentos V γ , conforme a nomenclatura de Heilig & Tonegawa (238). Como resultado dessas classificações dinâmicas, a maioria das células T $\gamma\delta$ humanas exibem o TCR invariante V γ 9V δ 2 ou um segmento semi-invariante V δ 1 unido a diferentes conjuntos de cadeias V γ (V γ 2–5, V γ 8 e V γ 9).

Em camundongos, as células T $\gamma\delta$ são os primeiros linfócitos T a se desenvolverem no timo embrionário, emergindo já no 15º dia de gestação (233). Os primeiros pools expressando TCRs semi-invariantes (V γ 4V δ 1, V γ 5V δ 1 e V γ 6V δ 1, por exemplo) colonizam vários locais periféricos como a epiderme, língua, útero, testículos, cavidade peritoneal, pulmão, linfonodos, tecido adiposo e meninges cerebrais (239). Alguns dias depois, um pool subsequente (V γ 7V δ 1) se dirige para o intestino e nesse intervalo de tempo é distribuído mais sistematicamente em diferentes órgãos linfoides periféricos (236). Esse padrão enigmático de ontogenia trouxe as primeiras impressões de que essas "ondas" de desenvolvimento garantem que a maioria dos tecidos seja atendida por esses linfócitos T, que estão idealmente posicionados para exercer funções locais muito importantes.

Em humanos, as células T $\gamma\delta$ desenvolvem-se a partir de progenitores tímicos compartilhados com células T $\alpha\beta$ (240). Os primeiros subconjuntos gerados são células V γ 9V δ 2, derivadas do rearranjo gênico ainda no início da gestação, isto é, nas semanas 5–6 (fígado) e 8–15 (timo) da fase fetal (241). Esse subtipo único, altamente responsivo a uma família de antígenos não peptídicos denominados “fosfoantígenos” (pAgs), representa o principal pool de células T $\gamma\delta$ até a metade do período gestacional (242). Consequentemente, após o nascimento, essas células se expandem de forma robusta em resposta a infecções sequenciais e então representam o subtipo predominante no sangue durante a infância, adolescência e idade adulta, constituindo de tal forma cerca de 90% das células T $\gamma\delta$ circulantes (243).

No período pós-natal, após a primeira onda ontogênica de células V γ 9V δ 2, um pool de células V δ 1 é gerado no timo humano, cerca de 4–6 meses após o nascimento (244). Sua geração dentro do timo é sustentada e contínua após a metade do período gestacional, fazendo com que elas então permaneçam como a população dominante (em geração) durante o final da fase fetal, pós-natal e vida adulta, substituindo gradualmente o compartimento V γ 9V δ 2 (242). Em adultos, as células V δ 1 representam em torno de 10% das células T $\gamma\delta$ circulantes e residem

preferencialmente em tecidos periféricos como o epitélio intestinal, derme, baço e fígado, onde são o subtipo predominante, contribuindo para a homeostase do tecido e participando da resposta imune (245).

Concomitante a esse processo dinâmico de ontogenia, o surgimento de células T $\gamma\delta$ é notavelmente marcado pela 'pré-programação' de suas funções efetoras exercidas na periferia. Em camundongos, é bem conhecido que esse processo ocorre ainda no timo e que as células T $\gamma\delta$ são pré-programadas e comprometidas com a produção unilateral de IFN γ ou IL-17, mantendo essas funções efetoras tanto no estado estacionário quanto no estado de ativação (246). No entanto, os estágios onde os timócitos TCR $\gamma\delta^+$ passam por esse processo e a base mecanicista que governa esses eventos ainda são desconhecidas. Esse sistema parece não se aplicar a células T $\gamma\delta$ de humanos, pois a grande maioria delas são produtoras de IFN γ , enquanto números muito baixos desses linfócitos T demonstraram produzir IL-17, apenas sob certas condições patológicas inflamatórias (247,248).

2.3.2. Diversidade fenotípica e funcional

Embora a linhagem de células T $\gamma\delta$ se desenvolva junto com as células T $\alpha\beta$, sua ativação funcional nos tecidos ocorre muito mais rapidamente, fazendo com que elas antecedam as funções efetoras das células T clássicas (249). Em particular, seus mecanismos de detecção e resposta não requerem apresentação de antígenos *via* MHC/HLA. Elas adotam estratégias semelhantes as células NK para reconhecer células estressadas em consequência de infecção ou transformação oncogênica através de múltiplas interações 'receptor-ligante', reagindo prontamente a esses sinais característicos num modo mais "inato" (isto é, sem exposição prévia ou 'iniciação' por APCs) (250). No entanto, foi demonstrado que as células T $\gamma\delta$ sofrem expansão clonal durante infecções primárias e exibem respostas adaptativas robustas após um contato secundário (251), semelhante às células T $\alpha\beta$. Coletivamente, esses achados as colocaram na interface entre células NK e células T convencionais, unindo o melhor dos dois mundos.

As diferentes funções inatas *versus* adaptativas das células T $\gamma\delta$ são geralmente associadas aos seus subtipos, conforme indicado pela identidade do TCR gerado durante a ontogenia. Os pAgs reconhecidos por células V γ 9V δ 2, por exemplo, são moléculas intermediárias fosforiladas e não peptídicas naturalmente produzidas por diferentes procariotos e eucariotos através da síntese de isoprenóides pelas vias 'não-mevalonato' e 'mevalonato', respectivamente (421). Essas rotas metabólicas altamente conservadas geram pAgs de alta e

baixa afinidade que podem ser reconhecidos pelo TCR V γ 9V δ 2, como é o caso das moléculas (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil-pirofosfato (HMBPP) e isopentenil pirofosfato (IPP) (252,253).

As células cancerosas frequentemente exibem uma superprodução de pAgs como consequência de uma via do mevalonato altamente ativa, que mostrou suportar muitas características do câncer, como a sobrevivência, proliferação e metástase (254). Uma síntese descontrolada desses metabólitos, então, surgiu como um alvo que pode ser detectado exclusivamente por células V γ 9V δ 2 reativas. O mecanismo de detecção desses pAgs envolve proteínas de membrana relacionadas à família B7 de moléculas coestimuladoras, denominadas ‘butorofilina’ (BTN). BTNs são pré-requisitos essenciais na ativação de células T $\gamma\delta$, pois realizam a captura intracelular de pAgs, sofrem alterações espaciais e conformacionais na superfície de membrana das células-alvo e, consequentemente, se ligam às cadeias V γ 9 e V δ 2 do TCR, enviando fortes sinais estimulatórios (252,253).

Além do reconhecimento direto e dependente de TCR, outras moléculas acessórias também suportam a atividade efetora das células V γ 9V δ 2. Os NKRs promovem a citotoxicidade das células T $\gamma\delta$ após reconhecimento de ligantes em células-alvo. Semelhante às células NK, aqui o receptor NKG2D (CD314) se liga a MIC-A/B induzidos por estresse, bem como detecta múltiplas moléculas ULBP (255), enquanto o receptor DNAM-1 liga-se a nectina-2 e nectina-like 5 (256). Análogo a células NK, mas em contraste com linfócitos T $\alpha\beta$, as células T $\gamma\delta$ são a principal população CD3⁺ circulante a expressar CD16 (Fc γ RIII), o que confere a essas células um alto poder citotóxico dependente de anticorpos (257). Finalmente, as células V γ 9V δ 2, em particular, têm uma capacidade única de fagocitar alvos opsonizados e apresentar antígenos de maneira semelhante às células dendríticas e, assim, iniciar células T *naive* e induzir respostas de células T efectoras (258–260).

As células V δ 1, assim como as células V γ 9V δ 2, também expressam e utilizam diferentes NKRs. Uma liberação robusta de perforinas e granzimas é induzida nessas células após o engajamento de NKG2D ou DNAM-1 aos seus ligantes, por exemplo (261–264). Além disso, NKp30, NKp44 e NKp46, correceptores da família de NCRs, são fortemente induzidos na superfície de ambos os subconjuntos após a estimulação do TCR e na presença de IL-2 ou IL-15, o que aumenta notavelmente a capacidade citotóxica desses linfócitos T (265,266). Embora pouco frequentes no sangue periférico, as células V δ 1 são uma população abundante nos tecidos e exibem capacidade de reconhecer diferentes antígenos metabólicos no contexto das moléculas monomórficas CD1 e MR1 (*MHC class I-related protein 1*) (267,268).

De fato, a família de moléculas CD1 (CD1b, CD1c e CD1d) se estabeleceram como mediadoras das respostas citotóxicas das células T $\gamma\delta$ (269). É importante notar que o subtipo V δ 1 representa a maioria dessas células reativas, portanto, suspeita-se que as células V δ 1 possam contribuir para a vigilância imunológica através de uma via dependente de CD1 (270). Além disso, MR1 pode mediar o reconhecimento de pequenos metabólitos derivados de folato e riboflavina, assim como pode apresentar neoantígenos tumorais para células T reativas a MR1, incluindo células T $\gamma\delta$ (271–274).

Outro achado muito interessante é que o compartimento das células T $\gamma\delta$ é modificado entre seus subtipos maturativos/funcionais, isto é, *naive* (T_N, CD45RA⁺ CD27⁺), memória central (T_{CM}, CD45RA⁻ CD27⁺), memória efetora (T_{EM}, CD45RA⁻ CD27⁻) e memória efetora terminalmente diferenciada (T_{EMRA}, CD45RA⁺ CD27⁻) (275). As células V γ 9V δ 2 *naive*, por exemplo, que ainda não tiveram um primeiro contato com seus ligantes após a saída do timo, são baixas produtoras de IFN γ e TNF, mas se tornam células T_{CM} à medida em que reconhecem o alvo, exibindo maior capacidade proliferativa (275). Esses dois subconjuntos são abundantes no sangue e sua produção de citocinas aumenta conforme eles se tornam células T_{EM} nos tecidos e em sítios inflamatórios, enquanto sua capacidade de expandir é gradualmente reduzida (276).

Na presença de IL-2, IL-7 e/ou IL-15, esses linfócitos então se tornam células T_{EMRA}, que demonstram um potencial citotóxico muito robusto com produção moderada de IFN γ , mas com capacidade proliferativa muito reduzida (277,278). Em contraste com as células V γ 9V δ 2, a maioria das células V δ 1 do sangue são CD45RA⁺ (células T_N e T_{EMRA}) exibindo maior produção de IL-2 naquelas células CD27⁺ e IFN γ naquelas CD27⁻, respectivamente (275). Esse processo de diferenciação/maturação das células T $\gamma\delta$ é altamente influenciado pelo microambiente em que residem e pelos estímulos aos quais são expostas. No mieloma múltiplo, por exemplo, essa rota linear de diferenciação pode ser moldada rumo à exaustão celular, que ocorre devido às condições extremamente hostis do microambiente tumoral (279).

2.3.3. Funções das células T $\gamma\delta$ no câncer

Embora as células cancerosas possam escapar da vigilância imunológica das células T $\alpha\beta$ e células NK, elas têm vários alvos moleculares que podem ser detectados pelas células T $\gamma\delta$. No entanto, a rede dinâmica de interações entre esses linfócitos e o microambiente ainda é pouco clara. Muitos trabalhos em modelos murinos de câncer têm evidenciado funções pró-tumorais executadas por células T $\gamma\delta$ através da produção de IL-17 (19,21), uma citocina que mostrou estimular o crescimento e metástase de tumores (280,281). Entretanto, as células T $\gamma\delta$

em humanos são naturalmente enviesadas para um perfil de resposta Th1 baseado na produção unilateral de IFN γ e TNF. Uma prova disso é que células T $\gamma\delta$ secretoras de IL-17 são ausentes no sangue humano e um número bastante pequeno delas foi observado em condições inflamatórias muito específicas (282).

Um estudo identificou através de análises transcriptômicas que as células T $\gamma\delta$ infiltrantes de tumor são o principal subtipo de células imunes associadas a um prognóstico favorável, enquanto nenhuma relação foi encontrada entre esses linfócitos e a presença de IL-17 (22). Esses achados estão em acordo com os de um estudo mais recente que mostrou que as células V δ 1 que se infiltram no câncer de mama triplo-negativo são fortes secretoras de IFN γ e se correlacionam positivamente com a remissão da doença e sobrevida dos pacientes (283). Apesar disso, não se pode descartar a presença de subconjuntos menores potencialmente pró-tumorais, principalmente em tumores de estágio avançado, onde a infiltração aumentada de células T $\gamma\delta$ IL-17⁺ já foi relatada (284,285). Ainda assim, é válido notar que as células T $\gamma\delta$ humanas normalmente produzem quantidades muito maiores de IFN γ e TNF do que outras citocinas, tanto dentro como fora do microambiente do tumor (21).

No geral, estudos mostraram um papel não redundante para células T $\gamma\delta$ na erradicação de tumores (19,21). Esses achados são compartilhados entre camundongos e humanos, e incluem: (i) a produção de moléculas imunológicas antitumorais como IFN γ , TNF, perforinas e granzimas; (ii) a expressão robusta de receptores de morte celular como o ligante de Fas (FasL), TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), NKG2D, DNAM-1, NCRs e CD16 (20); (iii) a capacidade de apresentar antígenos tumorais para células T $\alpha\beta$ (258); (iv) amplificar as respostas antitumorais de células T e NK via estímulo de IFN γ (286); e (v) estimular a produção de anticorpos e troca de classe em células B (287). Portanto, combinação dessas diversas funções em uma única célula fundamenta a importância desses linfócitos T como peças essenciais na imunidade a tumores.

2.3.4. Células T $\gamma\delta$ na leucemia

Muitos estudos *in vitro* mostraram que as células T $\gamma\delta$ reconhecem e destroem os blastos de leucemia, mas os mecanismos adjacentes ainda são pouco estudados (16). Uma análise comparativa sugeriu que as células V δ 1 eram o subtipo predominante na MO de pacientes pediátricos com LLA e que essas células eram altamente citotóxicas (288). Posteriormente, uma baixa frequência de células T $\gamma\delta$ circulantes foi relatada em pacientes com LMA antes da quimioterapia e a expansão dessas células no sangue foi relacionada com a diminuição da carga

tumoral, enquanto os pacientes com alto quantitativo de blastos exibiam números muitos reduzidos de células T $\gamma\delta$ circulantes (289).

Análises transcriptômicas revelaram uma abundância de células V γ 9V δ 2 infiltrantes de tumor em coortes de pacientes com leucemia (23). Essa alta frequência foi positivamente correlacionada com a sobrevida desses pacientes. Da mesma forma, foi relatado que as células V δ 1 têm porcentagens aumentadas em pacientes com LLC e que esse subtipo se expande no sangue periférico exibindo alta liberação de grânulos citotóxicos contendo granzimas B (261–263,290,291). Tomados em conjunto, esses dados sugerem que a leucemia afeta a frequência das células T $\gamma\delta$ e que a ativação e expansão dessas células retarda a progressão da doença.

Por outro lado, uma maior frequência de células V γ 9V δ 2 disfuncionais no momento do diagnóstico foi associada a um pior desfecho clínico em pacientes com LLC (292), sugerindo que a exaustão de células T $\gamma\delta$ possivelmente exerce um impacto funcional significativo na resposta antileucêmica. Alinhado a esse fenótipo de exaustão, foi observado uma expressão reduzida de NKG2D, embora as CLs exibissem uma alta atividade da via mevalonato. Isso permitiu a identificação de pacientes baixo-respondedores e respondedores à quimioterapia, onde o primeiro grupo exibiu números significativamente maiores de células V γ 9V δ 2 disfuncionais circulantes em comparação com o último (292).

Esses resultados revelam uma relação *in vivo* clinicamente relevante entre essa neoplasia hematológica, a presença de células T $\gamma\delta$ e seu estado funcional. Isso sugere que esses linfócitos T exibem potencial para expandir em pacientes com leucemia e que, conforme a doença progride, eles muito provavelmente entram em um estado de exaustão celular, que, conforme já discutido, é direcionado após a exposição prolongada a diferentes sinais de ativação e inibição derivados do tumor.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Caracterizar o perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar a expressão de marcadores de ativação, citotoxicidade, *homing*, diferenciação e exaustão em células T $\gamma\delta$ localizadas na medula óssea e no sangue periférico de pacientes

pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão;

- Realizar a quantificação de mediadores imunológicos solúveis (IFN γ , TNF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10) presentes na medula óssea e no sangue periférico de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão;
- Investigar correlação entre a frequência das células T $\gamma\delta$ e os mediadores imunológicos solúveis de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão;
- Avaliar a possível influência do perfil fenotípico-funcional e frequência das células T $\gamma\delta$ com a carga leucêmica, grupo de risco e doença residual mensurável em pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células B submetidos à quimioterapia de remissão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este estudo é 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 4.982.395/2021 e CAAE 51257921.2.0000.0009 (**Anexo I**). Todos os indivíduos que participaram deste estudo foram incluídos mediante leitura, aceite e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), para os pais e responsáveis, além do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), para aqueles acima de 06 anos de idade, alfabetizados.

4.2. Modelo de estudo

Trata-se de uma pesquisa exploratória observacional e analítica, de caráter longitudinal e prospectiva, para caracterização do perfil fenotípico-funcional de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B durante a quimioterapia de remissão. Este trabalho foi desenvolvido na

Fundação HEMOAM, localizada na cidade de Manaus/AM, em parceria com o Instituto René Rachou – IRR/Fiocruz, localizado em Belo Horizonte/MG.

4.3. População de estudo

A população do estudo foi constituída de 20 pacientes atendidos no serviço de hematologia pediátrica da Fundação HEMOAM, recém-diagnosticados com LLA-B, no período de abril de 2023 a abril de 2024. Além dos pacientes, foram recrutadas 20 crianças saudáveis (sem leucemia) para compor um grupo controle (GC), atendidas na triagem clínica da Fundação HEMOAM, que realizaram o hemograma para investigação de rotina e cujo resultado não apresentou nenhuma alteração hematológica.

4.4. Tamanho amostral e tipo de amostragem do estudo

Segundo estudos epidemiológicos realizados pela Fundação HEMOAM (2005 a 2015), são identificados no estado do Amazonas uma média de 84 casos novos de leucemia aguda por ano. Aproximadamente 70% desses casos novos são de LLA e a faixa etária predominante é pediátrica, constituindo mais da metade dos casos (27). Levantamentos epidemiológicos posteriores (2016 a 2021) corroboram esses dados e mostram que, em média, 65 novos casos de LLA são diagnosticados a cada ano, enquanto mais de 50% destes são de LLA infantil (293). Além disso, cerca de 75% dos casos de LLA na infância é derivado de células B e recebem a classificação imunofenotípica de LLA-B comum (27,49). Dessa forma, levando em consideração o comportamento epidemiológico da doença e os dados levantados, é esperado anualmente mais de 25 novos casos de LLA-B pediátrica, diagnosticados na Fundação HEMOAM.

Para definição do tipo de amostragem da pesquisa, foi considerado que o número de casos de LLA-B pediátrica é relativamente baixo e que há um percentual de perda por óbito de mais de 20% dos pacientes durante a quimioterapia de remissão (27). Assim, a estratégia adotada foi a de “demanda espontânea com amostragem não-probabilística por conveniência”. Esta foi uma abordagem pragmática diante das circunstâncias específicas do estudo e do contexto de número limitado de casos e alta mortalidade durante o tratamento.

4.5. Critérios de inclusão, não inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão utilizados para o grupo LLA-B foram: pacientes recém-diagnosticados com LLA-B *de novo*, com idade entre 1 a menor de 18 anos, sem diagnóstico

prévio de câncer. Para o grupo controle, os critérios de inclusão adotados foram: idade entre 1 a menor de 18 anos, sem alterações hematológicas e sem infecção prévia há menos de 04 semanas. Não foram incluídos no estudo: os indivíduos do grupo LLA-B ou controle que fornecessem material biológico insuficiente, coagulado ou que recusassem assinar os termos éticos. Como critérios de exclusão, para ambos os grupos, foram considerados: amostras insuficientes para a realização dos ensaios, pedido de retirada da pesquisa, óbito, presença de doença inflamatória aguda ou crônica conhecida e distúrbio autoimune, que podem interferir nos parâmetros estudados.

4.6. Obtenção e Processamento das amostras

Para este estudo, foram utilizadas amostras de MO e SP de pacientes pediátricos com LLA-B, obtidas através de punção aspirativa da crista ilíaca, esterno ou tíbia e através de punção venosa, respectivamente. A obtenção dessas amostras ocorreu paralelamente aos procedimentos médicos habituais, de modo que foram aproveitadas da rotina médica para a pesquisa. As coletas ocorreram em 05 (cinco) *timepoints* da quimioterapia de remissão, sendo estes: dia do diagnóstico (D0), 8º dia da terapia de indução da remissão (D8), 15º dia da terapia de indução da remissão (D15), final da terapia de indução da remissão (D35) e 84º dia da terapia de consolidação da remissão (D84). Foram coletados 2ml de MO no D0, D15, D35 e D84, além de 3ml de SP no D0, D8, D15, D35 e D84 em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pela equipe médica da Fundação HEMOAM.

Além das amostras dos pacientes pediátricos com LLA-B, foram obtidas amostras de SP de crianças saudáveis, coletadas por punção venosa, para serem utilizadas como valor de referência comparativa nas análises (grupo controle para SP). As amostras obtidas foram então encaminhadas ao Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante/plasma pobre em plaquetas (PPP) foi coletado e transferido para criotubos que, em seguida, foram identificados e condicionados em freezers - 80°C para posterior dosagem dos mediadores imunológicos solúveis. Com a fração celular restante foi realizada a marcação com anticorpos monoclonais para a imunofenotipagem por citometria de fluxo (**Figura 10**).

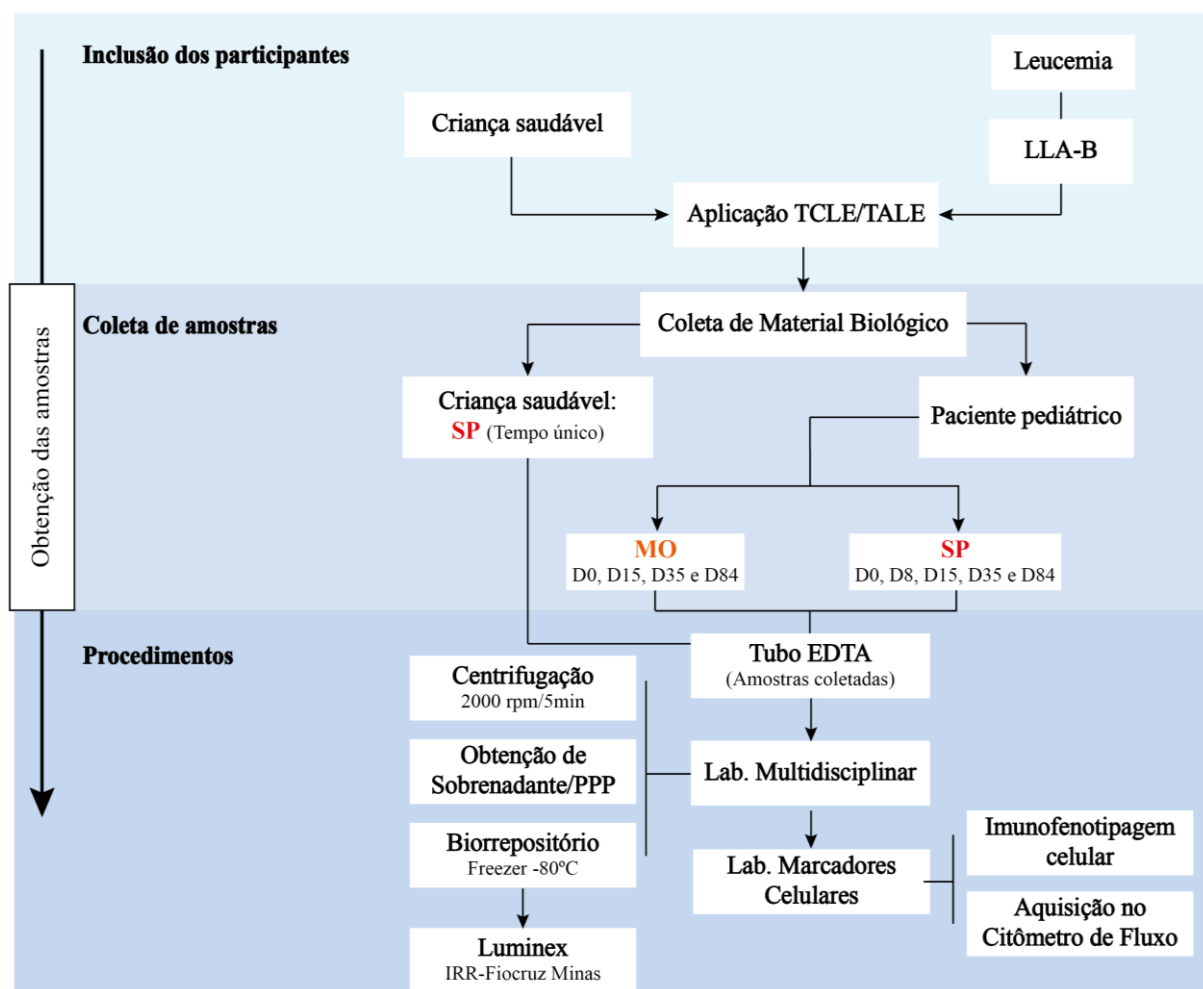


Figura 10: Fluxograma de obtenção das amostras. Demonstração detalhada das etapas de obtenção e processamento das amostras utilizadas no estudo.

4.7. Imunofenotipagem de células T $\gamma\delta$

A caracterização do estado fenotípico e funcional das populações de células T $\gamma\delta$ foi realizada por citometria de fluxo, seguindo um protocolo de imunofenotipagem com um painel de anticorpos monoclonais (**Quadro 5**) conjugados a fluorocromos específicos para marcadores de cada população e fenótipo celular, padronizado para este projeto.

Quadro 5. Painel de marcadores para a imunofenotipagem de células T $\gamma\delta$.

Tubo	Parâmetros	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
01	Controle (-)	-	-	-	-	-	-
02	Ativação	Anti-TCRV δ 1	Anti-TCRV δ 2	Anti-CD69	Anti-CD314	Anti-CD45	Anti-CD3
03	Citotoxicidade	Anti-TCRV δ 1	Anti-TCRV δ 2	Anti-CD16	Anti-CD56	Anti-CD45	Anti-CD3
04	Exaustão	Anti-TCRV δ 1	Anti-TCRV δ 2	Anti-CD279	Anti-CD152	Anti-CD45	Anti-CD3
05	Homing	Anti-TCRV δ 1	Anti-TCRV δ 2	Anti-CD183	Anti-CD184	Anti-CD45	Anti-CD3
06	Diferenciação	Anti-TCRV δ 1	Anti-TCRV δ 2	Anti-CD27	Anti-CD45RA	Anti-CD45	Anti-CD3

Inicialmente, realizamos uma titulação dos anticorpos monoclonais. Após este procedimento, foi adotado um volume específico de cada anticorpo monoclonal a ser adicionado no fundo dos respectivos tubos de ensaio, conforme demonstrado no **Quadro 6**. Em seguida, um volume $\geq 100\mu\text{l}$ de amostra foi adicionado a cada tubo, homogeneizado em vórtex e incubado por 30 minutos em temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Após a marcação das células e incubação, foi adicionado 2ml de solução de lise 1X (*BD FACSTTM Lysing Solution 10X Concentrate*) durante homogeneização em vórtex. Em seguida, os tubos foram novamente incubados por 10 minutos em TA. Passado a fase de incubação, os tubos foram centrifugados a 1.700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão. Para a lavagem do *pellet* celular formado, foi adicionado 2ml de solução PBS-W (*Phosphate Buffered Saline Wash*) em cada tubo, homogeneizado em vórtex e centrifugado a 1.700 rpm por 5 minutos, desprezando o sobrenadante por inversão ao final, em um ciclo de duas lavagens seguidas. Por fim, após o ciclo de 2 lavagens do *pellet* celular, a amostra foi ressuspendida em 350 μl de PBS-W para posterior aquisição na plataforma de citometria de fluxo.

Quadro 6. Titulação dos anticorpos monoclonais utilizados na imunofenotipagem.

Parâmetros	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
Ativação	Anti-TCRV δ 1 0.5 μl	Anti-TCRV δ 2 0.5 μl	Anti-CD69 1 μl	Anti-CD314 0.5 μl	Anti-CD45 3 μl	Anti-CD3 1 μl
Citotoxicidade			Anti-CD16 0.5 μl	Anti-CD56 0.5 μl		
Exaustão			Anti-CD279 1 μl	Anti-CD152 1 μl		
<i>Homing</i>			Anti-CD183 1 μl	Anti-CD184 0.5 μl		
Diferenciação			Anti-CD27 3 μl	Anti-CD45RA 0.5 μl		

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo FACSCantoTM II (BD Biosciences) da Fundação HEMOAM. Para a identificação morfolétrica e imunofenotípica das subpopulações de células T $\gamma\delta$ foi utilizado o software FlowJo (v10), com o auxílio de “gates” para a seleção do pool celular de interesse em gráficos que combinam características morfológicas (tamanho e complexidade celular) com características imunofenotípicas através da fluorescência emitida pelos anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos (**Fig. 11b**). Os gráficos utilizados foram do tipo “dot plot”, “contour plot” e histograma, pois apresentam uma melhor visualização das estratégias de análise (**Fig. 11a**).

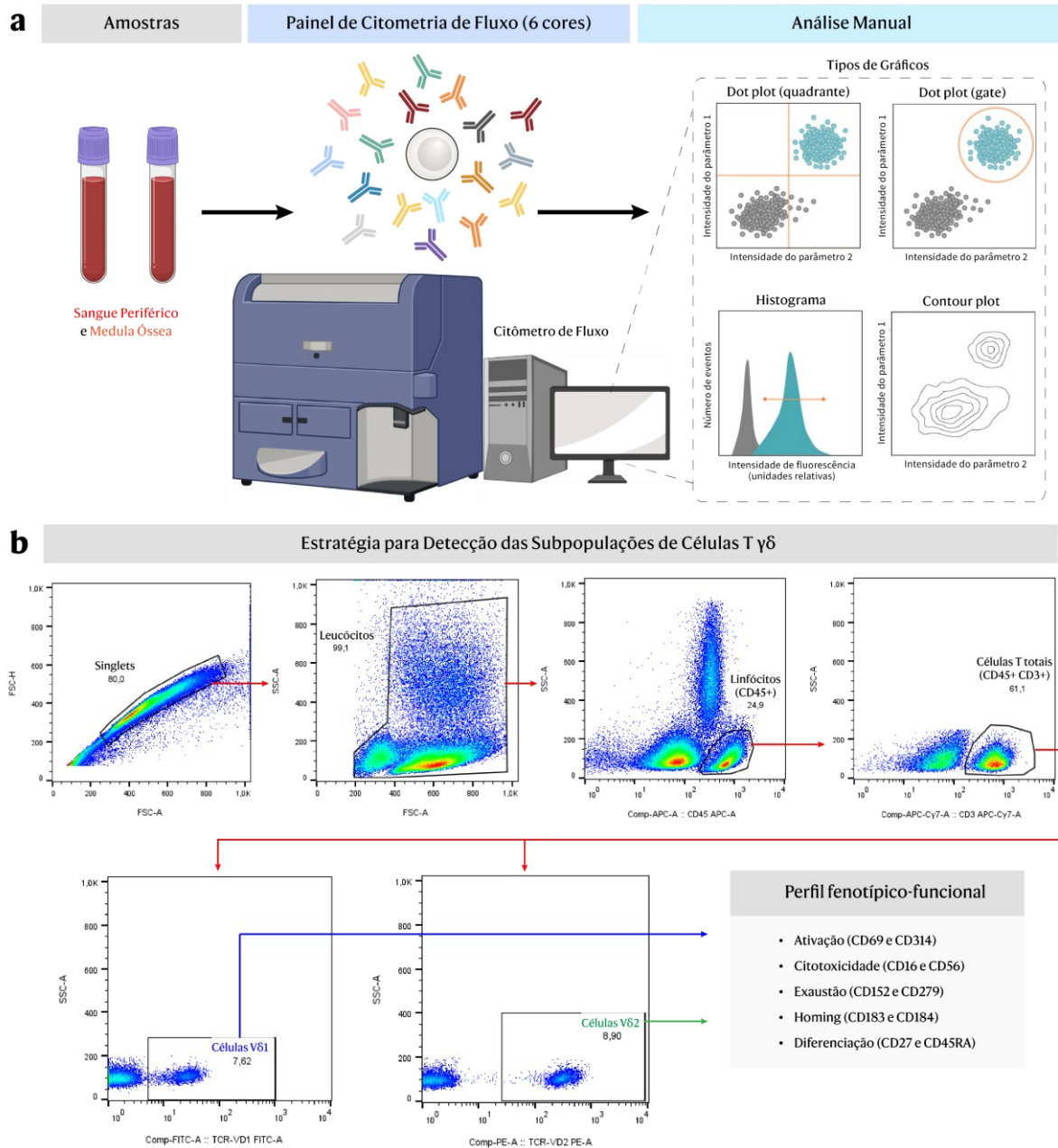


Figura 11: Estratégia de identificação de células T $\gamma\delta$. Para a identificação das células V δ 1 (CD45⁺CD3⁺TCRV δ 1⁺) e células V γ 9V δ 2 (CD45⁺CD3⁺TCRV δ 2⁺), iniciou-se a análise com gráfico FSC-H x FSC-A para exclusão de *doublets*. Em seguida, foi gerado um gráfico SSC x FSC para detecção dos leucócitos, seguido da criação de uma *gate* na região correspondente. Em seguida, foi gerado um gráfico SSC x CD45:APC e criado uma nova *gate* para detecção dos linfócitos e exclusão de blastos de leucemia (CD45^{low}), seguido pela construção de um gráfico SSC x CD3:APC-Cy7 para detectar linfócitos T totais (CD45⁺CD3⁺). A partir de então, foram gerados dois gráficos: SSC x TCRV δ 1:FITC, utilizando a população CD45⁺CD3⁺ para detectar células V δ 1, e SSC x TCRV δ 2:PE, utilizando a população CD45⁺CD3⁺ para detectar células V γ 9V δ 2. As duas populações foram avaliadas posteriormente quanto a expressão de marcadores fenotípicos e funcionais.

4.8. Dosagem de mediadores imunológicos solúveis

O plasma obtido das amostras de SP e MO foi utilizado para a dosagem de mediadores solúveis, ou seja, das seguintes citocinas e quimiocinas: IFN γ , TNF, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-17, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10. A quantificação ocorreu na plataforma Luminex[®] do IRR-Fiocruz Minas, seguindo as orientações técnicas e protocolos descritos pelo fabricante. As dosagens foram realizadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 da quimioterapia de remissão, além das amostras do GC em tempo único. Para as quantificações, utilizou-se um kit *Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex Screening Panel* (Bio-Rad[®]) que permitiu a pesquisa dos analitos selecionados para esse estudo.

Inicialmente, as amostras de plasma foram descongeladas em banho-maria a 37°C, homogeneizadas em vórtex por 5 segundos e centrifugadas a 14.000 x g por 5 minutos em TA. Adicionou-se 50 μ l de amostra de plasma em placas de ensaio Luminex previamente sensibilizadas com 50 μ l de um mix de *beads* (diluído 10x) em cada poço, seguida de 2 lavagens com 100 μ l de tampão de lavagem. As placas foram incubadas em *overnight* a 4°C, sob agitação em 500 $\pm$ 50 rpm. No dia seguinte, 25 μ l de anticorpos de detecção (diluído 10x) foram adicionados em cada poço e depois a placa foi incubada por 30 minutos em TA e ao abrigo da luz, sob agitação de 500 $\pm$ 50 rpm. Subsequentemente, foram realizadas três lavagens com 100 μ l de tampão de lavagem. Em seguida, adicionou-se 50 μ l de estreptavidina-ficoeritrina (SAPE, diluída 10x) em cada poço e a placa foi novamente incubada por 30 minutos sob as mesmas condições. Procedeu-se então com uma lavagem da placa com 100 μ l de solução tampão e a amostra foi ressuspensa com 125 μ l de tampão de ensaio e homogeneizada por 10 minutos.

A intensidade média de fluorescência (MFI) foi determinada pela aquisição das amostras (50 microesferas/analito) no equipamento Bio-Plex[™] 200 (Bio-Rad[®]), utilizando-se o software Luminex xPONENT (v3.1). As concentrações de cada molécula foram obtidas a partir da construção de curva-padrão para cada analito, utilizando uma curva logística de ajuste de 5 parâmetros para transformar o MFI em picogramas/ml, utilizando o software Bio-Plex Manager (v6.2).

4.9. Obtenção dos dados sociodemográficos, hematológicos e clínico-patológicos

Os dados sociodemográficos (idade, sexo e procedência), hematológicos (hemograma) e clínico-patológicos (grupo de risco, DRM, imunofenótipo, carga tumoral, envolvimento do SNC, citogenética e mielograma) foram obtidos a partir de registros do Laboratório de

Marcadores Celulares e de prontuários do Setor de Atendimento Médico e Estatístico (SAME) e do sistema iDoctor da Fundação HEMOAM. Posteriormente, todos os dados obtidos foram plotados em planilha eletrônica do Microsoft Excel[®], onde foi construído o banco de dados do estudo.

4.10. Análise descritiva e estatística

Os dados hematológicos, sociodemográficos e clínico-patológicos dos pacientes foram apresentados em formas de tabelas, elaboradas com o programa Microsoft Excel[®]. Os resultados obtidos na imunofenotipagem por citometria de fluxo e dosagem de mediadores solúveis foram analisados através do software FlowJo (v10) e Bioplex Manager (v6.2), respectivamente. Para realização das análises descritivas e estatísticas convencionais, foi utilizado o software GraphPad Prism (v8). Para verificar a normalidade de dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados obedeciam a parâmetros normais de distribuição, as comparações de valores entre dois grupos de dados independentes ou dependentes foram realizadas através do Teste *t* Student não-pareado ou Teste *t* Pareado, respectivamente. Para comparação das variáveis entre três ou mais grupos independentes ou dependentes, foram realizados os Testes de ANOVA One-Way Ordinary ou o ANOVA RM One-Way, respectivamente, ambos seguidos do Pós-Teste de Tukey. Quando os dados não obedeciam a parâmetros normais de distribuição, as comparações de valores entre dois grupos de dados independentes ou dependentes foram realizadas utilizando o Teste de Mann-Whitney e Teste de Wilcoxon, respectivamente. Para comparação das variáveis entre três ou mais grupos de dados independentes ou dependentes, foram realizados os Testes de Kruskal-Wallis ou o Teste de Friedman, respectivamente, ambos seguidos pelo pós-teste de Dunn. A significância estatística foi considerada em todos os casos em que $p < 0,05$. Para a análise das redes biológicas, foi utilizado o Teste de correlação de Spearman através do software GraphPad Prism. Após a realização da análise de correlação, um banco de dados foi criado usando o programa Microsoft Excel. Em seguida, as correlações significativas foram compiladas usando o software Cytoscape (v3.0.3), para demonstração das interações complexas entre as células T $\gamma\delta$ e os mediadores imunológicos solúveis. 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 ($r \geq 0,68$).

5. RESULTADOS

5.1. Características da população de estudo

Para a execução deste trabalho, foram recrutados 20 pacientes pediátricos com LLA-B e 20 crianças saudáveis (sem leucemia, GC), sendo processado um total de 180 amostras oriundas de pacientes com leucemia (100 amostras de SP + 80 amostras de MO) e 20 amostras-controle (20 SP). Por se tratar de um procedimento invasivo e não viável de ser executado sem a devida prescrição médica, a coleta do aspirado de MO não foi realizada nas crianças saudáveis do GC. O grupo LLA-B foi composto por 7 crianças do sexo masculino e 13 do sexo feminino com idade mediana ao diagnóstico de 6 anos [IQR=3–12], enquanto o GC foi composto por 12 crianças do sexo masculino e 8 do sexo feminino com mediana de idade de 9 anos [IQR=6–11]. A maioria dos pacientes (65%) e todas as crianças do grupo controle incluídas no estudo foram procedentes da capital Manaus, conforme observado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características sociodemográficas da população de estudo.

Variáveis	LLA-B (<i>n</i> = 20)	GC (<i>n</i> = 20)
Sexo (<i>n</i>, Masculino/Feminino, %)	7M (35%) / 13F (65%)	12M (60%) / 8F (40%)
Idade (mediana [IQR])	6 [3–12]	9 [6–11]
Grupo de Idade (<i>n</i>, %)		
1 a <5	7 (35%)	4 (20%)
5 a <9	5 (25%)	4 (20%)
9 a <14	4 (20%)	12 (60%)
14 a <18	4 (20%)	-
Procedência (<i>n</i>, %)		
Manaus	13 (65%)	20 (100%)
Interior do Amazonas	7 (35%)	-

Abreviações: GC, grupo controle; F, feminino; IQR, intervalo interquartil; LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; M, masculino; *n*, número amostral.

As características hematológicas da população estudada e os respectivos valores de referência estão descritos na **Tabela 2**. Em comparação com o GC, observamos que os pacientes com LLA-B ao diagnóstico exibiram parâmetros sanguíneos que são observáveis na maioria

dos casos clínicos de leucemia aguda: uma leucocitose intensa com diminuição de neutrófilos, plaquetas, eritrócitos e hemoglobina. Isso reflete a usual tríade da leucemia, caracterizada por leucocitose (com neutropenia), anemia e trombocitopenia, ou seja, a substituição dos elementos normais do sangue e da medula óssea por blastos leucêmicos.

Tabela 2. Características hematológicas da população de estudo.

Variáveis	LLA-B (n = 20)		GC (n = 20)	Valor de referência*
	MO	SP	SP	
Leucócitos totais (x10 ³ /μl), mediana [IQR]	85.8 [38.2–114.7]	13.0 [2.9–34.6]	6.2 [5.2–7.5]	5.2–12.4 (x10 ³ /μL)
Blastos ABS (%), mediana [IQR]	74.708 (90%) [30.053–96.851]	7.555 (55%) [190–24.727]	-	-
Neutrófilos (x10 ³ /μl), mediana [IQR]	1.5 [0.61–4.5]	0.66 [0.28–1.95]	2.7 [2.3–3.5]	1.9–8 (x10 ³ /μL)
Linfócitos (x10 ³ /μl), mediana [IQR]	83.5 [55.8–199.4]	25.8 [9.1–175]	3.4 [2.5–4.7]	0.9–5.2 (x10 ³ /μL)
Eritrócitos (x10 ⁶ /μl), mediana [IQR]	2.69 [2.43–2.94]	3.05 [2.67–3.32]	4.45 [4.27–4.71]	4–6 (x10 ⁶ /μL)
Hemoglobina (g/dL), mediana [IQR]	7.8 [6.7–8.5]	8.9 [7.6–9.8]	12.6 [11.7–13.1]	12–18 (g/dL)
Plaquetas (x10 ³ /μl), mediana [IQR]	35 [21–63]	28 [20–60]	312 [261–345]	130–400 (x10 ³ /μL)

Abreviações: MO, medula óssea; SP, sangue periférico; GC, grupo controle; IQR, intervalo interquartil. *Valores de referência adotados pelo setor de Hematologia do HEMOAM. **Fonte em negrito** indica parâmetros hematológicos anormais.

O quadro clínico-patológico dos pacientes pediátricos com LLA-B está demonstrado na **Tabela 3**, sendo observado uma consequência da expansão proliferativa de células B malignas e pelo possível envolvimento de órgãos extramedulares. Em nosso estudo, 3/20 (15%) dos pacientes apresentavam aumento palpável dos linfonodos (linfadenopatia), enquanto 6/20 (30%) exibiram alterações abdominais com aumento do baço e do fígado (esplenomegalia e hepatomegalia, respectivamente). Apenas 1/20 (5%) dos pacientes exibiu infiltração tumoral no SNC, enquanto 10/20 (50%) mostraram anormalidades citogenéticas/moleculares ao diagnóstico. Além disso, todos os pacientes exibiram um fenótipo tumoral compatível com LLA-B comum (CD10⁺, antígeno *Calla*) e a maioria possuía carga leucêmica elevada (>50% de blastos) tanto no compartimento medular quanto na circulação periférica.

Tabela 3. Características clínico-patológicas da população de estudo ao diagnóstico.

Variáveis (n, %)	LLA-B (n = 20)	
Linfadenopatia	3 (15%)	
Esplenomegalia	6 (30%)	
Hepatomegalia	6 (30%)	
Envolvimento do SNC	1 (5%)	
Imunofenótipo		
LLA-B comum (CD10 ⁺)	20 (100%)	
Citogenética/Biologia Molecular		
Normal	10 (50%)	
Anômala	10 (50%)	
Carga Leucêmica	MO [*]	SP [#]
≤50% de blastos	4 (20%)	9 (45%)
>50% de blastos	16 (80%)	11 (55%)

Abreviações: GC, grupo controle; LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; MO, medula óssea; SNC, sistema nervoso central; SP, sangue periférico. *Obtido através da imunofenotipagem por citometria de fluxo. #Obtido por contagem manual de células/hemograma.

A **Tabela 4** resume a estratificação de grupo de risco e a avaliação de DRM medular durante o tratamento quimioterápico. Os pacientes foram categorizados em três subgrupos de acordo com a estratificação de risco ao diagnóstico e reestratificação de risco ao D15 da terapia de indução da remissão. Estes foram denominados: BR - Baixo Risco, RI - Risco Intermediário e AR - Alto Risco. No momento do diagnóstico, 25% dos pacientes foram classificados como BR ($n = 5$, 1M/4F; idade mediana=6 anos; IQR=3–11), enquanto 45% foram classificados como RI ($n = 9$, 1M/8F; idade mediana=6 anos; IQR=3–9) e 30% foram classificados como AR ($n = 6$, 5M/1F; idade mediana=13 anos; IQR=3–15). No D15, apenas um único paciente (5%) permaneceu como BR ($n = 1$, sexo feminino; idade=3 anos), enquanto 55% foram reestratificados para RI ($n = 11$, 1M/10F; idade mediana=6 anos; IQR=3–9) e 40% foram reestratificados para AR ($n = 8$, 6M/2F; idade mediana=12 anos; IQR=4–14).

Além disso, a população de estudo também foi classificada de acordo com a detecção de DRM medular (valor de referência: <0.01%) ao D15 e D35 da terapia de indução da

remissão. Estes foram denominados: DRM⁽⁺⁾ e DRM⁽⁻⁾. A avaliação da presença de DRM no D15 demonstrou que, neste tempo, praticamente todos os pacientes possuíam carga leucêmica residual >0.01% no compartimento medular e estes foram então agrupados como DRM⁽⁺⁾ ($n = 20$, 7M/13F; idade mediana=6 anos; IQR=3–12). Curiosamente, percebemos que, em nosso estudo, os pacientes DRM⁽⁺⁾ exibiram valores mais altos de DRM (>1% de blastos na MO) e valores menores de células malignas residuais (<1% de blastos na MO), permitindo-nos então classificá-los como DRM^{low} (<1%) ($n = 6$, 2M/4F; idade mediana=7 anos; IQR=3–11) e DRM^{high} (>1%) ($n = 14$, 5M/9F; idade mediana=6 anos; IQR=3–13). Ao final da terapia de indução, no D35, 65% dos pacientes não exibiram presença de DRM medular ($n = 13$, 4M/9F; idade mediana=7 anos; IQR=3–11), alcançando a remissão completa após a indução, e 35% ainda apresentavam células leucêmicas residuais ($n = 7$, 3M/4F; idade mediana=6 anos; IQR=3–14).

Tabela 4. Estratificação de risco e DRM medular durante a quimioterapia de remissão.

Variáveis (n , %)	LLA-B ($n = 20$)	Sexo	Idade*
Estratificação de Grupo de Risco (D0)			
BR	5 (25%)	1M/4F	6 [3–11]
RI	9 (45%)	1M/8F	6 [3–9]
AR	6 (30%)	5M/1F	13 [3–15]
Reestratificação de Risco (D15)			
BR	1 (5%)	1F	3 [3–3]
RI	11 (55%)	1M/10F	6 [3–9]
AR	8 (40%)	6M/2F	12 [4–14]
Doença Residual Mensurável (D15)			
DRM ⁽⁻⁾	0 (0%)	-	-
DRM ⁽⁺⁾	20 (100%)	7M/13F	6 [3–12]
Low (<1% de blastos)	6 (30%)	2M/4F	7 [3–11]
High (>1% de blastos)	14 (70%)	5M/9F	6 [3–13]
Doença Residual Mensurável (D35)			
DRM ⁽⁺⁾	7 (35%)	3M/4F	6 [3–14]
DRM ⁽⁻⁾	13 (65%)	4M/9F	7 [3–11]

Abreviações: AR, alto risco; BR, baixo risco; DRM, doença residual mensurável; F, feminino; LLA-B, leucemia linfoblástica aguda de células B; M, masculino; n , número amostral; RI, risco intermediário.*Idade reportada em mediana com intervalo interquartil.

5.2. Análise do perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ e mediadores imunológicos solúveis ao diagnóstico

A caracterização inicial do perfil imunológico dos pacientes com LLA-B pediátrica (LLA-B SP e LLA-B MO) é apresentada na **Figura 12**. Nossos dados demonstraram que os pacientes recém-diagnosticados com a doença apresentam uma frequência significativamente reduzida de linfócitos totais (**Fig. 12b**) no compartimento medular em comparação com a circulação periférica. Esse fenômeno é corroborado pelos parâmetros hematológicos mostrados na **Tabela 2** que indicam que os pacientes com LLA-B exibiram uma carga tumoral intramedular elevada ao diagnóstico, com intensa supressão dos elementos sanguíneos normais (**Fig. 12a**). Em contrapartida, não houve diferença significativa entre o SP dos pacientes e o GC, embora tenha-se observado uma redução na frequência dos linfócitos totais circulantes.

Os pacientes com LLA-B não apresentaram alterações significativas no quantitativo de células T totais (**Fig. 12c**). A análise por citometria de fluxo revelou uma diferença mínima entre GC, SP e MO, sugerindo que o percentual de células CD3⁺, dentro do *pool* de linfócitos totais, pode não variar drasticamente no momento do diagnóstico. Apesar disso, não seria incerto propor que a frequência das células T mostrou uma tendência de maior redução na MO do que na circulação sanguínea desses pacientes.

As células T $\gamma\delta$ demonstraram mudanças na presença dos seus subconjuntos. As duas subpopulações detectadas compreenderam uma pequena fração do total de células T, com considerável variação interindividual (**Fig. 12d,e**). As células V δ 1 foram significativamente mais presentes na MO dos pacientes com LLA-B, enquanto nenhuma diferença expressiva foi observada entre o SP e o GC (**Fig. 12d**). Ainda assim, percebe-se que, em nosso estudo, as células V δ 1 foram mais presentes na circulação sanguínea dos pacientes com a doença, quando comparado ao GC. Curiosamente, as células V δ 2 exibiram um comportamento inverso de sua contraparte V δ 1⁺ (**Fig. 12e**), pois a frequência deste subconjunto mostrou uma tendência de diminuição no SP dos pacientes com LLA-B em comparação com o GC, enquanto foi observado uma frequência significativamente menor no compartimento medular.

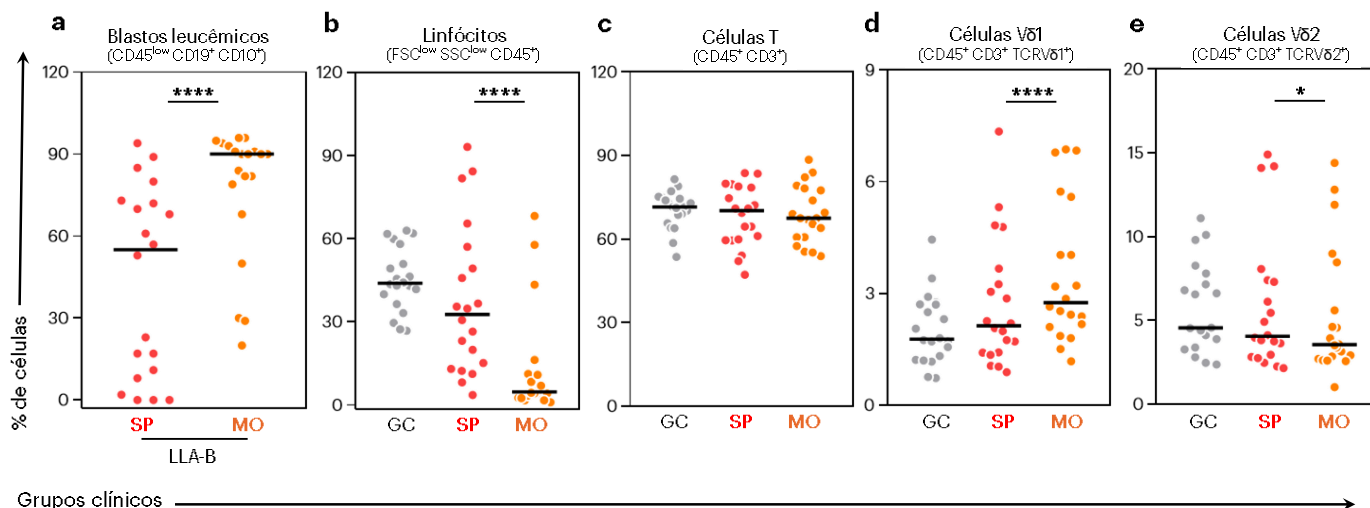


Figura 12: Caracterização da frequência de células T $\gamma\delta$ nos pacientes pediátricos diagnosticados com LLA-B. As populações celulares foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A caracterização imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SPvsMO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.0001$ (****) ou $p < 0.05$ (*).

Como a sinalização dos mediadores imunológicos solúveis é crucial para as respostas das células T $\gamma\delta$ durante o desenvolvimento do tumor, nós realizamos a quantificação do perfil dessas moléculas no microambiente tumoral e sangue periférico no momento do diagnóstico, conforme demonstrado na **Figura 13**. Em geral, todos os analitos avaliados atingiram maior produção no compartimento medular dos pacientes. As análises revelaram um aumento expressivo das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 e CXCL10, assim como das citocinas pró-inflamatórias IFN γ , TNF, IL-12 e IL-17. As citocinas homeostáticas e de manutenção de linfócitos, como IL-2, IL-7 e IL-15, também exibiram comportamento semelhante, com concentrações muito maiores na MO do que no sangue, enquanto a citocina regulatória IL-10 também se manteve alta na MO.

Ao analisar a circulação periférica, observou-se que todas as quimiocinas avaliadas tiveram concentrações menores em relação a MO, mas apenas CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 e CXCL10 estiveram significativamente aumentadas quando comparadas ao GC. Curiosamente, quase todas as citocinas circulantes não demonstraram diferença expressiva em relação ao GC, com exceção de TNF e IL-10, que se mantiveram significativamente elevadas no SP dos pacientes.

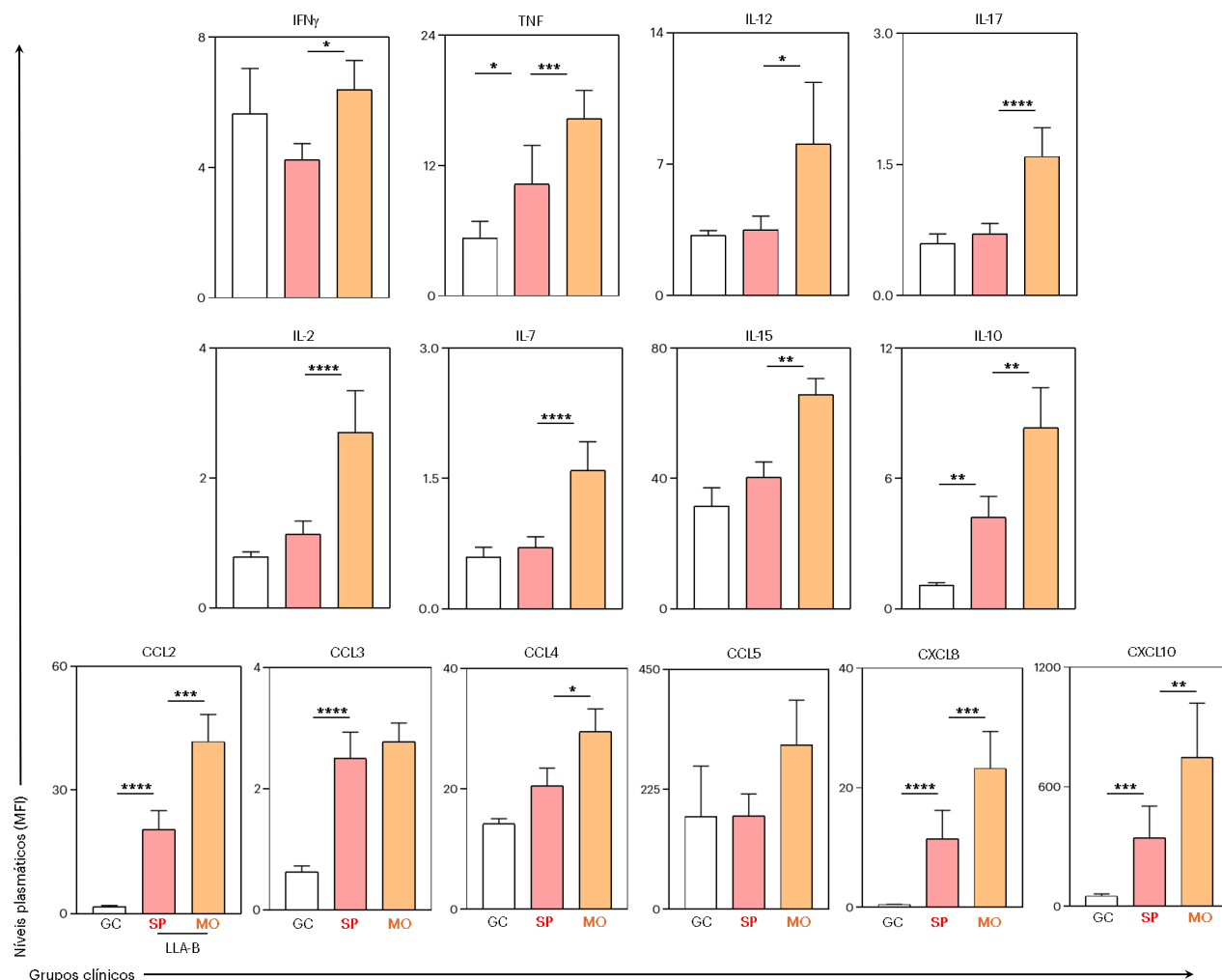


Figura 13: Análise do perfil de mediadores imunológicos solúveis ao diagnóstico. As citocinas e quimiocinas foram dosadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC). Os analitos foram quantificados por Luminex, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são apresentados por meio de gráficos de barras (*one bar per column*), relatados em escala linear, mostrando a média com erro padrão (*mean with SEM*) da intensidade média de fluorescência (MFI). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SPvsMO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

Inicialmente, avaliamos por citometria de fluxo o estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$ derivadas do sangue e da MO. A expressão de CD45RA e CD27 define quatro subconjuntos de células T $\gamma\delta$ em humanos (277). Aqui, buscamos determinar se a combinação de ambos os marcadores poderia ser usada para identificar subpopulações de células T $\gamma\delta$ *naive* (T_N), de memória central (T_{CM}), efectoras (T_{EM}) ou terminalmente diferenciadas (T_{EMRA}) (**Figura 14**). Esses fenótipos transitórios são balanceados entre si à medida em que os linfócitos T se tornam responsivos ao antígeno cognato e podem refletir a capacidade funcional das células T $\gamma\delta$.

As células V δ 1 *naive* (CD45RA⁺ CD27⁺) exibiram uma frequência maior no GC, enquanto houve uma queda acentuada do quantitativo dessas células no SP e MO dos pacientes no momento do diagnóstico (**Fig. 14a**). Curiosamente, os subconjuntos de T_{CM} (CD45RA⁻ CD27⁺) e T_{EM} (CD45RA⁻ CD27⁻) tiveram os menores percentuais, tanto no GC quanto na circulação periférica e compartimento medular dos pacientes. Ainda assim, é importante notar que houve um aumento significativo desses subconjuntos, principalmente na MO, indicando uma tendência de diferenciação das células V δ 1 em direção à memória efetora nesse compartimento. As células V δ 1 T_{EMRA} (CD45RA⁺ CD27⁻) foram as mais detectadas no SP e MO dos pacientes, sugerindo que este subconjunto está mais presente durante o desenvolvimento do tumor.

De forma distinta do subconjunto V δ 1, as células V δ 2 *naive* têm uma presença muito maior no GC, mas uma frequência ainda mais elevada no SP e MO dos pacientes (**Fig. 14b**), sugerindo pouco comprometimento funcional ou ativação/iniciação prejudicada da célula. Também foram observados aumentos pequenos, mas significativos, nas populações T_{CM} e T_{EM} dentro da MO, indicando que algumas células ainda assim conseguem ser ativadas e diferenciadas nesse compartimento. No entanto, a presença de células T_{EMRA} é reduzida nos pacientes com LLA-B, reforçando então a ideia de que esse subconjunto apresenta responsividade prejudicada durante a progressão da doença.

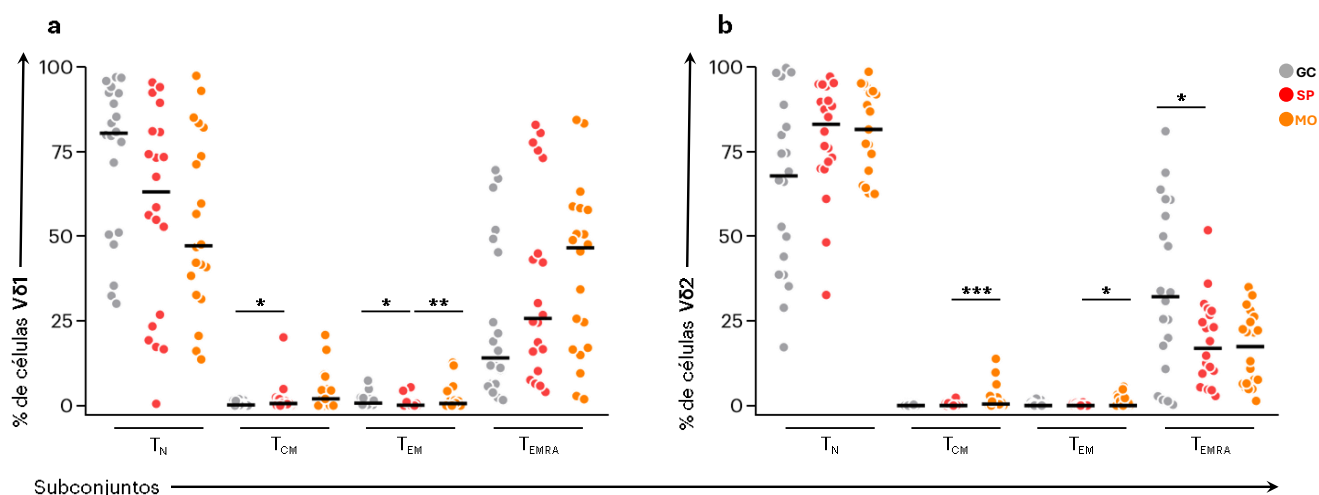


Figura 14: Análise do estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico. As subpopulações de células de memória ou efetoras expressando CD45RA e/ou CD27 foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A avaliação imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SP vs MO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP).

Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*). T_N, naïve; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

Para explorar mais a fundo potenciais mudanças no perfil das células Vδ1 e Vδ2 localizadas na MO e na circulação sanguínea, usamos a expressão do marcador de superfície CD69 e do receptor NKG2D (CD314) em várias combinações para rastrear subconjuntos de células T γδ potencialmente ativadas em pacientes com LLA-B (**Figura 15**).

Nossas análises mostraram que a expressão única de CD69 em células Vδ1 parece não variar entre indivíduos saudáveis e pacientes com a doença, porém, a detecção desse marcador foi significativamente menor na MO do que no SP (**Fig. 15a**). Da mesma forma, não foram observadas mudanças expressivas na presença de NKG2D entre o GC e SP, mas uma redução discreta e não significativa na MO dos pacientes. As células Vδ1 genuinamente ativadas, isto é, que expressam ambos os marcadores, exibem uma frequência basal baixa em indivíduos saudáveis. Ao avaliar sua presença nos pacientes com LLA-B, percebe-se que o percentual dessas células ativadas se manteve muito próximo ao nível basal, com uma pequena redução no SP. Além disso, células duplo-negativas foram detectadas em ambos os grupos, com uma presença maior e não significativa nos pacientes com LLA-B.

A expressão de CD69 nas células Vδ2 não foi diferente entre os pacientes e indivíduos saudáveis (**Fig. 15b**), no entanto, as células Vδ2 expressando NKG2D foram significativamente aumentadas nos pacientes com LLA-B ao diagnóstico, principalmente na MO. Ambos os marcadores foram simultaneamente detectados em uma parcela muito maior de células Vδ2 do GC, com redução significativa no SP dos pacientes. De forma distinta das células Vδ1, a frequência de células Vδ2 duplo-negativas foi menor no GC com um pequeno aumento significativo na circulação periférica dos pacientes com a doença.

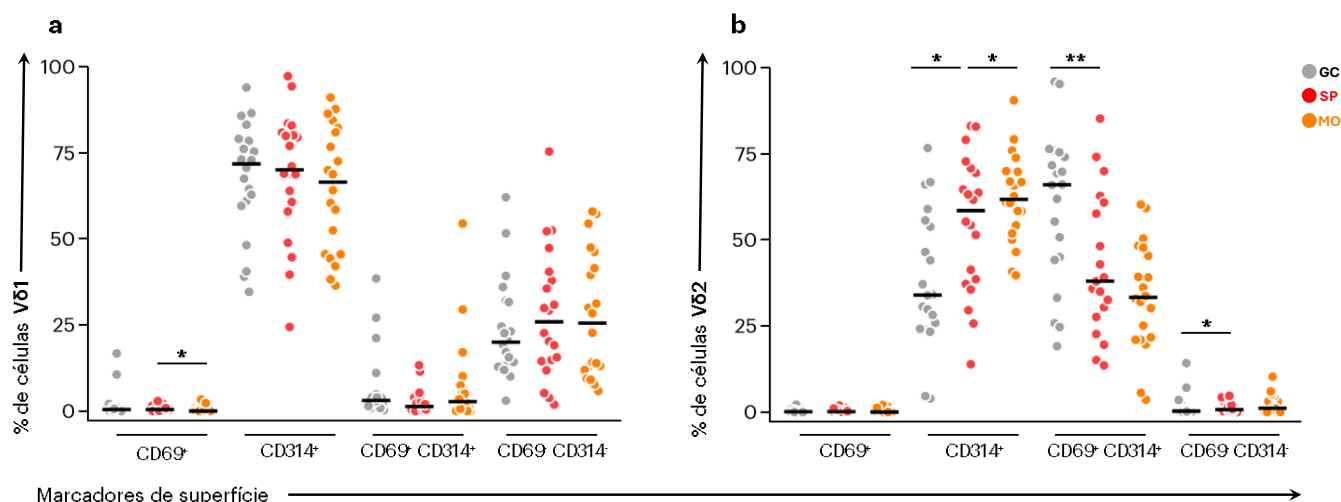


Figura 15: Análise do estado de ativação das células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico. As subpopulações de células expressando os marcadores CD69 e/ou CD314 (NKG2D) foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A avaliação imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou t de Student pareado (LLA-B, SPvsMO) e teste de Mann-Whitney ou t de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

Em seguida, realizamos uma análise da expressão diferencial dos marcadores de superfície associados a capacidade citotóxica: CD16 e CD56 (**Figura 16**). Durante a avaliação das células V δ 1 (**Fig. 16a**), observamos que esses marcadores são, no geral, raramente expressos nesse subconjunto, tanto no GC quanto nos pacientes com LLA-B no momento do diagnóstico. Isso foi reforçado não apenas pela expressão única e mínima de CD56 ou CD16, mas pela alta frequência de células duplo-negativas. Ainda assim, é importante destacar que houve um aumento pequeno, mas não significativo, na frequência de células V δ 1 CD56⁺ no SP dos pacientes em comparação com o GC. O mesmo comportamento foi observado na MO, onde essas células expressavam mais CD56, indicando que a presença de CD16 nas células V δ 1 da MO era mínima.

As células V δ 2 circulantes CD56⁺ foram significativamente mais abundantes nos pacientes do que nos indivíduos saudáveis (**Fig. 16b**). A expressão única desse marcador foi maior no SP do que na MO desses pacientes, enquanto CD16 não teve presença considerável nessas células, independentemente do compartimento. Além disso, células V δ 2 duplo-positivas foram significativamente reduzidas no SP em comparação com o GC. Essa redução foi ainda maior na MO do que no SP, embora não significativa. No geral, a presença de células duplo-

negativas foi muito semelhante ao nível basal detectado em indivíduos saudáveis, mas com uma presença significativamente maior na MO do que no SP dos pacientes com a doença.

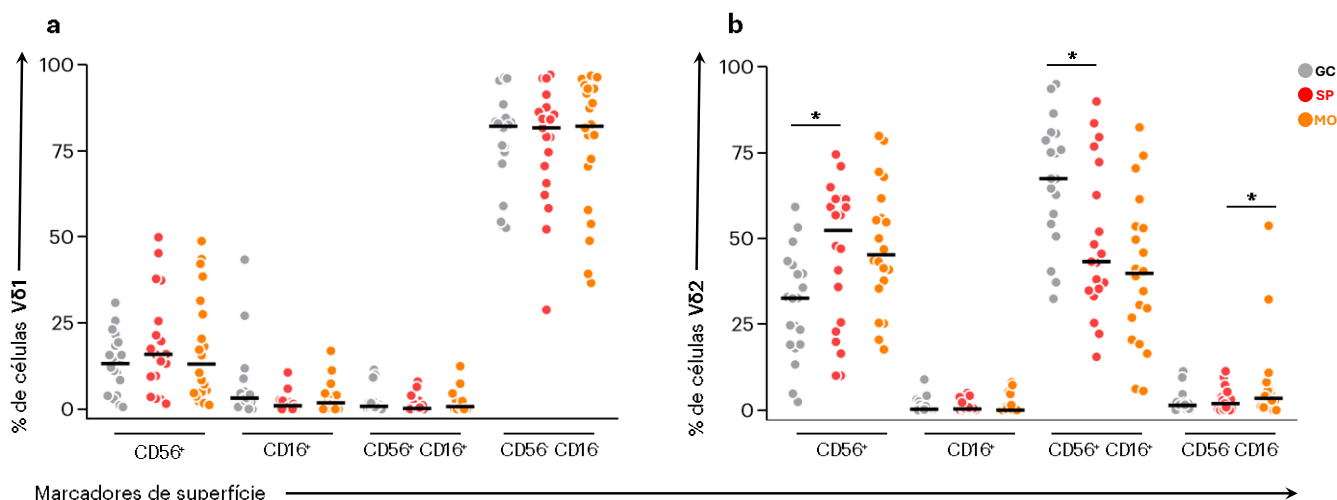


Figura 16: Expressão de marcadores associados a capacidade citotóxica em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico. As subpopulações de células expressando os marcadores CD16 e/ou CD56 foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A avaliação imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SPvsMO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Posteriormente, focamos em marcadores ligados à supressão das atividades efetoras de células T $\gamma\delta$, ou seja, *checkpoints* imunológicos que podem potencialmente inibir a ativação e citotoxicidade desse subconjunto de linfócitos T durante o desenvolvimento do tumor. A expressão de CD152 (CTLA4) e CD279 (PD1) tem sido comumente utilizada para avaliar a exaustão de células T $\alpha\beta$ em diferentes tipos de câncer (294). Aqui, também exploramos a presença diferencial desses marcadores nos subconjuntos V δ 1 e V δ 2 para determinar o seu comportamento ao diagnóstico (**Figura 17**).

Percebemos que uma porcentagem substancial de células V δ 1 não expressava os *checkpoints* imunológicos avaliados neste estudo, entretanto, foram detectadas subpopulações menores que expressavam apenas um dos marcadores, com maior frequência na MO do que no SP (**Fig. 17a**). As células V δ 1 CTLA4⁺ foram significativamente mais abundantes no GC, com redução no SP dos pacientes. O mesmo comportamento foi observado na expressão única de PD1, com menos células V δ 1 PD1⁺ na circulação periférica. Surpreendentemente, uma fração

muito pequena de células V δ 1 era duplo-positiva com percentual menor no SP dos pacientes quando comparado ao GC. Além disso, também foi detectado um percentual elevado de células duplo-negativas, com presença significativamente maior no SP do que na MO dos pacientes com a doença.

Embora não tenhamos detectado nenhuma mudança na expressão única de PD1 em células V δ 2, a presença de CTLA4 foi significativamente maior nessas células em comparação com o GC (**Fig. 17b**). A expressão desse marcador não diferiu de forma considerável entre o SP e MO dos pacientes, mas as análises indicaram uma tendência de diminuição da expressão de CTLA4 no subconjunto V δ 2 derivado da MO. Curiosamente, observamos que células duplo-positivas foram bem menos frequentes no SP dos pacientes do que nos indivíduos saudáveis com uma tendência de aumento no compartimento medular. Um percentual mínimo de células V δ 2 foram duplo-negativas, com presença maior e não significativa no SP dos pacientes.

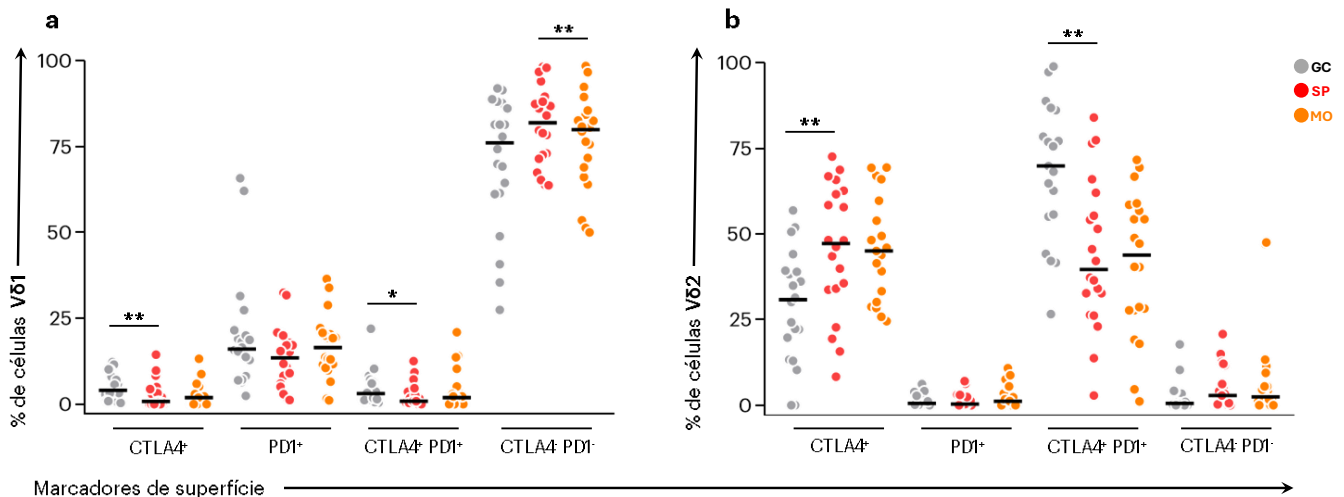


Figura 17: Expressão de checkpoints imunológicos em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico. As subpopulações de células expressando os marcadores CD152 (CTLA4) e/ou CD279 (PD1) foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A avaliação imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SP vs MO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

Finalmente, realizamos uma análise da presença de marcadores relacionados à capacidade migratória das células T $\gamma\delta$ (**Figura 18**). A expressão de receptores de quimiocina é consideravelmente modulada durante a ativação e diferenciação das células T (295,296). Nossa hipótese era a de que as células T $\gamma\delta$ responsivas ao tumor modificariam a expressão de certos receptores de *homing*, permitindo assim a sua recirculação e imunovigilância entre o sangue e o compartimento medular. Aqui, focamos na expressão diferencial de CD183 (CXCR3) e CD184 (CXCR4).

As células V δ 1 exibiram um grau considerável de heterogeneidade no comportamento de expressão de CXCR3 e CXCR4 (**Fig. 18a**). A presença única de CXCR3 nas células V δ 1 foi significativamente reduzida no SP em comparação com o GC. Em contraste, houve um aumento significativo de CXCR4 nas células V δ 1 circulantes, com presença ainda maior, mas não significativa, no compartimento medular. A frequência de células duplo-positivas foi menor nos pacientes do que nos indivíduos saudáveis, embora não tenha sido observada diferença expressiva. Além disso, o percentual de células duplo-negativas foi maior no SP dos pacientes do que no GC, com redução significativa na MO.

Com um comportamento mais homogêneo do que sua contraparte V δ 1⁺, as células V δ 2 não exibiram mudanças na expressão única de CXCR3, que se manteve mínima entre os grupos. No entanto, notamos um aumento robusto e significativo de células V δ 2 CXCR4⁺ no SP dos pacientes em comparação com o GC, com concentrações semelhantes na MO. Além disso, observou-se que os indivíduos saudáveis possuem uma fração substancial de células V δ 2 circulantes que co-expressam os dois marcadores simultaneamente. Ao compará-los com os pacientes, descobrimos que esse percentual é reduzido de forma significativa no SP, com um nível ligeiramente menor na MO. A frequência de células duplo-negativas não diferiu entre os pacientes e o GC, mantendo concentrações mínimas independentemente do compartimento.

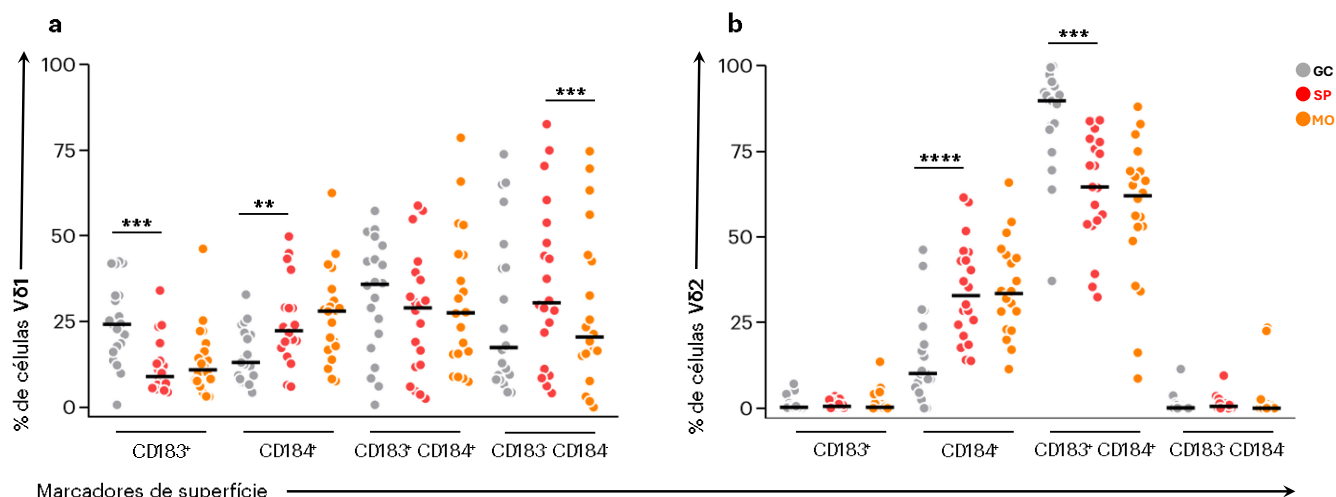


Figura 18: Expressão de receptores de quimiocina em células T $\gamma\delta$ ao diagnóstico. As subpopulações de células expressando os marcadores CD183 (CXCR3) e/ou CD184 (CXCR4) foram avaliadas no momento do diagnóstico em amostras de sangue periférico (SP, ●) e medula óssea (MO, ○) de pacientes pediátricos com LLA-B e no grupo controle (GC, ●). A avaliação imunofenotípica foi realizada por citometria de fluxo, conforme descrito na seção “Materiais e Métodos”. Os dados são mostrados em gráficos de dispersão (*scatter plot*) e relatados como mediana global expressa em porcentagem (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (LLA-B, SPvsMO) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas são destacadas por linhas de conexão e asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***) ou $p < 0.01$ (**).

5.3. Análise do perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ e mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão

Para uma compreensão mais ampliada do comportamento das células T $\gamma\delta$ e do microambiente adjacente de citocinas e quimiocinas, realizamos uma série de análises longitudinais para descrever a cinética e potenciais mudanças nas populações celulares e mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão, tanto a nível periférico quanto a nível intramedular. Conforme mostrado na **Figura 19**, o *pool* circulante de linfócitos totais, quando comparado ao D0, é significativamente elevado no D8 e é então gradualmente reestabelecido ao nível da linha de base encontrada no GC (**Fig. 19a**), indicando uma restauração de células saudáveis no sangue à medida em que o tumor regride. Da mesma forma, quando comparado ao D0, os linfócitos derivados da MO sofrem um aumento expressivo no D15 e D35, e em seguida declinam a um nível mais baixo no D84 (**Fig. 19b**), porém, mantendo um percentual aparentemente normalizado dentro do compartimento medular [entre 10 e 15% das células da MO (490)].

Ao analisar a presença das células T totais, descobrimos que esses linfócitos são significativamente reduzidos em faixas de tempo específicas da fase de indução (D8 e D15).

Na circulação sanguínea, essas células decaem drasticamente em comparação com o GC e com o D0, enquanto na MO essa redução é detectada ao D15 em comparação com o D0. Surpreendentemente, descobrimos que essas células T são enriquecidas numericamente tanto no sangue quanto na MO a partir do D35, indicando que elas expandem nos pacientes conforme a densidade do tumor é reduzida.

As células T $\gamma\delta$ exibiram um comportamento distinto entre as suas subpopulações. Enquanto o subconjunto V δ 1, em comparação com o D0, esteve significativamente reduzido no SP durante a fase de indução (D8, D15 e D35), o mesmo subtipo retornou a um nível próximo da linha de base do GC no D84. O mesmo fenômeno foi observado na MO, com redução significativa de células V δ 1 ao D15 e D35, e uma tendência de recuperação no D84. Curiosamente, o percentual do subconjunto V δ 2 exibiu um aumento gradual ao longo do tempo, mas reduziu drasticamente no D35 quando comparado ao D0 e GC. Descobrimos que após esta redução no D35, as células V δ 2 expandiram de forma considerável no SP em comparação com o GC e D0. O mesmo comportamento foi detectado na MO, com redução ao D35 e uma tendência de recuperação no D84.

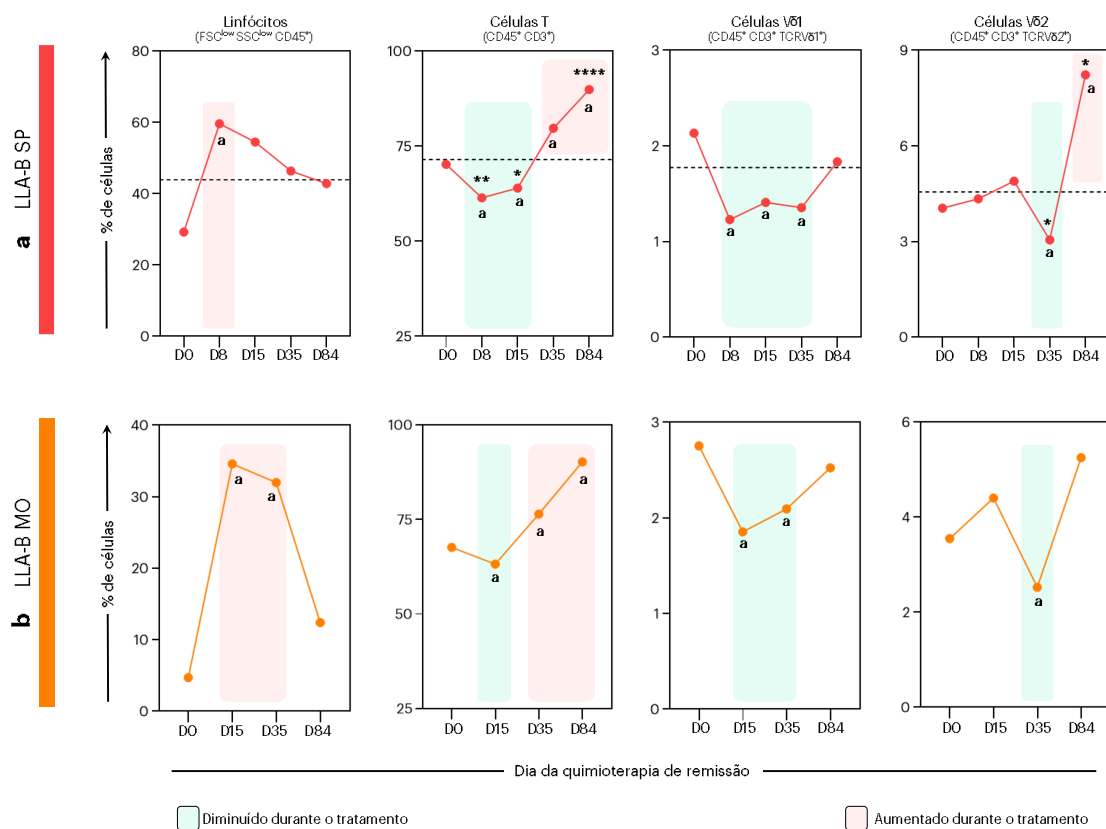


Figura 19: Cinética das células T $\gamma\delta$ durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento das células foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como

mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

A seguir, exploramos a cinética dos mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão, conforme mostrado na **Figura 20**. No geral, nossos dados demonstraram um perfil de citocinas e quimiocinas complexo e dinâmico ao longo do tempo, com redução de IFN γ , IL-2, IL-10, CCL4, CCL5 e CXCL10 na circulação sanguínea dos pacientes (**Fig. 20a**). Em contraste, detectamos maior presença de TNF, IL-7, IL-12, IL-15, IL-17, CCL2, CCL3 e CXCL8. No compartimento medular, observamos um aumento de IFN γ , IL-7, IL-17 e CCL5 ao longo do tratamento quimioterápico (**Fig. 20b**). Em contraste, detectamos concentrações reduzidas de TNF, IL-2, IL-10, CCL2, CCL3, CCL4, CXCL8 e CXCL10, enquanto nenhuma mudança significativa foi observada nas concentrações de IL-12 e IL-15.

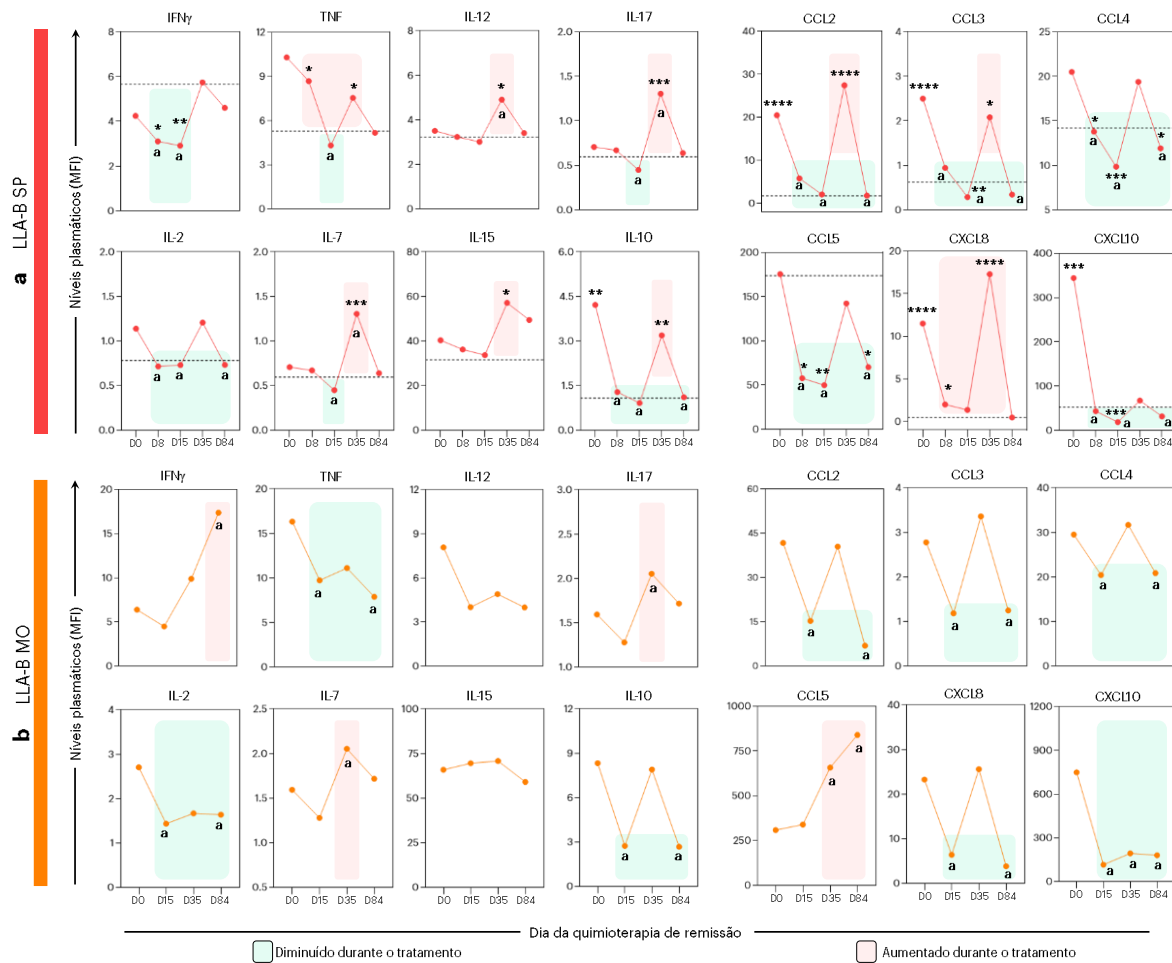


Figura 20: Cinética dos mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão. As citocinas e quimiocinas foram quantificadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de plasma de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de plasma de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de cada analito foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são relatados em escala linear, mostrando a média com erro padrão (*mean with SEM*) da intensidade média de fluorescência (MFI). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

Para refinar ainda mais a caracterização dos subconjuntos de células T $\gamma\delta$ nos pacientes pediátricos com LLA-B, focamos em explorar a cinética dos marcadores fenotípicos e funcionais ao longo da quimioterapia de remissão. Primeiro, caracterizamos a dinâmica de expressão de CD69 e NKG2D em células V δ 1 (**Figura 21**).

No geral, ao analisar a circulação periférica dos pacientes (**Fig. 21a**), observamos que a expressão única de CD69 é mínima (<1%) e não sofre mudanças consideráveis ao longo do

tempo neste subconjunto em comparação com o GC. Da mesma forma, a presença individual de NKG2D se mantém estável em uma fração substancial de células V δ 1 (~70%), com redução não significativa ao D8. As células duplo-positivas permaneceram significativamente reduzidas, tanto no D0 quanto no D84, e representaram um percentual muito pequeno das células V δ 1 (1 a 3%). Além disso, percebemos que essa subpopulação sofreu um aumento não significativo no D8 e no D15 e, em seguida, retornou a um nível semelhante ao do diagnóstico. As células duplo-negativas foram a segunda subpopulação mais observada no SP dos pacientes (20 a 30%), porém, não mostrou mudanças consideráveis durante o tratamento.

No compartimento medular (**Fig. 21b**), descobrimos que as células V δ 1 exibem comportamento muito semelhante ao das células circulantes, com expressão mínima de CD69 (<1%), porém, mostrando um pequeno aumento, mas significativo, no D35. Da mesma forma, as células expressando apenas NKG2D foram predominantes nesse compartimento (~70%), sem mudanças significativas ao longo do tempo. As células duplo-positivas foram mais abundantes na MO (3 a 9%) e não mostraram diferenças consideráveis, embora tenham exibido uma frequência crescente, mas não significativa, no D15 e D35. Além disso, as células duplo-negativas também foram a segunda população mais presente na MO dos pacientes (10 a 30%). No entanto, foi observado apenas uma redução não significativa ao D35 e posterior retorno a um nível semelhante ao do diagnóstico.

As análises de cinética dos marcadores de citotoxicidade (**Figura 22**) revelaram que as células V δ 1 expressando CD16 se mantiveram significativamente reduzidas na circulação sanguínea dos pacientes (**Fig. 22a**), representando um percentual pequeno durante a quimioterapia (~1%). Curiosamente, a presença de células V δ 1 co-expressando os marcadores foi ainda menor no SP (<0.9%), sem nenhuma mudança significativa ao longo do tempo. Além disso, a maioria das células V δ 1 circulantes era duplo-negativa (cerca de 80%) e esse perfil foi mantido durante todo o tratamento sem alterações consideráveis. Também descobrimos que as células V δ 1 circulantes mantinham uma expressão conservada de CD56 (~15%) que diminuía gradualmente ao longo do tempo, no entanto, não foram observadas diferenças significativas em comparação com o GC.

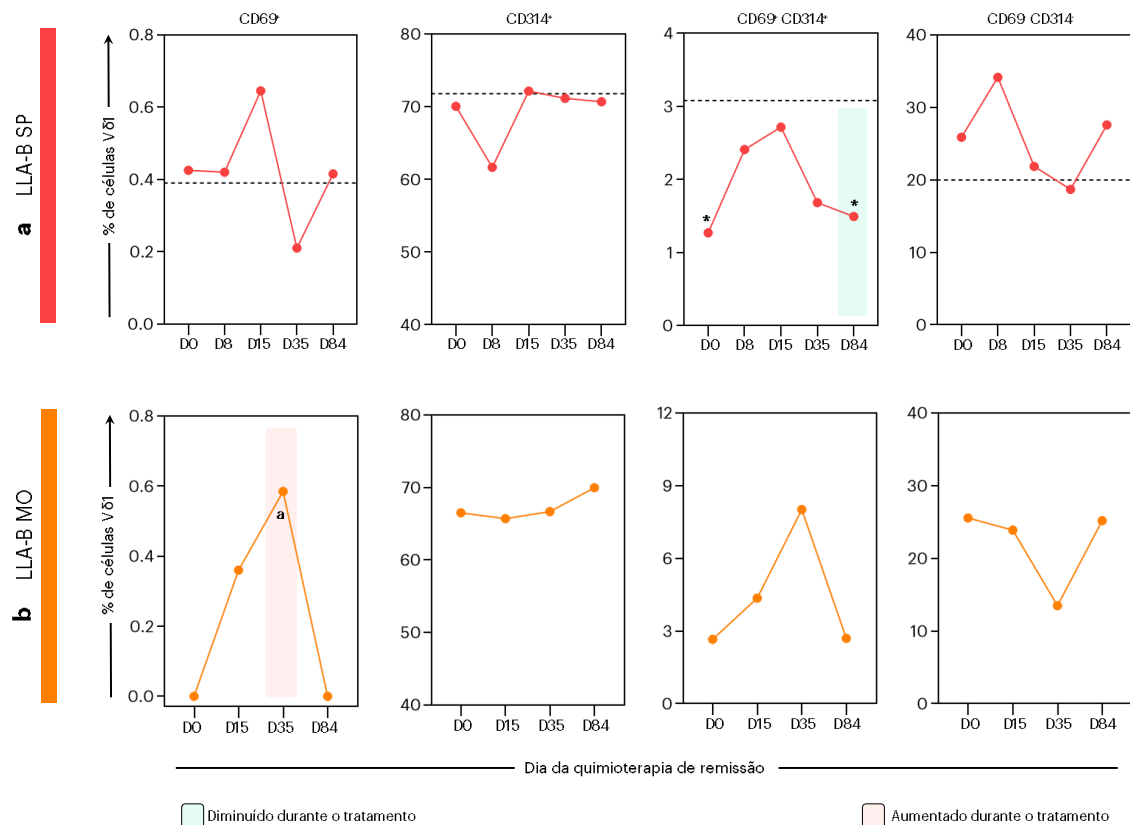


Figura 21: Cinética dos marcadores de ativação em células Vδ1 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou t de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou t de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Na MO (**Fig. 22b**), as células Vδ1 CD16⁺ não exibiram alterações significativas, apesar de uma tendência de diminuição observada ao D84. A expressão única de CD56 foi aparentemente maior na MO e mostrou uma tendência de aumento no D15 com subsequente diminuição a partir do D35. Em contraste, as células duplo-positivas exibiram uma tendência de aumento no D35 com subsequente diminuição ao D84. Diferentemente do comportamento observado no SP, as células Vδ1 duplo-negativas da MO exibiram uma queda significativa no D35 e em seguida exibem uma tendência de recuperação no D84.

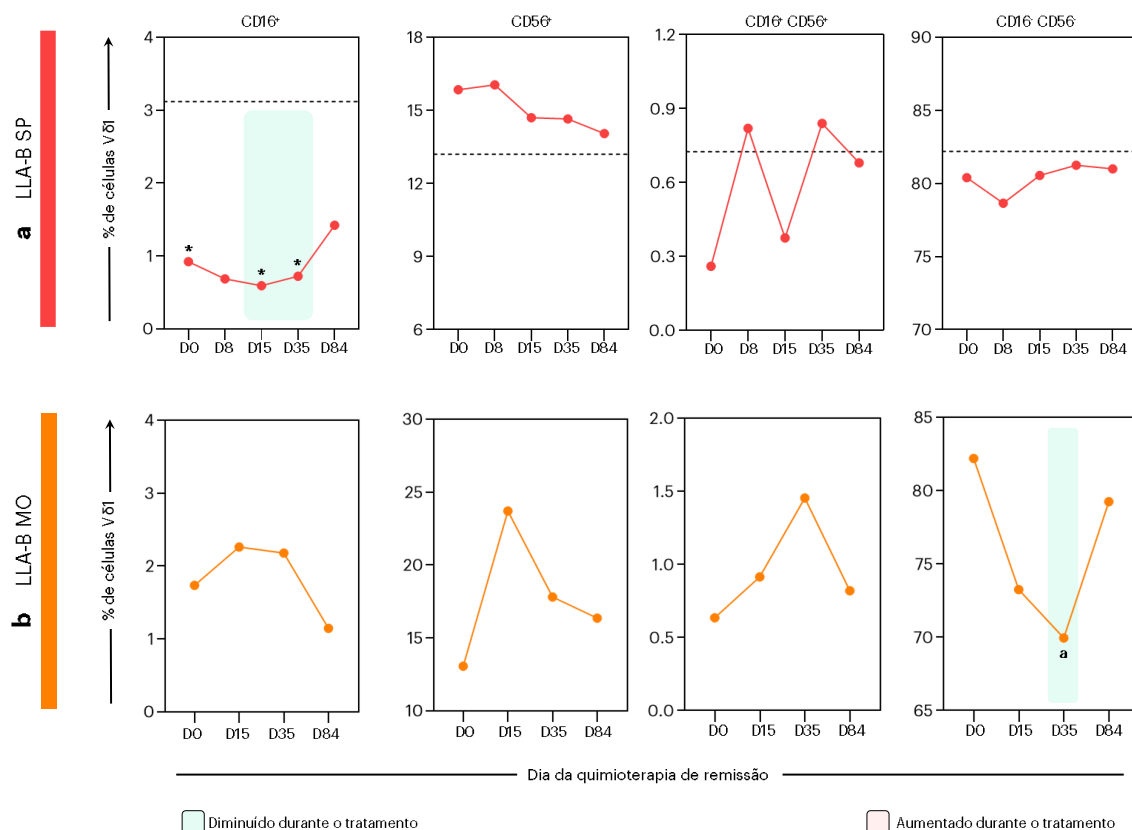


Figura 22: Cinética dos marcadores associados a capacidade citotóxica em células Vδ1 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Um achado interessante do nosso estudo foi que, no geral, as células Vδ1 de pacientes pediátricos com LLA-B exibem pouca ou nenhuma expressão de *checkpoints* imunológicos durante todo o tratamento quimioterápico (**Figura 23**). Na circulação sanguínea, descobrimos que esse subconjunto exibe uma redução significativa de CTLA4 no D15 e D84, precedida por um pico de expressão desse marcador no D8 (**Fig. 23a**). Da mesma forma, a expressão de PD1 foi reduzida ao longo do tempo, mantendo-se consideravelmente menor no D35 e D84. As células duplo-positivas representaram um percentual pequeno de células Vδ1 circulantes (menos de 2%) e se mantiveram reduzidas no D15, D35 e D84. De fato, essa dinâmica observada foi ainda mais reforçada pela alta detecção de células duplo-negativas (mais de 70%),

que aumentaram de forma considerável no SP após o D35.

As células V δ 1 localizadas no compartimento medular exibiram uma dinâmica semelhante ao da sua contraparte circulante (**Fig. 23b**). A presença individual de CTLA4 foi pequena nessas células, apesar de haver um pico de expressão significativa no D15. Além disso, a presença de PD1 não mostrou mudanças consideráveis ao longo do tempo, embora tenha exibido uma tendência de diminuição no D35. As células duplo-positivas também foram menos frequentes e exibiram uma tendência de redução após o D35. Em contraste, as células duplo-negativas predominaram na MO (mais de 70%) e exibiram uma tendência de diminuição após o D0, com posterior recuperação no D35 e no D84.

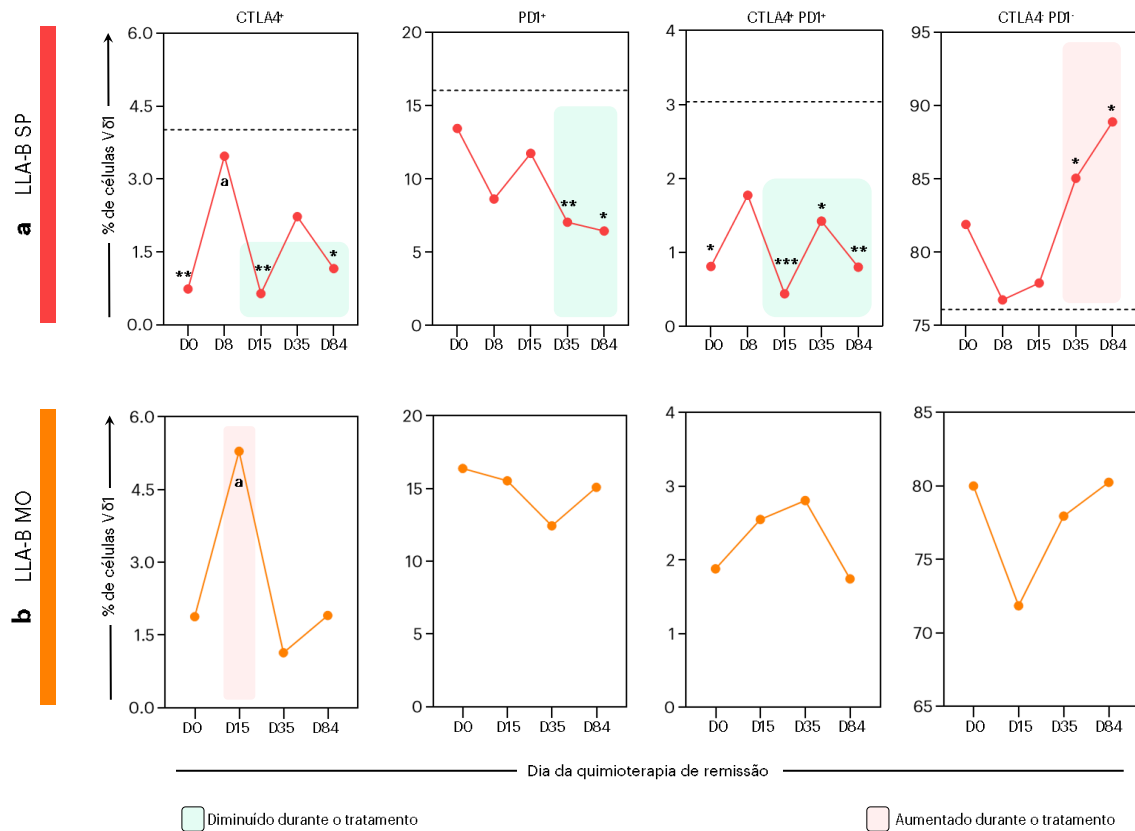


Figura 23: Cinética dos checkpoints imunológicos em células V δ 1 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

A caracterização da cinética dos receptores de *homing* em células V δ 1 é demonstrada na **Figura 24**. No sangue, descobrimos que esse subconjunto reduz significativamente a expressão de CXCR3 durante o desenvolvimento do tumor enquanto aumenta, de forma considerável, a expressão de CXCR4 (**Fig. 24a**). Este fenômeno foi observado ao longo de todo o tratamento, onde a presença de CXCR3 se manteve diminuída e constante até o D84, e a expressão de CXCR4 atingiu o pico no D15, com posterior queda após o D35. Além disso, observamos que as células duplo-positivas são significativamente aumentadas no D8 e reduzem de forma brusca no D84. Em contraste, as células duplo-negativas são reduzidas ao D8 e D35 e aumentam consideravelmente no D84.

No compartimento medular (**Fig. 24b**), observamos percentual crescente de células V δ 1 expressando CXCR3 após o D15. Em contraste, as células CXCR4⁺ são reduzidas ao longo do tratamento, atingindo menor nível no D84. Esse fenômeno também foi observado em células duplo-positivas, que mostraram uma tendência de aumento no D15 e, em seguida, reduziram bruscamente no D84. Dessa forma, a maioria das células V δ 1 dentro da MO não expressavam nenhum dos marcadores ao D84, atingindo então um aumento significativo ao final do tratamento quimioterápico.

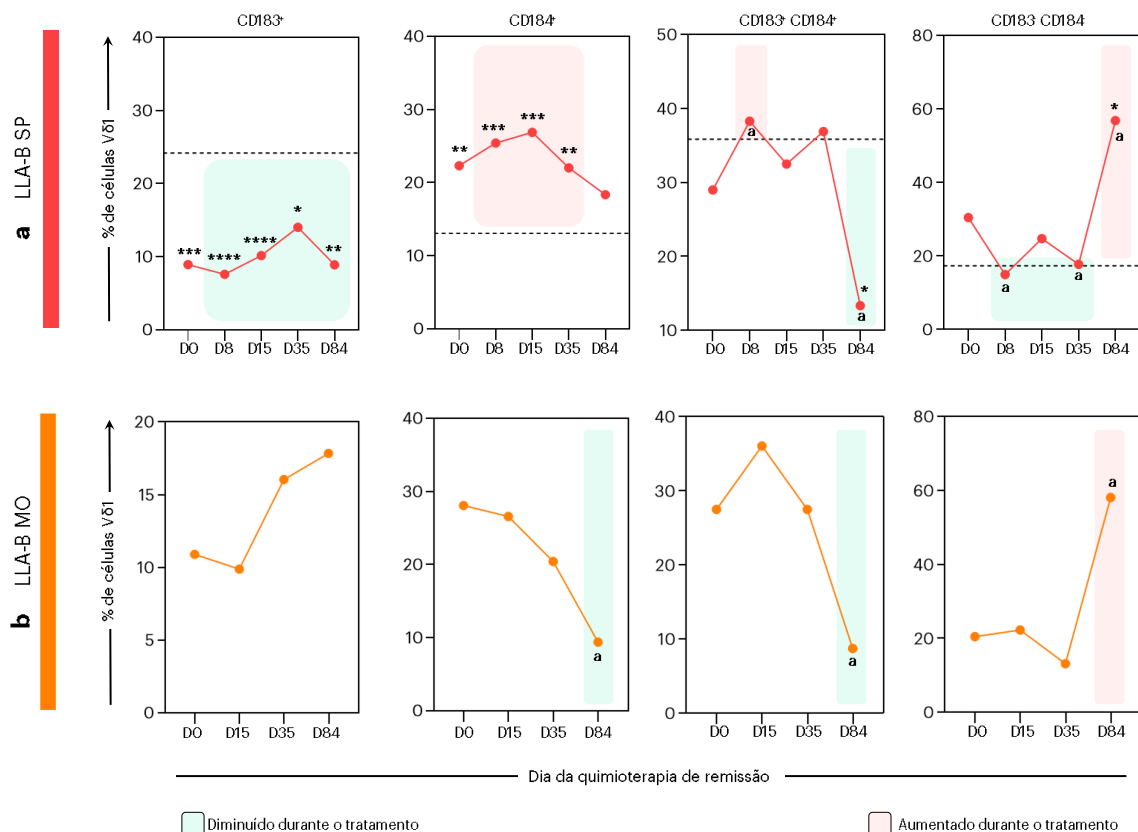


Figura 24: Cinética dos receptores de quimiocina em células V δ 1 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao

D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

As análises do estado de diferenciação das células V δ 1 são mostradas na **Figura 25**. Descobrimos que esse subconjunto mantém uma dualidade fenotípica restrita a um perfil *naive* ou T_{EMRA}. Em outras palavras, percebemos que um percentual muito baixo de células V δ 1 era de T_{CM} ou T_{EM}, semelhante ao perfil encontrado no GC. Na circulação periférica (**Fig. 25a**), as células V δ 1 *naive* apresentaram ao D15 uma diminuição pequena, mas significativa, seguida de um aumento no D35 com posterior tendência de diminuição no D84. Os subconjuntos T_{CM} e T_{EM} constituíram menos de 1% das células V δ 1, com mais células T_{CM} no D15 e D35, e redução significativa de células T_{EM} no D8. As células T_{EMRA} mantiveram uma frequência crescente no SP até o D15 e, em seguida, diminuíram no D35 e se recuperaram no D84.

As células V δ 1 derivadas da MO exibiram um comportamento distinto (**Fig. 25b**). As células *naive* tiveram uma frequência crescente a partir do D0, atingindo um aumento significativo no D35 e uma subsequente tendência de redução no D84. Além disso, o subconjunto T_{CM} foi menos frequente, exibindo números significativamente menores no D15 e D35 em comparação com o D0, e tendência de aumento no D84. Da mesma forma, as células T_{EM} também apresentaram redução no D15, mas uma tendência de aumento no D35 e no D84. A frequência das células T_{EMRA} também mostrou ser significativamente reduzida no D35 com uma tendência de recuperação no D84.

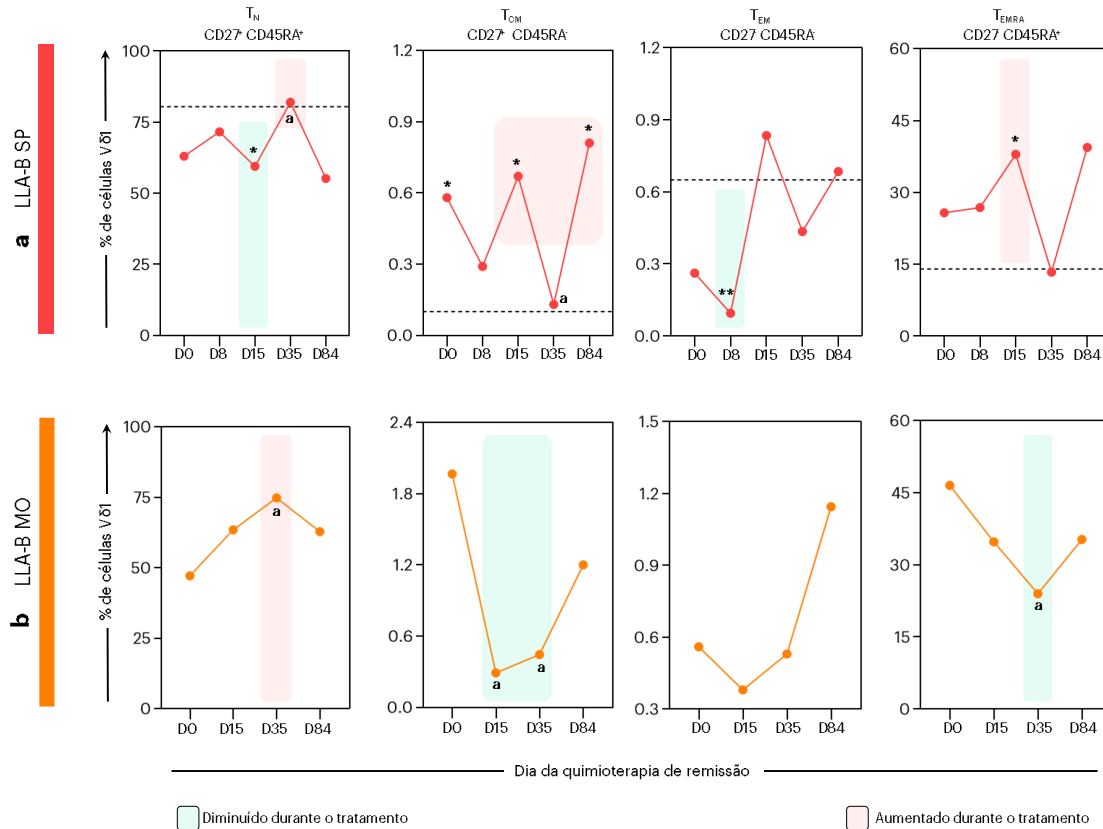


Figura 25: Cinética de diferenciação das células Vδ1 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*). T_N, naive; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

Em seguida, exploramos a cinética dos marcadores fenotípicos e funcionais nas células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão. Inicialmente, analisamos a dinâmica de expressão de CD69 e NKG2D (**Figura 26**). Descobrimos que, de forma semelhante ao subconjunto Vδ1, as células Vδ2 circulantes também possuem uma expressão única de CD69 muito baixa, com um aumento significativo no D84 (**Fig. 26a**). Além disso, a expressão de NKG2D nessas células diminuiu ao longo do tratamento atingindo menor nível no D84, embora ainda assim tenha se mantido elevada no D15. Surpreendentemente, observamos que ao contrário do subconjunto Vδ1, que possui um fenótipo duplo-negativo predominante, as células Vδ2 do SP expressavam

simultaneamente os dois marcadores, com um percentual muito pequeno de células duplo-negativas. Apesar disso, a frequência de células V δ 2 duplo-positivas foi significativamente menor no SP dos pacientes do que no GC, principalmente no D0 e no D8.

Na MO dos pacientes (**Fig. 26b**), observamos um aumento progressivo de células V δ 2 CD69⁺, que ainda assim representaram um percentual mínimo desse subconjunto (menos de 0.5%). Em contraste, as células V δ 2 expressando NKG2D reduziram significativamente ao longo do tempo, atingindo menor nível no D35. Essa diminuição foi sucedida por um aumento nas porcentagens de células V δ 2 que expressavam ambos os marcadores no D35 e D84. As células duplo-negativas mostraram redução a partir do D0, atingindo menor frequência no D35.

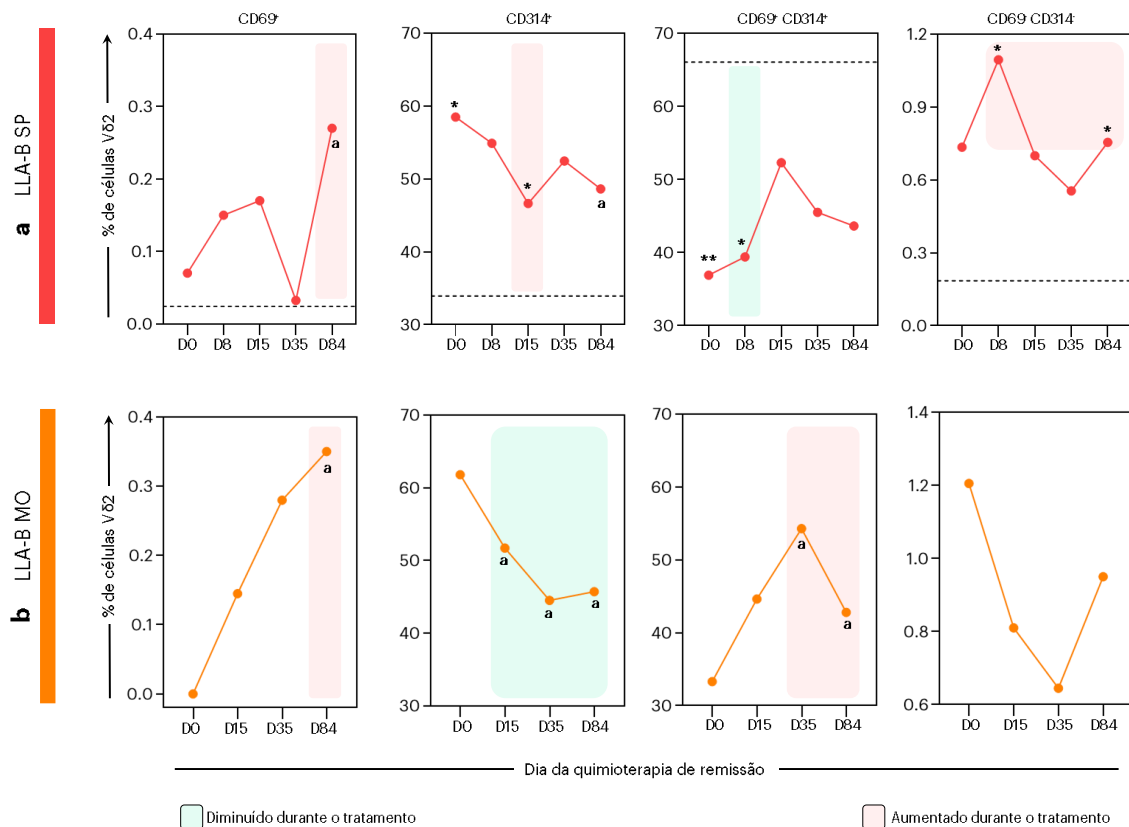


Figura 26: Cinética dos marcadores de ativação em células V δ 2 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (---). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

A análise da cinética dos marcadores associados a citotoxicidade CD16 e CD56 em células V δ 2 é mostrada na **Figura 27**. A expressão de CD16 em células V δ 2 circulantes apresentou um aumento significativo no D84 (**Fig. 27a**). Além disso, a presença de células CD56⁺ não mostrou alterações significativas após o D0, mas se manteve elevada em comparação com o GC. As células duplo-positivas estiveram diminuídas ao longo do tempo, atingindo diminuição significativa no D84, mas também representavam grande parte das células V δ 2. Em contraste um percentual pequeno de células duplo-negativas foi detectado, sem nenhuma alteração significativa durante o tratamento.

No compartimento medular (**Fig. 27b**), as células V δ 2 CD16⁺ exibiram o mesmo comportamento, com presença elevada no D84, mas ainda assim constituindo um percentual pequeno desses linfócitos (<1%). Em contraste, as células V δ 2 diminuíram a expressão única de CD56 ao longo do tempo, atingindo menor nível no D84. As células duplo-positivas estiveram significativamente aumentadas no D35, em comparação com o D0, enquanto as células duplo-negativas não apresentaram mudanças consideráveis durante o tratamento, apesar de uma redução no D15 e posterior aumento no D35.

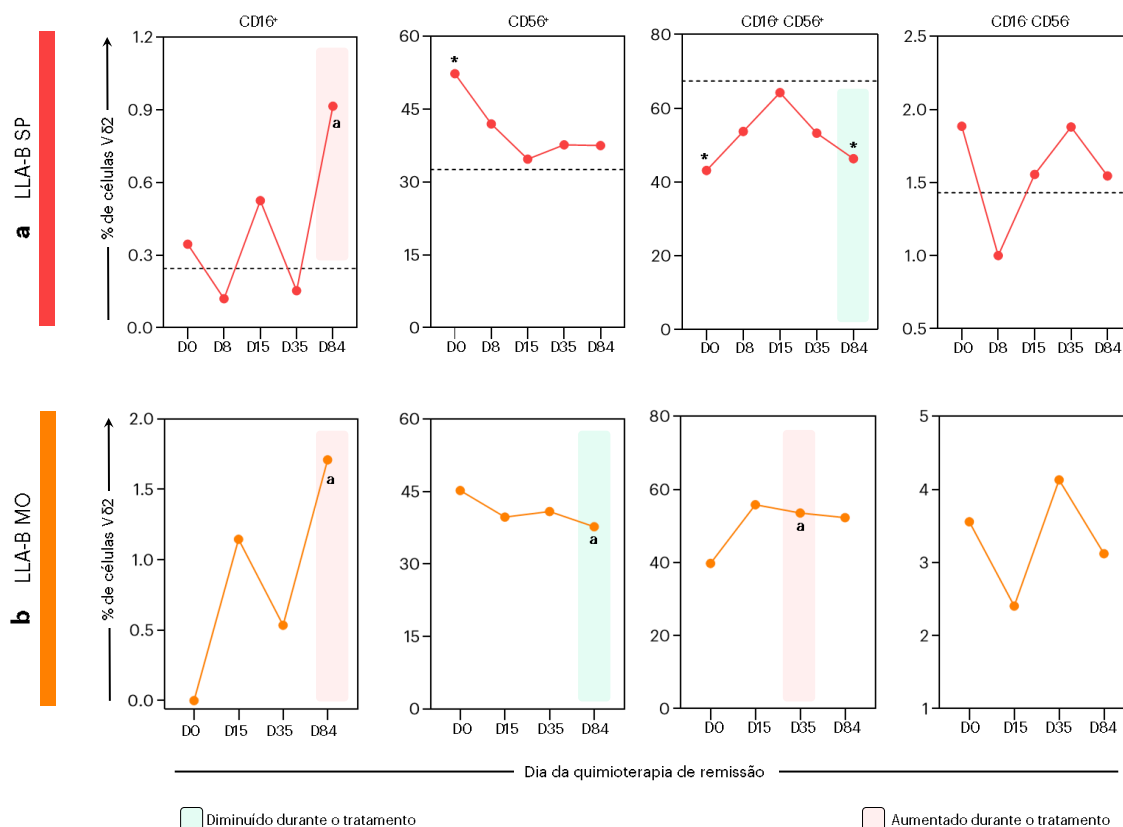


Figura 27: Cinética dos marcadores associados a capacidade citotóxica em células V δ 2 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras

de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A caracterização da cinética de expressão dos *checkpoints* imunológicos em células Vδ2 é mostrada na **Figura 28**. As células Vδ2 circulantes mantiveram um nível de expressão relativamente aumentado de CTLA4 em comparação com o GC, mas significativamente reduzido quando comparado ao D0 (**Fig. 28a**). Após o D15, as células Vδ2 regularam positivamente a expressão de PD1, atingindo o maior percentual no D84. Em contraste, as células duplo-positivas permaneceram significativamente reduzidas no D84 em comparação com o GC, enquanto as células duplo-negativas aumentaram significativamente após o D8.

A presença de células CTLA4⁺ na MO mostrou redução significativa no D35 e a expressão de PD1 aumentou ao longo do tempo, mas sem mudanças consideráveis (**Fig. 28b**). As células duplo-positivas mostraram uma tendência de aumento após o D0, atingindo maior nível no D35, e em seguida, diminuem no D84. Além disso, as células duplo-negativas exibiram uma tendência de aumento após o D15, atingindo frequência maior, mas não significativa, ao final da quimioterapia.

A caracterização da cinética dos receptores de *homing* em células Vδ2 é demonstrada na **Figura 29**. No sangue, descobrimos que esse subconjunto mantém elevada a expressão de CXCR4 durante o desenvolvimento do tumor, sugerindo que as células Vδ2 são recrutadas para a MO (**Fig. 29a**). Este fenômeno foi observado ao longo de todo o tratamento, onde a presença de CXCR4 se manteve elevada no D8, D15 e D35, e a expressão de CXCR3 aumentou consideravelmente no D84. Curiosamente, as células duplo-positivas foram significativamente reduzidas ao longo de toda a quimioterapia, atingindo menor nível no D84. Em contraste, as células duplo-negativas aumentaram consideravelmente no D84.

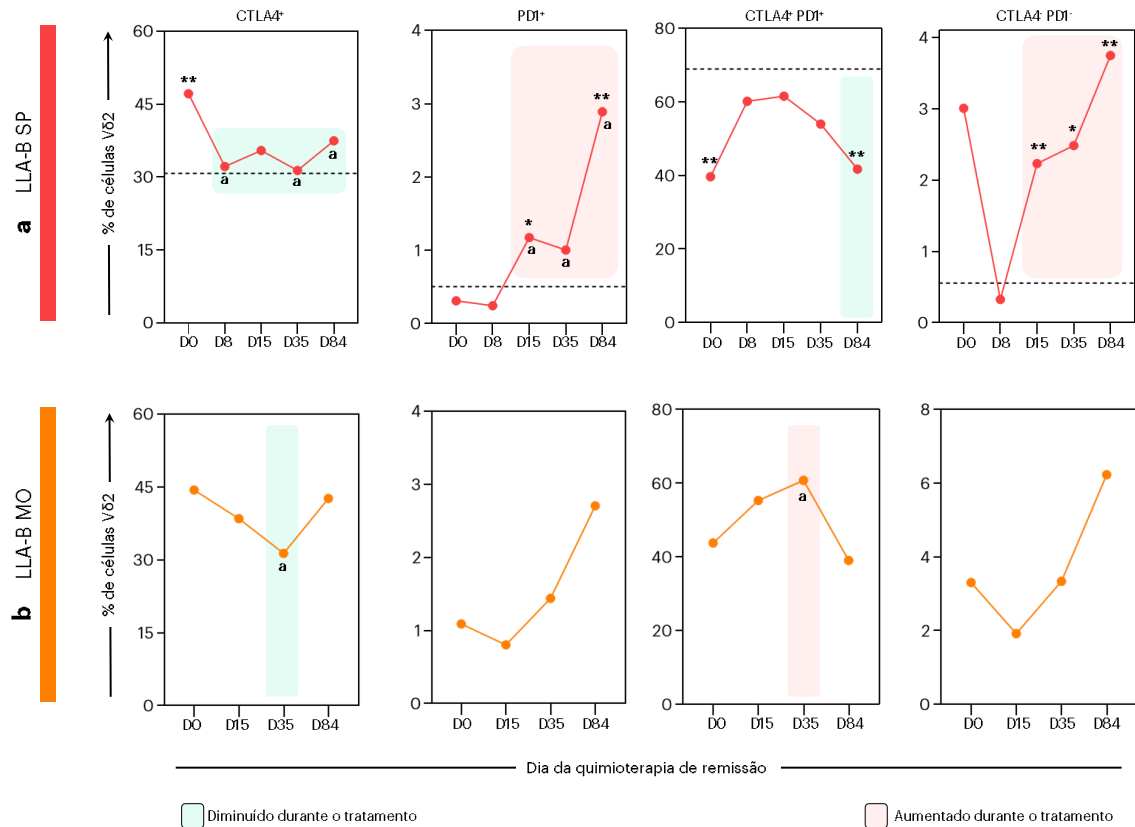


Figura 28: Cinética dos *checkpoints* imunológicos em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

No compartimento medular (**Fig. 29b**), observamos uma presença crescente de células Vδ2 expressando CXCR3 após o D35. Em contraste, as células CXCR4⁺ foram reduzidas ao longo do tratamento, atingindo menor nível no D84. Esse fenômeno também foi observado em células duplo-positivas, que mostraram uma tendência de aumento no D15 e, em seguida, reduziram após o D35. As células duplo-negativas apresentaram uma tendência de aumento a partir do D35 e aumentaram consideravelmente no D84.

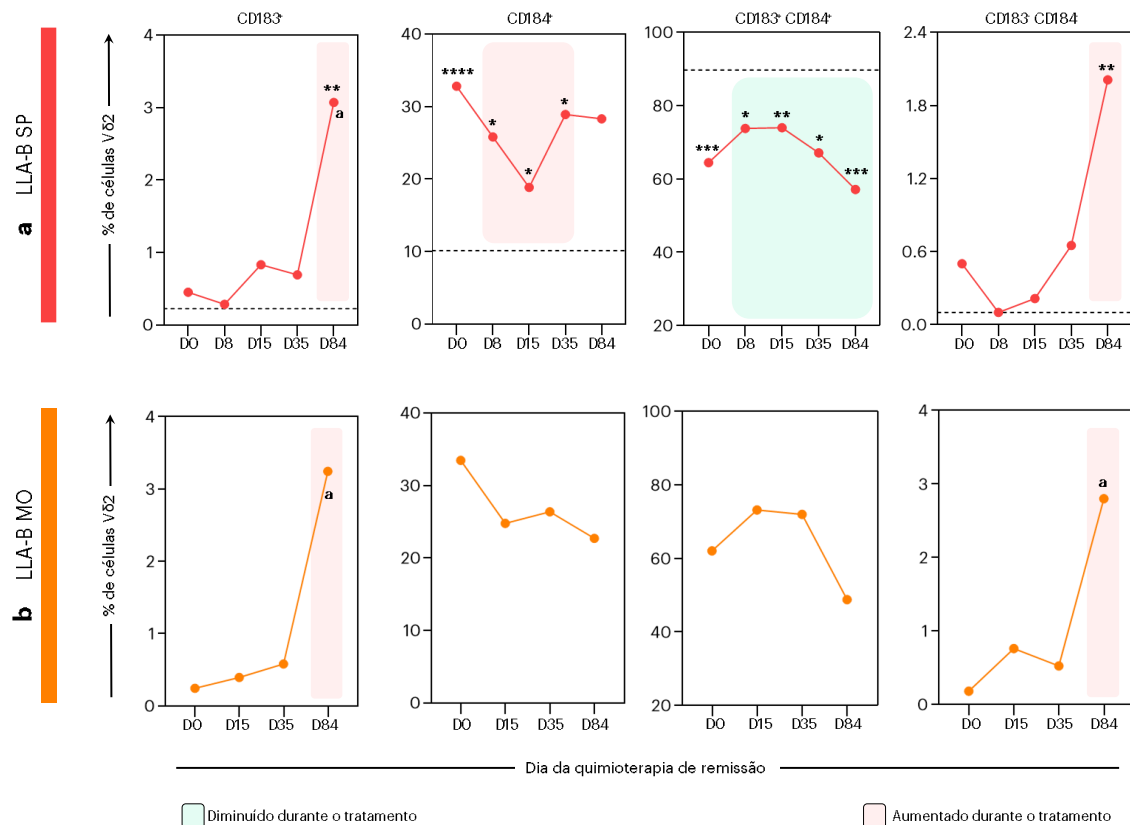


Figura 29: Cinética dos receptores de quimiocina em células Vδ2 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GC vs LLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são destacadas por asteriscos quando $p < 0.0001$ (****), $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

As análises do estado de diferenciação das células Vδ2 são mostradas na **Figura 30**. Esse subconjunto também manteve uma dualidade fenotípica direcionada a um perfil *naive* ou terminalmente diferenciado, com presença mínima ou ausente de células T_{CM} ou T_{EM}, semelhante ao perfil encontrado no GC. Na circulação periférica (**Fig. 30a**), as células Vδ2 *naive* apresentaram no D8 e D35 um aumento significativo. Os subconjuntos T_{CM} e T_{EM} eram praticamente ausentes no GC e constituíram menos de 0.2% das células Vδ2 circulantes, com mais células T_{CM} no D8 e D84, e células T_{EM} no D15. Também observamos que as células T_{EMRA} mantiveram uma frequência significativamente menor no SP ao longo da quimioterapia e atingiram menor percentual no D84.

As células V δ 2 derivadas da MO exibiram um comportamento distinto, com predominância significativa de células *naive* (**Fig. 30b**). Esse subconjunto *naive* atingiu um aumento significativo no D35 e uma subsequente tendência de redução no D84. Semelhante as células V δ 1, também foram detectados um percentual pequeno de células T_{CM} e T_{EM}. As células V δ 2 T_{CM} representaram menos de 0.6% ao diagnóstico e foram praticamente ausentes no D35. Da mesma forma, as células T_{EM} também foram ausentes durante a quimioterapia e foram detectadas apenas no D0 e D84, compondo menos de 0.1% das células V δ 2 da MO. A frequência das células T_{EMRA} também mostrou ser significativamente reduzida ao longo do tempo com uma presença significativamente menor no D35.

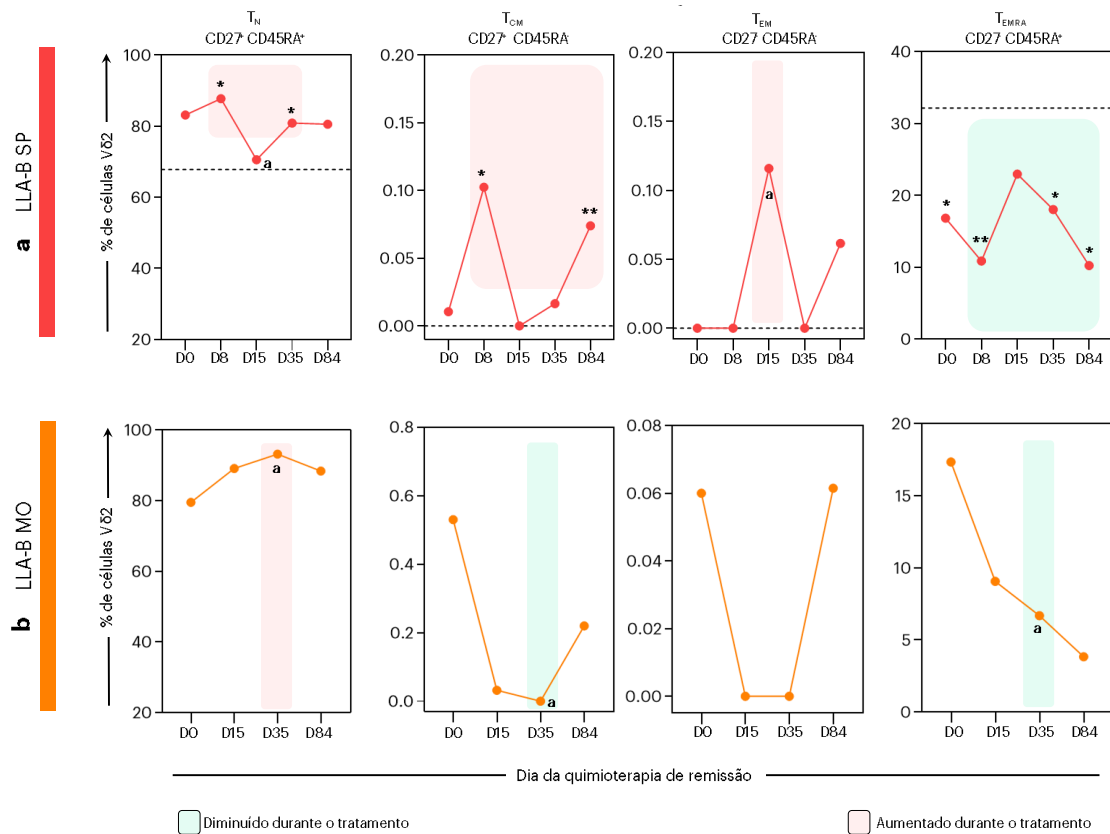


Figura 30: Cinética de diferenciação das células V δ 2 durante a quimioterapia de remissão. As populações celulares foram avaliadas ao D0, D8, D15, D35 e D84 em amostras de sangue periférico (SP, ●), ao D0, D15, D35 e D84 em amostras de medula óssea (MO, ●) de pacientes pediátricos com LLA-B e em tempo único no grupo controle. O comportamento de expressão dos marcadores foi destacado usando cores na área de plotagem. Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem (%). O GC é mostrado pela linha tracejada (----). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste de Wilcoxon ou *t* de Student pareado (comparações entre D0, D8, D15, D35 e D84) e teste de Mann-Whitney ou *t* de Student não-pareado (GCvsLLA-B SP). Diferenças significativas entre os dias da quimioterapia de remissão são representadas por letra (a), que se refere a comparações com o D0, enquanto as diferenças em relação ao GC são

destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*). T_N, naive; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

5.4. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a carga tumoral ao diagnóstico

Com o objetivo de caracterizar um possível impacto das células T $\gamma\delta$ e seu perfil fenotípico-funcional no prognóstico clínico de pacientes pediátricos com LLA-B, foi realizada uma análise transversal dos pacientes do estudo de acordo com o quantitativo de blastos encontrados no SP e MO ao diagnóstico. Estes foram então categorizados em: Baixa Carga Leucêmica (bCL, $\leq 50\%$ de blastos) e Alta Carga Leucêmica (aCL, $> 50\%$ de blastos).

Inicialmente, não foram observadas alterações significativas entre os subgrupos bCL e aCL, independentemente do compartimento ou subconjunto de células T $\gamma\delta$ (**Figura 31**). Apesar disso, os resultados sugerem que os pacientes com baixa carga tumoral (subgrupo bCL) apresentam menores números de células V δ 1 circulantes quando comparados aos pacientes com carga tumoral mais alta (subgrupo aCL). Por outro lado, o subgrupo aCL apresentou menores percentuais de células V δ 2 circulantes quando comparado ao bCL (**Fig. 31a**). Na MO, embora não haja diferença considerável no que diz respeito a frequência do subconjunto V δ 2, o subgrupo bCL apresentou um nível ligeiramente maior de células V δ 1 (**Fig. 31b**).

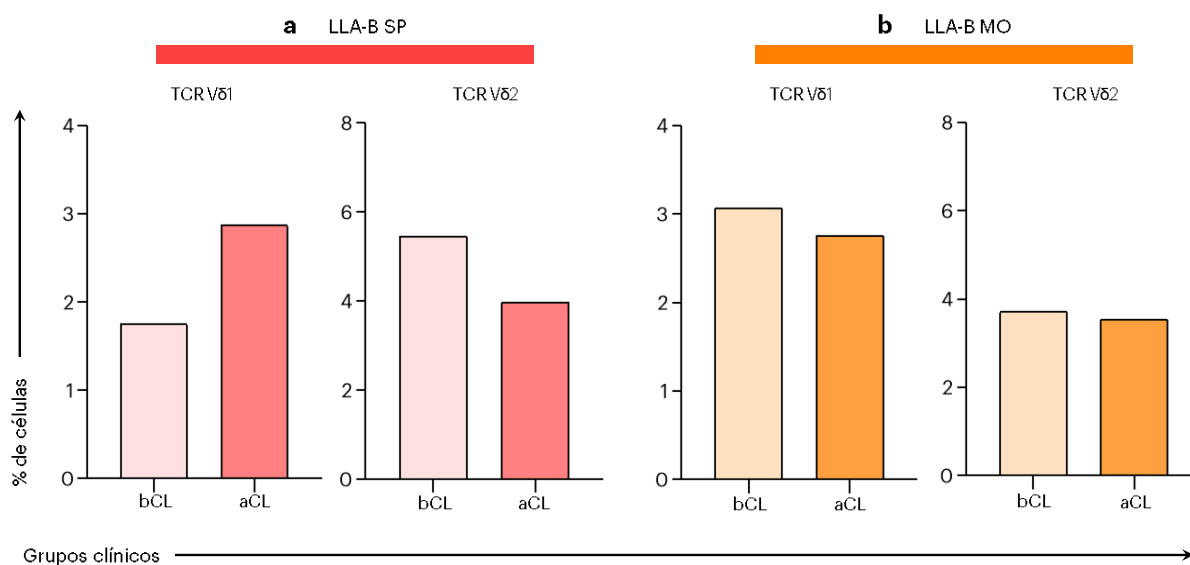


Figura 31: Frequência de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células expressando o TCR V δ 1 ou V δ 2 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga

leucêmica, >50%). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

O perfil de ativação das células V δ 1 também foi caracterizado em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com o quantitativo de blastos no momento do diagnóstico (bCL e aCL) e os dados são apresentados na **Figura 32**. Embora não tenha sido detectado diferenças significativas entre os subgrupos no SP, os resultados sugerem que a presença de células V δ 1 circulantes expressando mais CD69, NKG2D ou os dois marcadores simultaneamente, é uma característica possivelmente ligada a uma baixa carga tumoral. Em nosso estudo, essa ideia foi ainda mais reforçada pela maior detecção de células duplo-negativas no SP do subgrupo aCL (**Fig. 32a**). Da mesma forma, células V δ 1 expressando significativamente mais NKG2D e uma presença menor de células duplo-negativas foram observadas na MO daqueles pacientes onde a carga tumoral foi baixa (**Fig. 32b**).

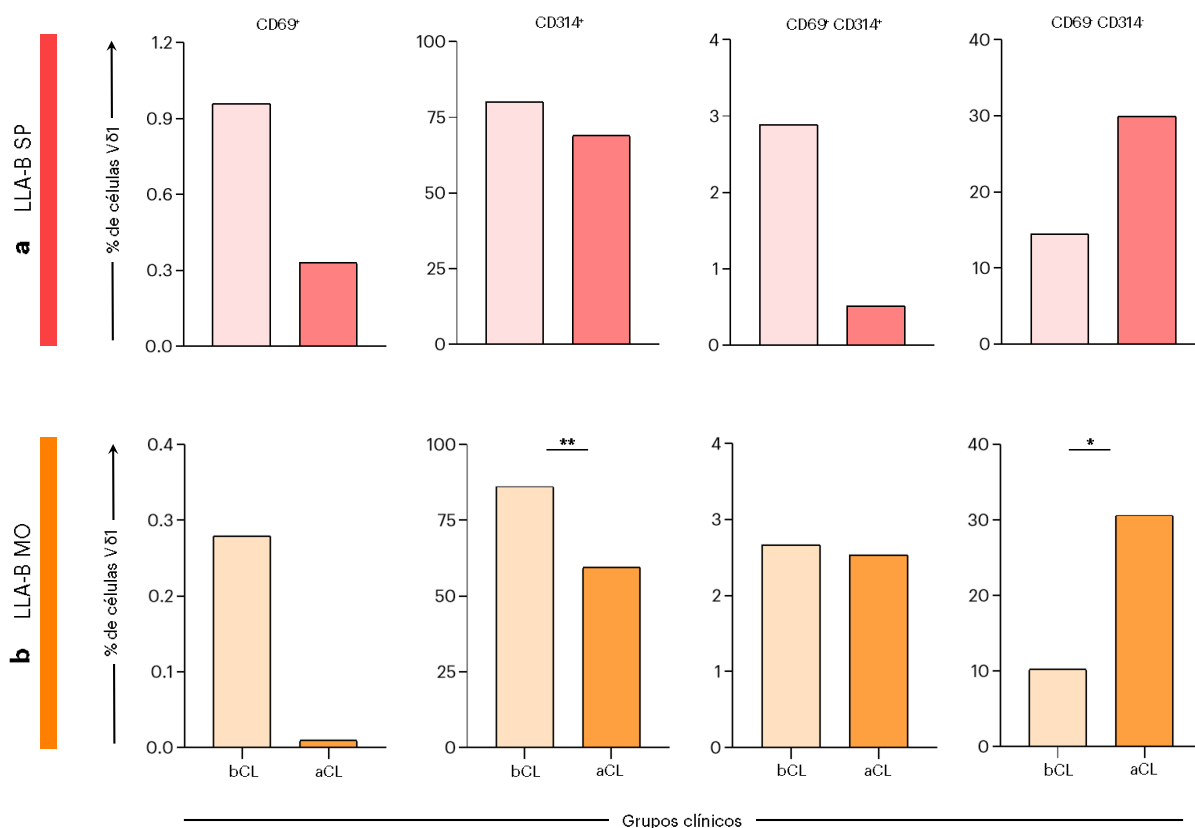


Figura 32: Perfil de ativação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica.

Os números de células V δ 1 expressando CD69 e/ou CD314 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga

leucêmica, >50%). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

A expressão de CD16 e CD56 em células V δ 1 é apresentada na **Figura 33**. Não houve diferenças significativas entre os subgrupos no SP e MO. No entanto, os resultados indicaram que as células V δ 1 circulantes parecem expressar mais CD16 ou CD56 no subgrupo bCL (**Fig. 33a**). As células V δ 1 da MO aparentemente tiveram maior expressão única de CD16 no subgrupo aCL, enquanto no subgrupo bCL parecem exibir maior expressão de CD56 (**Fig. 33b**). A presença de células duplo-negativas permaneceu alta em ambos os subgrupos e não diferiu entre os compartimentos.

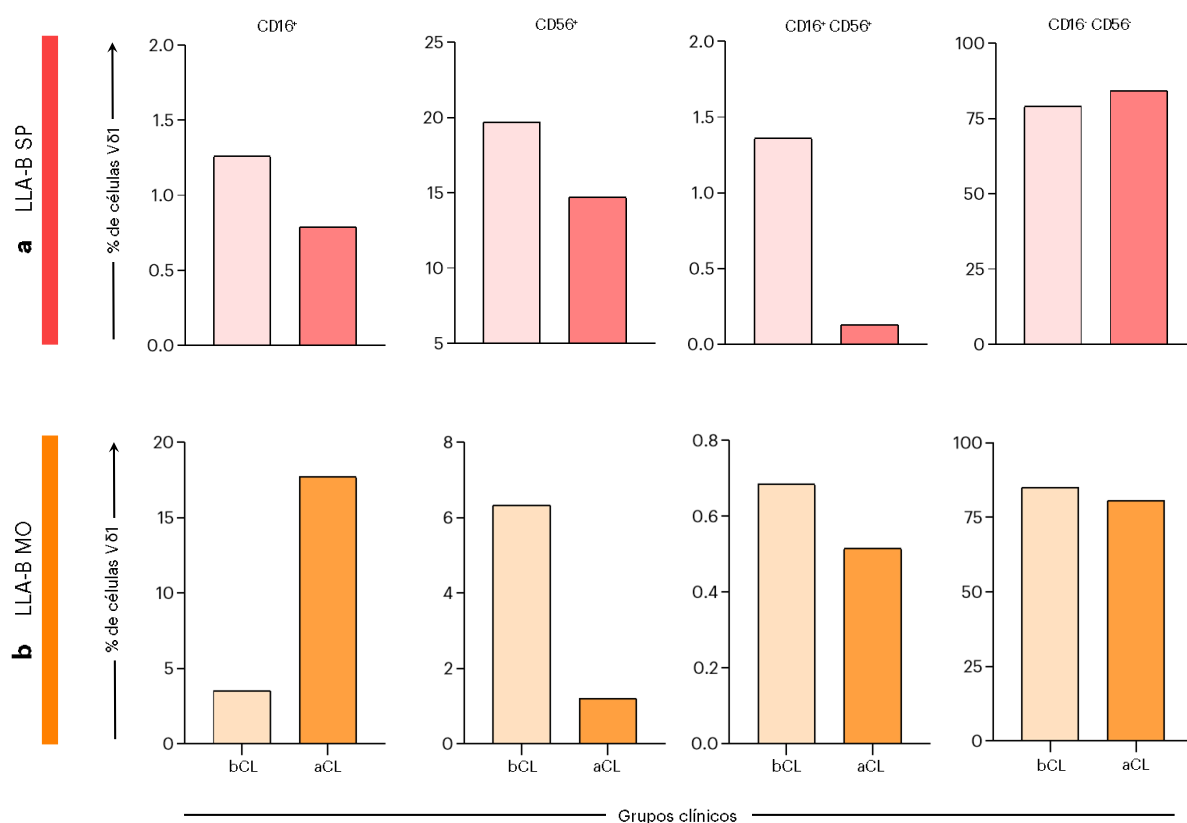


Figura 33: Perfil de citotoxicidade das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 1 expressando CD16 e/ou CD56 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, >50%). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student

não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Foi observado um comportamento interessante de expressão dos *checkpoints* imunológicos CTLA4 e PD1 nos subgrupos bCL e aCL, conforme demonstrado na **Figura 34**. Os pacientes com baixa carga leucêmica possuíam células V δ 1 circulantes regulando positivamente a expressão de CTLA4 e/ou PD1 (**Fig. 34a**). Além disso, as células duplo-positivas também foram consideravelmente mais frequentes no SP desse subgrupo, enquanto as células duplo-negativas foram mais abundantes no subgrupo aCL. Da mesma forma, as células V δ 1 localizadas na MO expressavam mais CTLA4 no subgrupo bCL, enquanto a expressão de PD1 não diferiu entre os subgrupos (**Fig. 34b**). Também foi observado uma presença abundante de células duplo-positivas na MO do subgrupo bCL, enquanto as células duplo-negativas foram discretamente mais frequentes no subgrupo aCL.

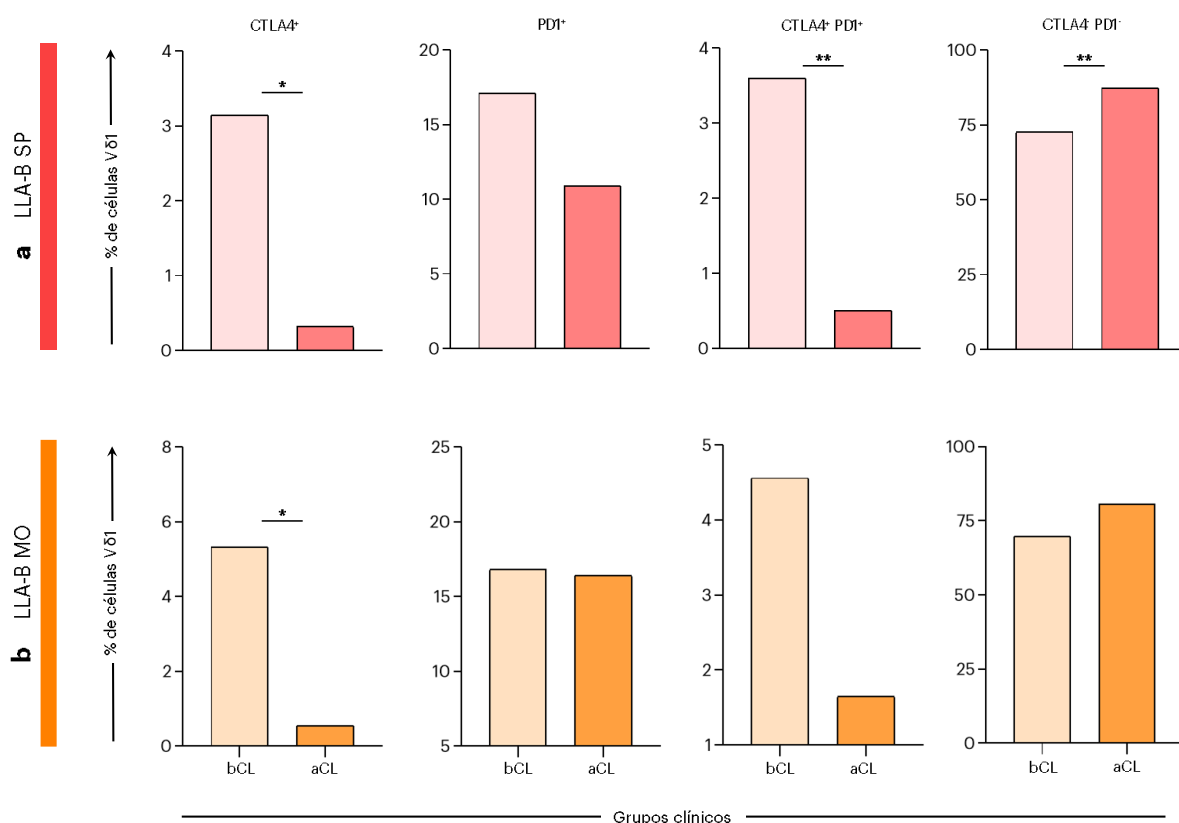


Figura 34: Perfil da expressão de *checkpoints* imunológicos em células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 1 expressando CTLA4 e/ou PD1 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $> 50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em

porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

As análises da expressão de CXCR3 e CXCR4 nos subgrupos bCL e aCL são demonstradas na **Figura 35**. Os pacientes com alta carga leucêmica tinham maior frequência de células V δ 1 CXCR3⁺ no SP, enquanto o subgrupo bCL possuía uma presença significativamente maior de células CXCR4⁺ circulantes (**Fig. 35a**). Curiosamente, embora não tenha sido detectado diferenças consideráveis, a presença de células co-expressando ambos os marcadores foram mais frequentes no SP do subgrupo aCL, enquanto as células duplo-negativas foram mais abundantes no subgrupo bCL. Em contraste, não foram observadas diferenças significativas na MO. Apesar disso, as células V δ 1 deste compartimento também mantinham maior expressão de CXCR3 no subgrupo aCL e maior expressão de CXCR4 no subgrupo bCL (**Fig. 35b**). Também foi observado maior frequência de células duplo-positivas na MO do subgrupo bCL, enquanto as células duplo-negativas foram discretamente reduzidas no subgrupo aCL.

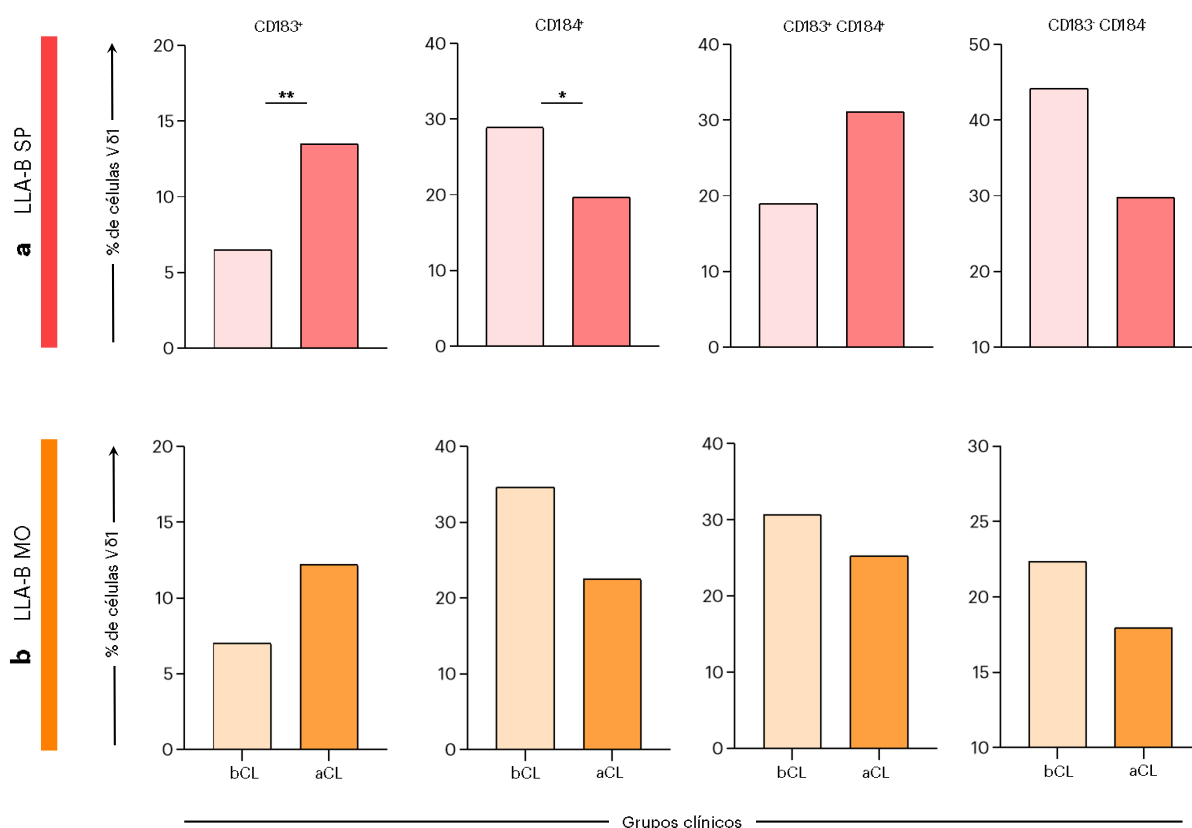


Figura 35: Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 1 de pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 1 expressando CXCR3 e/ou CXCR4 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com

LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $>50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.01$ (**) ou $p < 0.05$ (*).

O perfil de maturação fenotípica das células V δ 1 também foi explorado nos subgrupos bCL e aCL, e o resultados são demonstrados na **Figura 36**. Não foram observadas mudanças consideráveis nas células V δ 1 do SP (**Fig. 36a**). No entanto, o subgrupo aCL apresentou tendência de aumento de células T_{EM} e de células T_{EMRA}. No compartimento medular, também não foram detectadas mudanças significativas (**Fig. 36b**). Apesar disso, as células V δ 1 locais mantiveram maior fenótipo T_{CM} e T_{EM} no subgrupo aCL, enquanto reduziu o percentual de células T_{EMRA}.

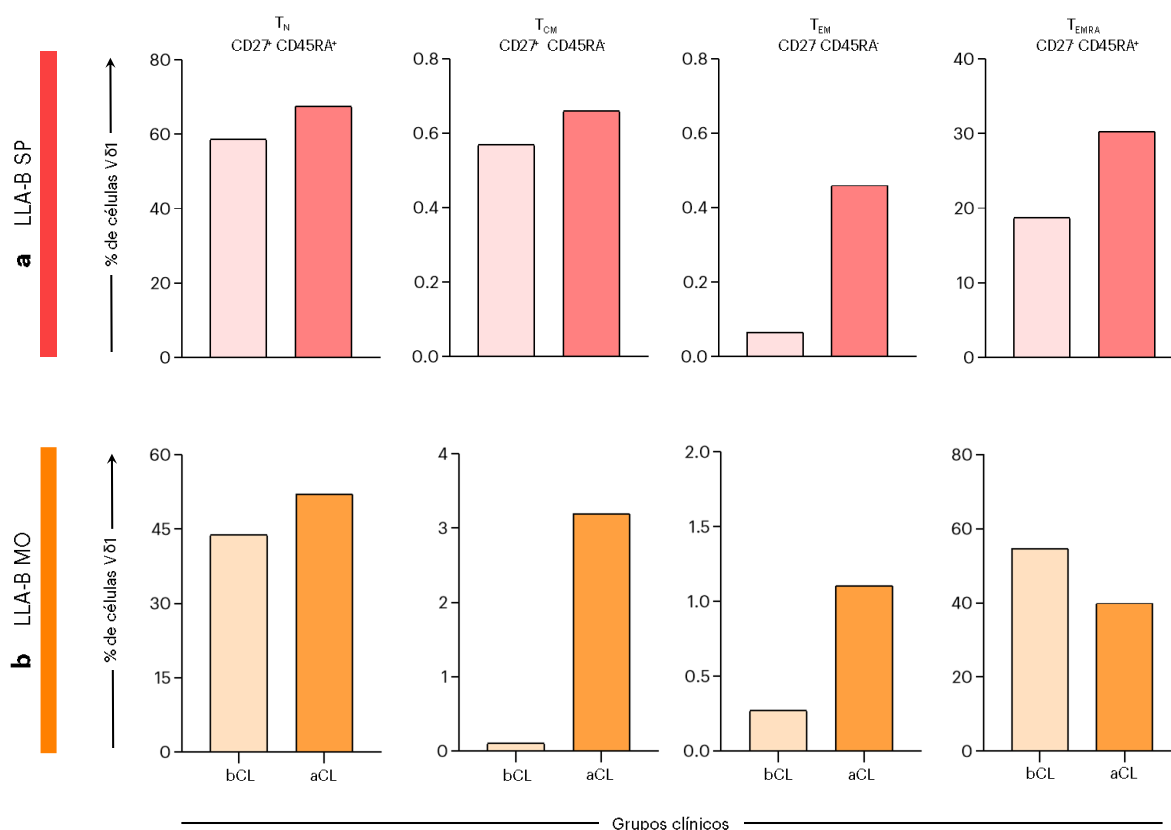


Figura 36: Estado de diferenciação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 1 expressando CD45RA e/ou CD27 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $>50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t*

de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*). T_N, naive; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

Em seguida, realizamos as mesmas análises de perfil fenotípico-funcional nas células Vδ2 derivadas dos subgrupos bCL e aCL. O comportamento de expressão dos marcadores de ativação é demonstrado na **Figura 37**. Não foram observadas mudanças consideráveis no SP entre os subgrupos. No entanto, as células Vδ2 expressando apenas CD69 ou NKG2D, assim como células duplo-negativas, foram mais frequentes no subgrupo aCL, enquanto o subgrupo bCL possuía uma presença maior de células Vδ2 duplo-positivas circulantes (**Fig. 37a**). Curiosamente, observamos um comportamento distinto na MO (**Fig. 37b**). As células Vδ2 locais expressando apenas CD69 foram significativamente aumentadas no subgrupo aCL. Em contraste, a expressão de NKG2D foi aumentada de forma robusta no subgrupo bCL, assim como a presença de células duplo-positivas. Não foram observadas diferenças no comportamento das células duplo-negativas em ambos os subgrupos.

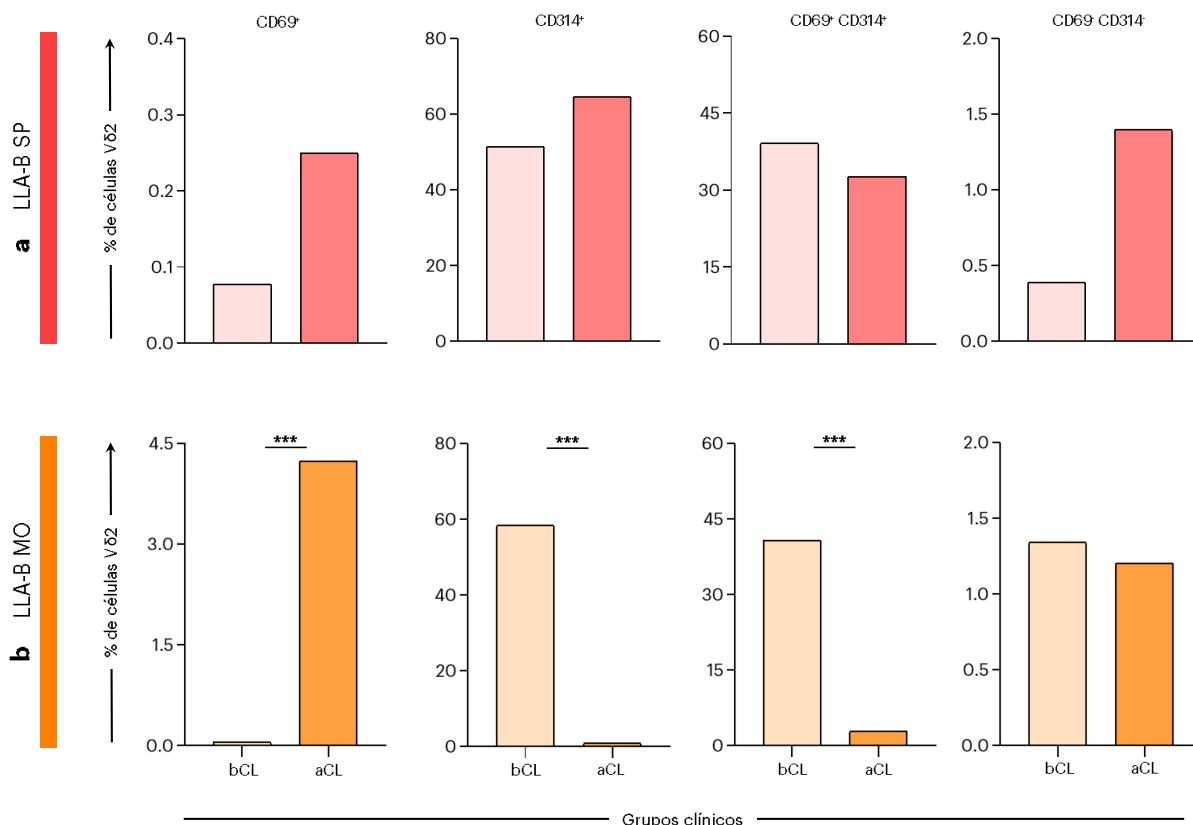


Figura 37: Perfil de ativação das células Vδ2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células Vδ2 expressando CD69 e/ou CD314 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o

quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $>50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.001$ (***)

As análises da expressão de CD16 e CD56 nas células V δ 2 derivadas dos subgrupos bCL e aCL não revelaram diferenças significativas, independentemente do compartimento. Na circulação sanguínea (**Fig. 38a**), os pacientes com alta carga tumoral tiveram mais células expressando apenas CD16 ou CD56, assim como maior frequência de células duplo-negativas. Na MO (**Fig. 38b**), as células V δ 2 expressavam mais CD16 ou co-expressavam os dois marcadores no subgrupo bCL, enquanto no subgrupo aCL, a presença de células duplo-positivas foi menor e a de células duplo-negativas foi maior. A expressão única de CD56 não diferiu entre os dois subgrupos.

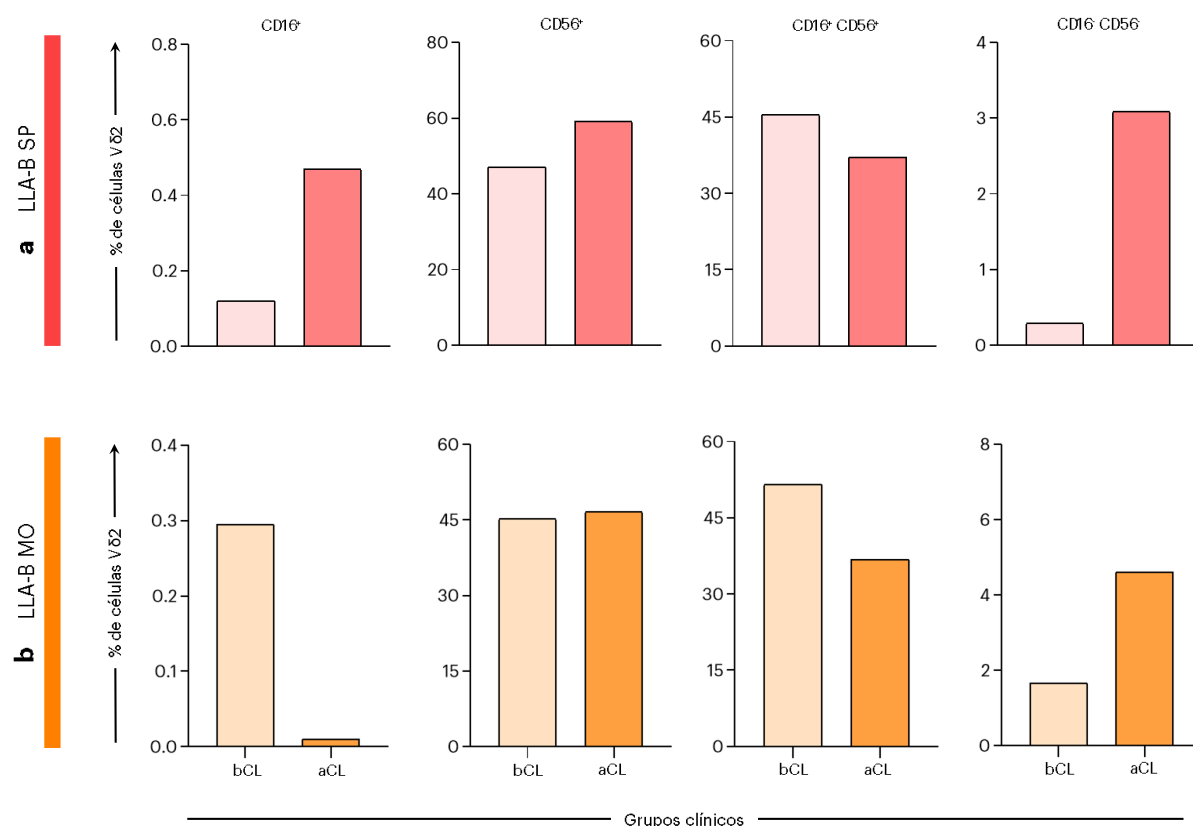


Figura 38: Perfil de citotoxicidade das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 2 expressando CD16 e/ou CD56 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga

leucêmica, >50%). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Durante as análises de expressão dos *checkpoints* imunológicos (**Figura 39**), não foram observadas mudanças significativas no comportamento das células Vδ2 derivadas do SP ou MO dos subgrupos bCL e aCL. No entanto, células Vδ2 circulantes expressando apenas CTLA4 ou PD1, assim como células duplo-negativas, foram mais presentes nos pacientes com alta carga leucêmica (**Fig. 39a**). Em contraste, as células Vδ2 circulantes com expressão simultânea dos *checkpoints* imunológicos foram mais frequentes no subgrupo bCL. Na MO, as células Vδ2 PD1⁺ ou duplo-negativas foram mais encontradas no subgrupo aCL, enquanto o subgrupo bCL exibiu maior frequência de células duplo-positivas (**Fig. 39b**).

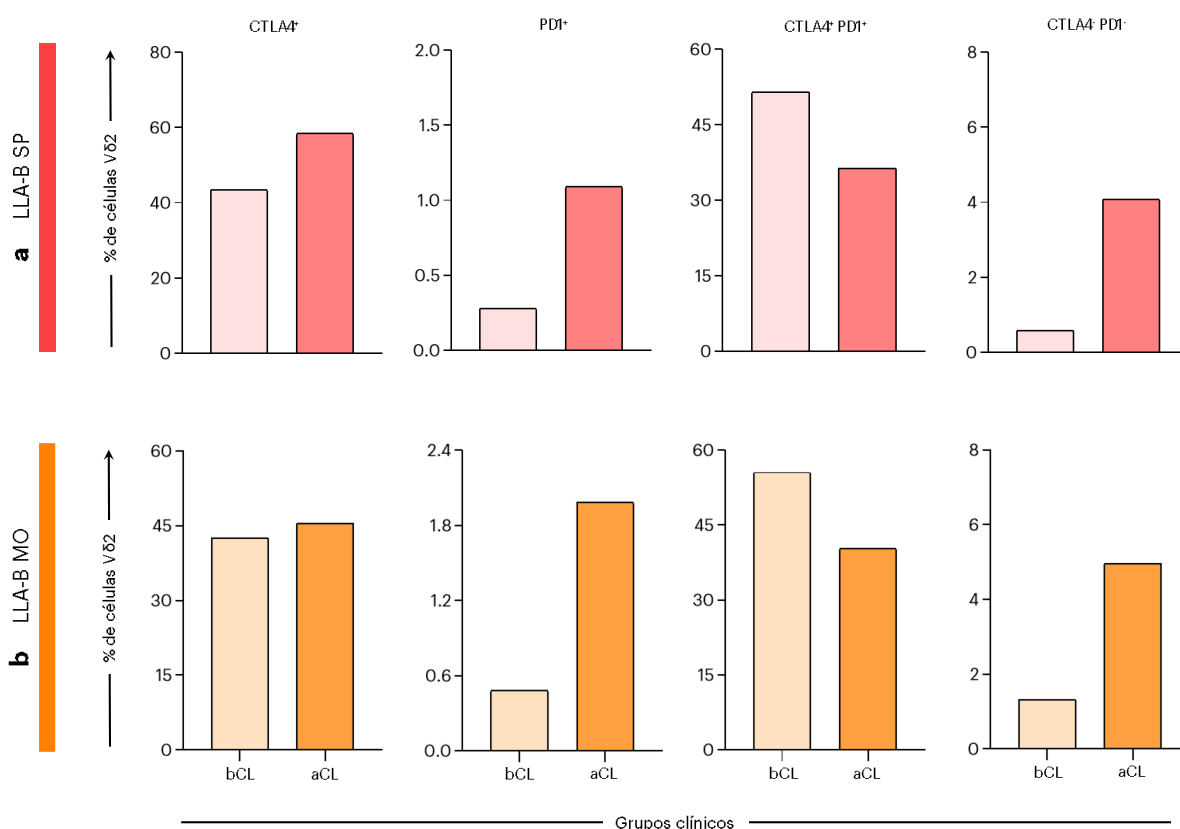


Figura 39: Perfil da expressão de *checkpoints* imunológicos em células Vδ2 de pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células Vδ2 expressando CTLA4 e/ou PD1 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, ≤50%) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, >50%). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk

e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Focamos também na expressão de CXCR3 e CXCR4 por células V δ 2 nos subgrupos bCL e aCL, conforme demonstrado na **Figura 40**. Não foram observadas mudanças significativas na dinâmica de expressão desses marcadores, independentemente do compartimento. Ainda assim, pacientes com alta carga leucêmica mostraram maior frequência de células CXCR3⁺ ou duplo-negativas no SP, enquanto o subgrupo bCL possuía uma presença maior de células CXCR4⁺ circulantes. Além disso, as células co-expressando ambos os marcadores não diferiram no SP dos subgrupos aCL e bCL (**Fig. 40a**). No compartimento medular, as células V δ 2 mantiveram maior expressão de CXCR3 no subgrupo bCL (**Fig. 40b**). Também foi observado maior frequência de células duplo-positivas na MO do subgrupo bCL, enquanto as células duplo-negativas foram mais encontradas no subgrupo aCL. A expressão única de CXCR4 não diferiu de forma considerável entre os dois subgrupos.

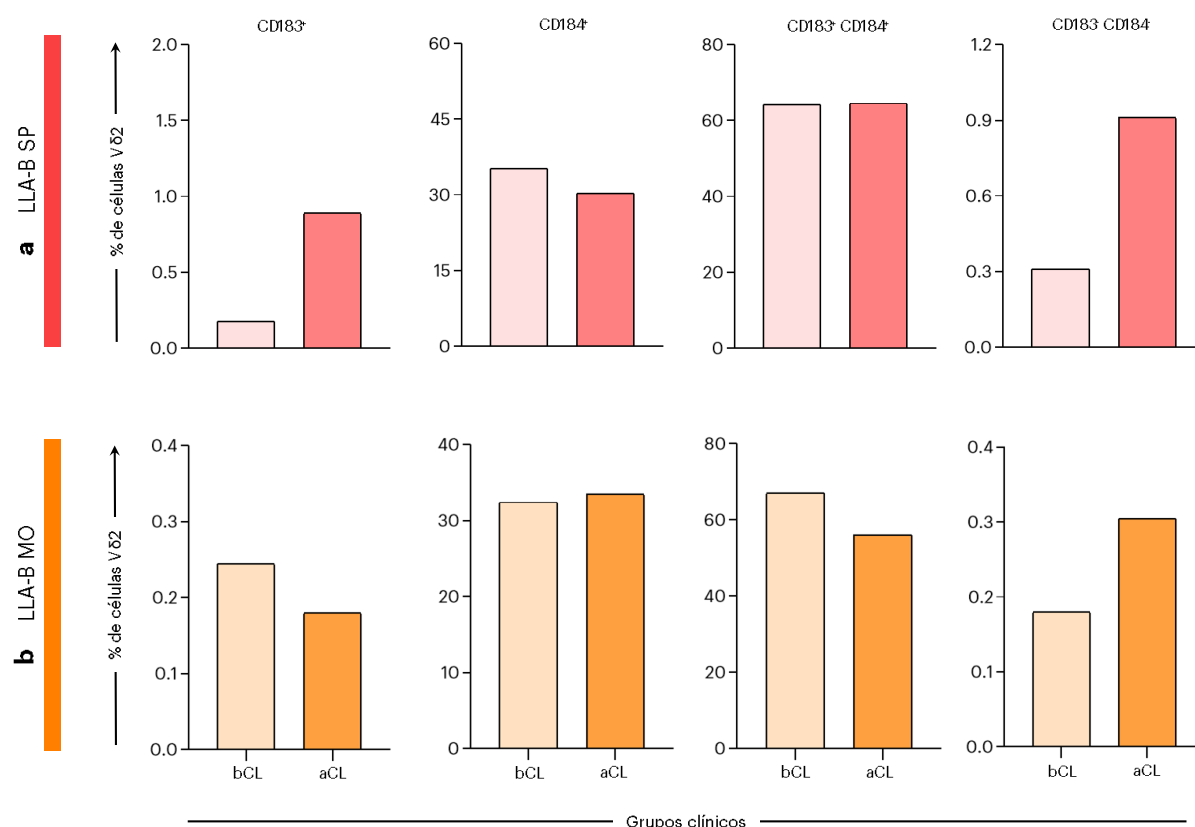


Figura 40: Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 2 de pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 2 expressando CXCR3 e/ou CXCR4 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $> 50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em

porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Finalmente, o perfil de diferenciação das células V δ 2 também foi avaliado nos subgrupos bCL e aCL, e o resultados são demonstrados na **Figura 41**. Não foram observadas mudanças significativas a nível de SP. No entanto, o subgrupo aCL apresentou maior percentual de células *naive* e T_{CM} do que o subgrupo bCL, que, por sua vez, tinha mais células T_{EMRA} (**Fig 41a**). No compartimento medular, também não foram detectadas mudanças significativas entre os subgrupos (**Fig. 41b**). No entanto, as células V δ 2 locais mantiveram maior fenótipo *naive* no subgrupo bCL, enquanto as células T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA} foram mais presentes no subgrupo aCL.

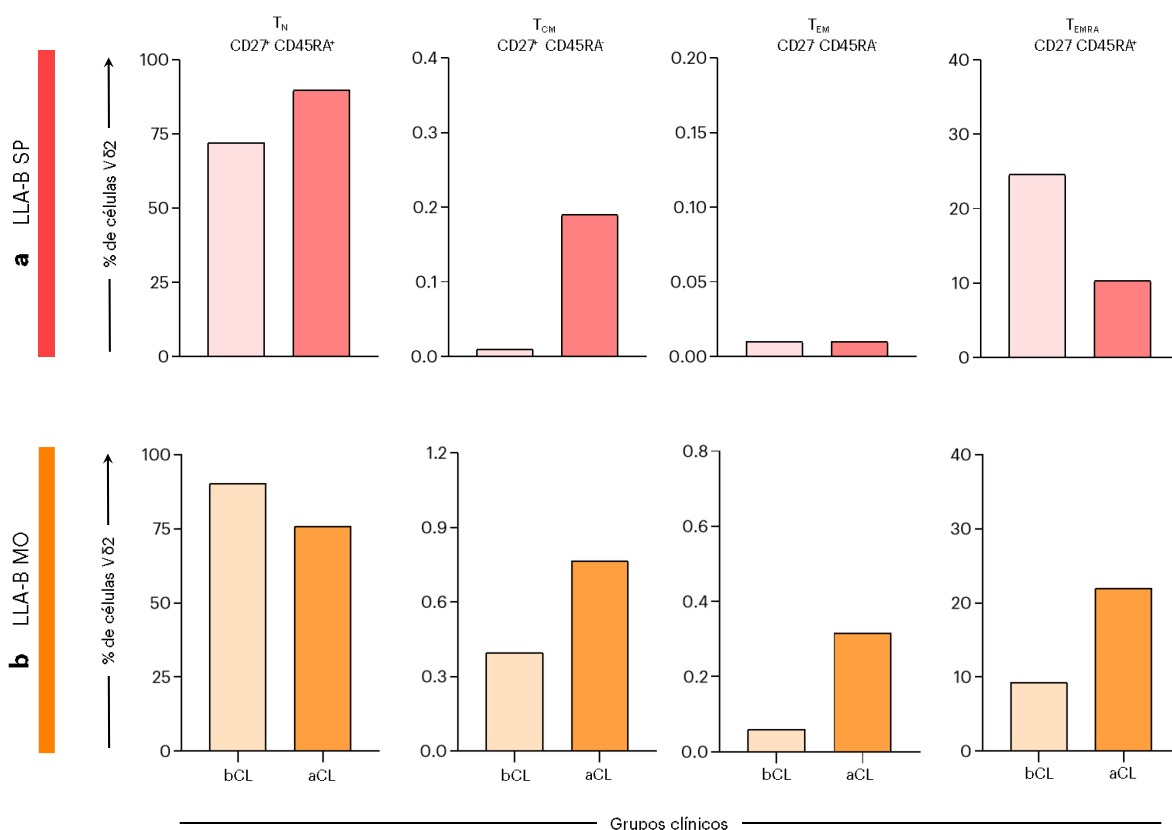


Figura 41: Estado de diferenciação das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a carga leucêmica. Os números de células V δ 2 expressando CD45RA e/ou CD27 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no momento do diagnóstico (D0) em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme o quantitativo de blastos detectado, em subgrupo bCL (baixa carga leucêmica, $\leq 50\%$) e subgrupo aCL (alta carga leucêmica, $> 50\%$). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de

conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*). T_N, naive; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

5.5. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a estratificação do grupo de risco no D15 da quimioterapia de remissão

Também focamos em uma análise transversal dos pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a estratificação de grupo de risco no D15 da quimioterapia de indução da remissão. Os pacientes foram categorizados em dois grandes subgrupos: Baixo Risco (BR) e Alto Risco (AR). Inicialmente, a frequência das células V δ 1 e V δ 2 foi caracterizada no SP e MO de ambos os subgrupos, conforme demonstrado na **Figura 42**. Os resultados não demonstraram diferenças expressivas no que diz respeito a presença de células V δ 1 no SP, mas observou-se uma presença significativamente maior das células V δ 2 circulantes no subgrupo AR (**Fig. 42a**). No compartimento medular (**Fig. 42b**), ambos os subgrupos não revelaram diferenças expressivas na presença de células T $\gamma\delta$, mas é importante destacar que nossos dados indicaram uma tendência de maior percentual de células V δ 1 e V δ 2 no subgrupo AR.

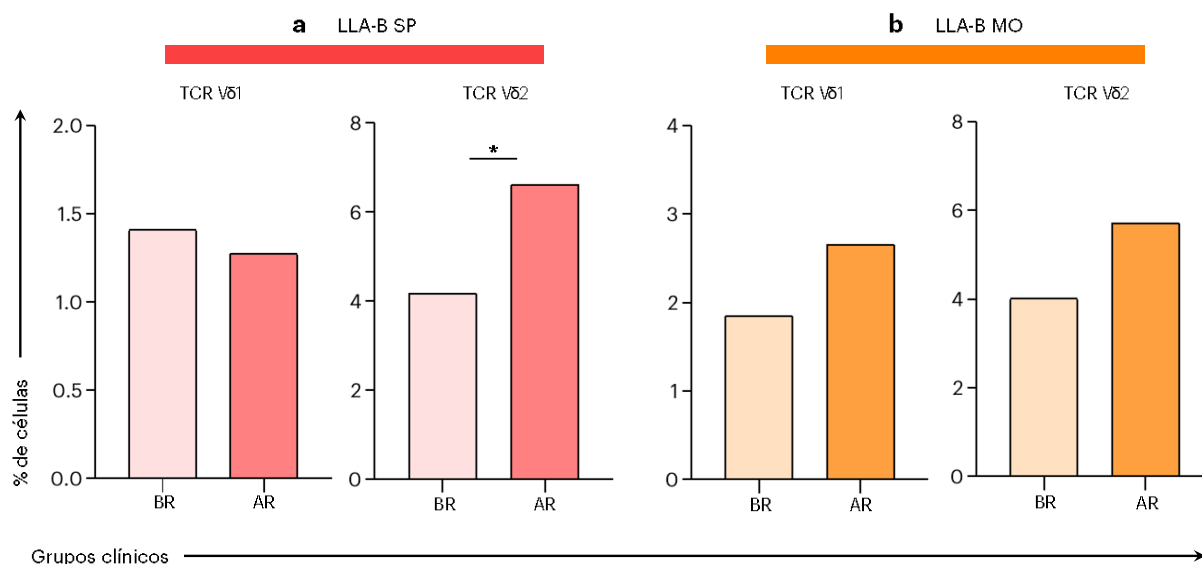


Figura 42: Frequência de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células expressando o TCR V δ 1 ou V δ 2 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste t de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A expressão dos marcadores de ativação em células V δ 1 também foi caracterizada em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15 e os dados são apresentados na **Figura 43**. No SP, os resultados mostram que a presença de células V δ 1 circulantes expressando apenas NKG2D, ou ambos os marcadores, é elevada significativamente nos pacientes classificados como BR, enquanto a frequência de células duplo-negativas é maior em pacientes de AR (**Fig. 43a**). Da mesma forma, células V δ 1 expressando apenas NKG2D ou células duplo-positivas mostraram uma tendência de aumento no subgrupo BR, enquanto uma presença significativamente elevada de células duplo-negativas foi observada na MO daqueles pacientes classificados como AR (**Fig. 43b**).

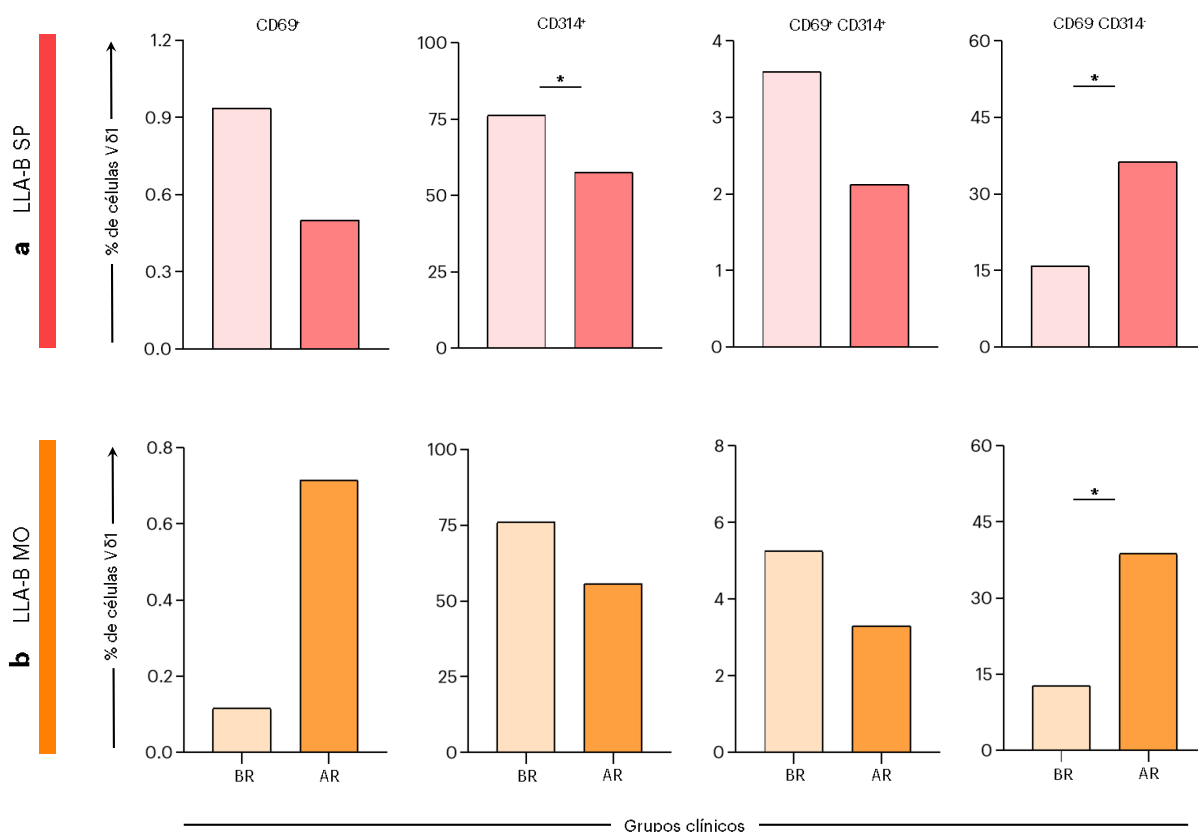


Figura 43: Perfil de ativação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 1 expressando CD69 e/ou CD314 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

As análises da expressão de CD16 e CD56 nas células V δ 1 derivadas dos subgrupos BR e AR não revelaram diferenças significativas, independentemente do compartimento (**Figura 44**). Na circulação sanguínea (**Fig. 44a**), os pacientes estratificados como alto risco tiveram mais células expressando apenas CD16 ou ambos os marcadores. No entanto, a expressão de CD56 ou a frequência de células duplo-negativas não diferiu entre os dois subgrupos. Na MO (**Fig. 44b**), as células V δ 1 expressaram mais CD16 ou co-expressavam os dois marcadores no subgrupo BR, enquanto a presença de células CD56⁺ ou duplo-negativas não exibiu diferenças consideráveis.

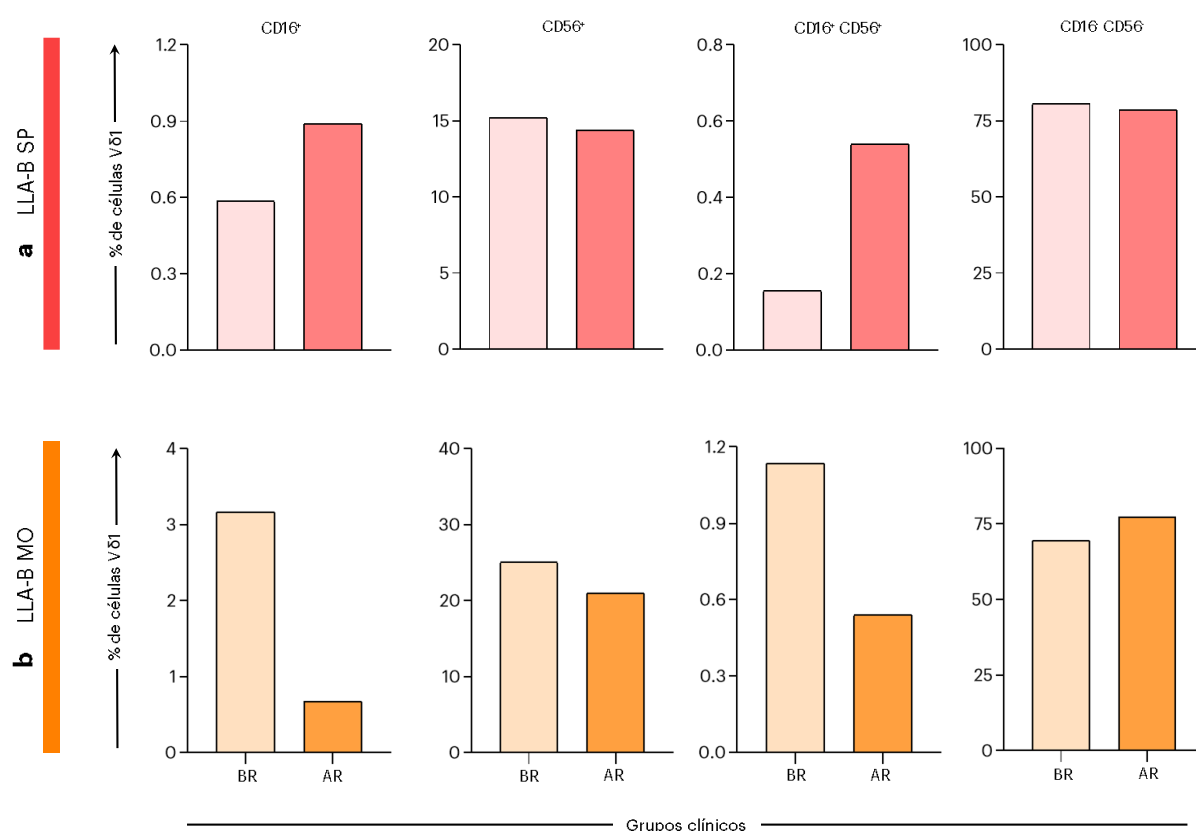


Figura 44: Perfil de citotoxicidade das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 1 expressando CD16 e/ou CD56 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Durante as análises da expressão dos *checkpoints* imunológicos (**Figura 45**), não foram observadas mudanças significativas a nível de SP (**Fig. 45a**). As células V δ 1 circulantes eram principalmente duplo-negativas em ambos os subgrupos, com um maior predomínio de células duplo-positivas nos pacientes de AR. Além disso, o subgrupo BR exibiu maior presença de células V δ 1 expressando apenas CTLA4 ou PD1. No compartimento medular (**Fig. 45b**), os pacientes de baixo risco tiveram um percentual significativamente maior de células V δ 1 expressando apenas CTLA4. A presença única de PD1 mostrou uma tendência de aumento nos pacientes AR, enquanto as células duplo-positivas mostraram tendência de aumento no subgrupo BR. Ainda assim, as células V δ 1 intramedulares eram principalmente duplo-negativas, e não mostraram diferenças consideráveis entre os subgrupos BR e AR.

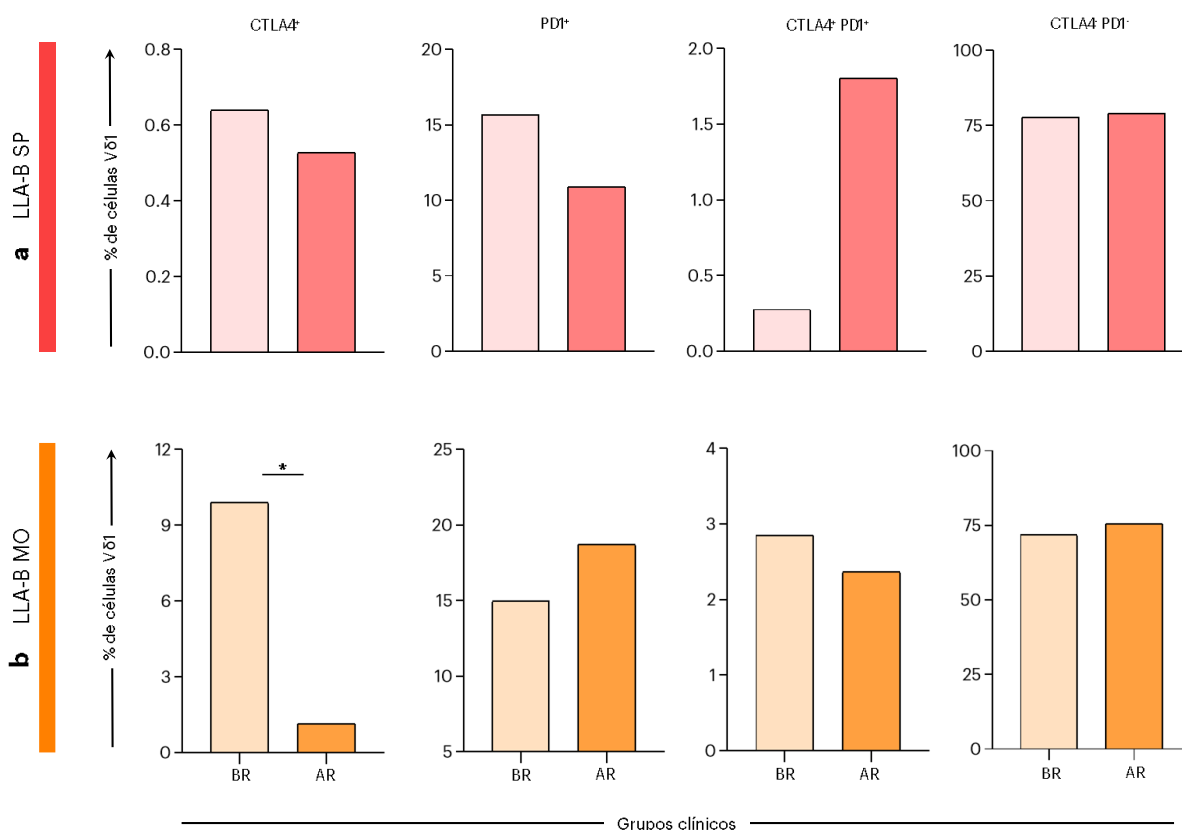


Figura 45: Perfil da expressão de *checkpoints* imunológicos em células V δ 1 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 1 expressando CTLA4 e/ou PD1 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Focamos também na expressão de CXCR3 e CXCR4 por células V δ 1 nos subgrupos BR e AR, conforme demonstrado na **Figura 46**. Não foram observadas mudanças significativas na dinâmica de expressão desses marcadores, independentemente do compartimento. Ainda assim, pacientes de alto risco mostraram maior frequência de células CXCR3⁺ ou duplo-negativas no SP, enquanto o subgrupo BR possuía uma presença maior de células CXCR4⁺ ou duplo-positivas circulantes (**Fig. 46a**). No compartimento medular, as células V δ 1 mantiveram maior expressão de CXCR3 ou CXCR4 no subgrupo AR (**Fig. 46b**). Também foi observado maior frequência de células duplo-positivas na MO do subgrupo BR, enquanto as células duplo-negativas foram mais encontradas nos pacientes classificados como AR.

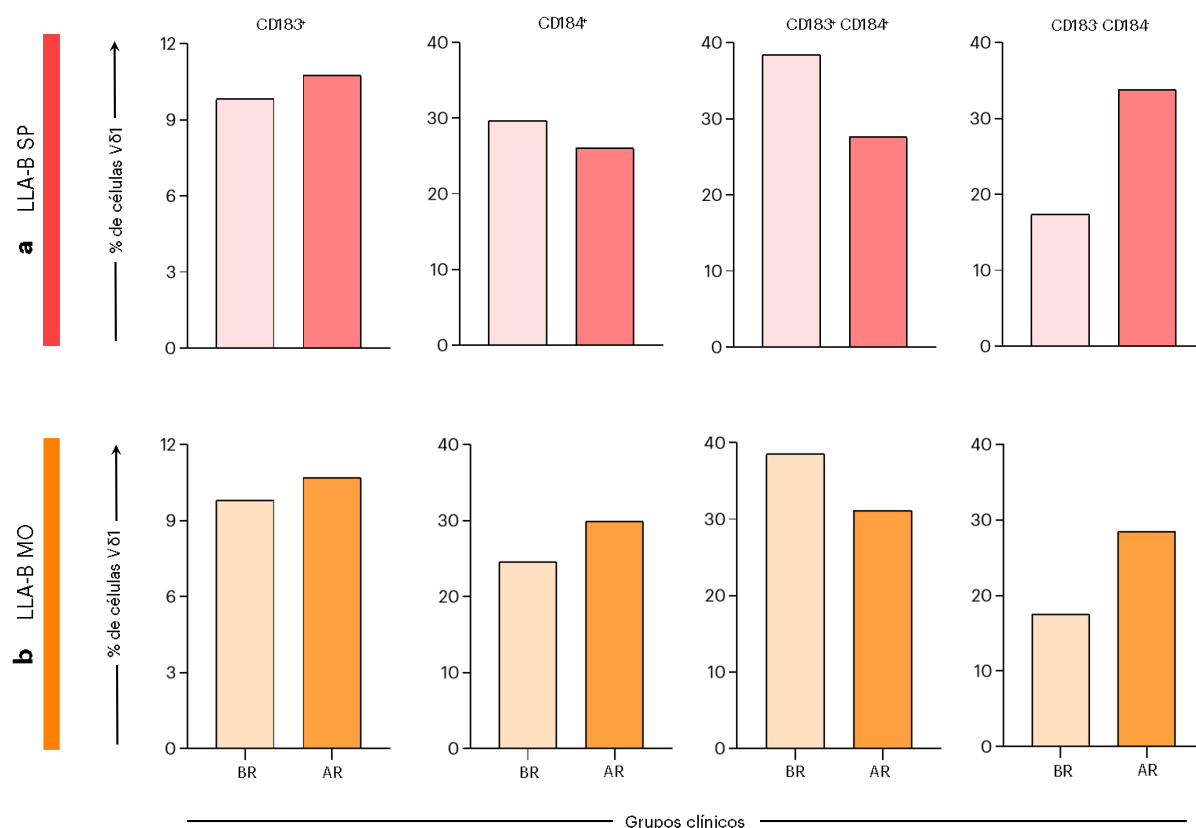


Figura 46: Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 1 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 1 expressando CXCR3 e/ou CXCR4 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Finalmente, o perfil de diferenciação das células V δ 1 também foi avaliado nos subgrupos

BR e AR, como demonstrado na **Figura 47**. Não foram observadas mudanças significativas em nenhum dos compartimentos, independentemente do subgrupo. Na circulação sanguínea (**Fig 47a**), as células V δ 1 *naive* e T_{EM} foram menos frequentes nos pacientes classificados como BR do que no subgrupo AR, enquanto as células T_{CM} e T_{EMRA} foram mais presentes. No compartimento medular (**Fig. 47b**), foi observado o mesmo comportamento. As células V δ 1 locais mantiveram maior fenótipo *naive* no subgrupo AR, com mais células T_{EM} e menos células T_{CM} e T_{EMRA}.

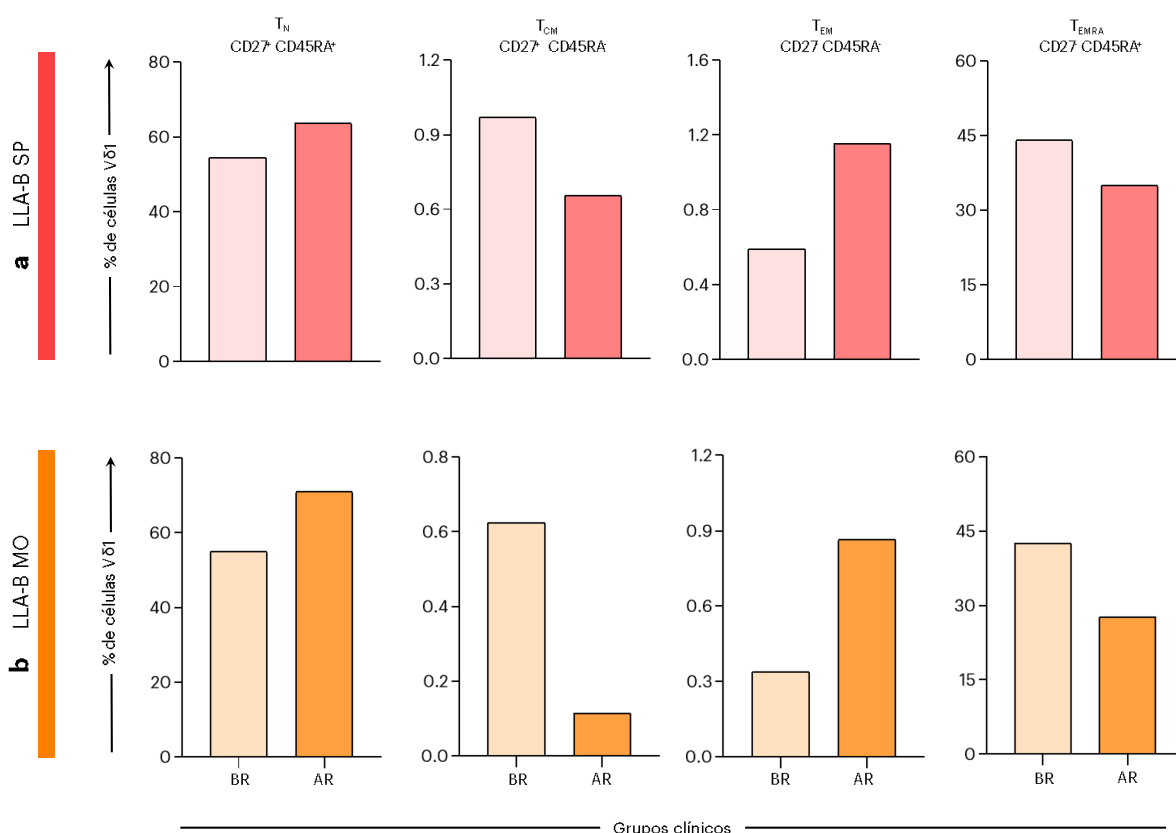


Figura 47: Estado de diferenciação das células V δ 1 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 1 expressando CD45RA e/ou CD27 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*). T_N, *naive*; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

Em seguida, realizamos as mesmas análises de perfil fenotípico-funcional nas células V δ 2 derivadas dos subgrupos BR e AR. O comportamento de expressão dos marcadores de

ativação é demonstrado na **Figura 48**. Não foram observadas mudanças consideráveis no SP e MO entre os subgrupos. No entanto, as células V δ 2 expressando apenas CD69 ou NKG2D, assim como células duplo-negativas, foram mais encontradas no subgrupo AR, enquanto o subgrupo BR exibiu uma presença maior de células V δ 2 duplo-positivas circulantes (**Fig. 48a**). No compartimento medular (**Fig. 48b**), as células V δ 2 locais expressando apenas CD69 ou nenhum dos marcadores foram mais detectadas no subgrupo AR. Além disso, a expressão única de NKG2D ou de ambos os marcadores simultaneamente não diferiu entre os subgrupos.

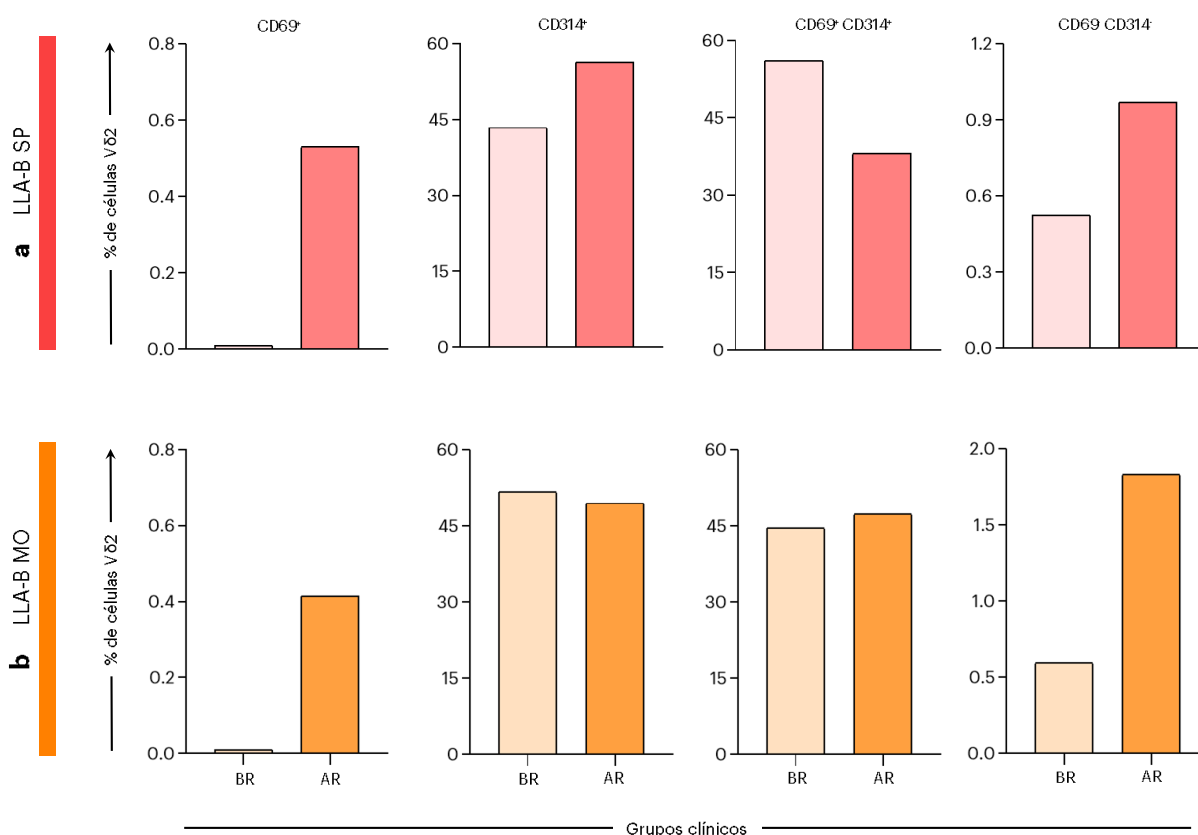


Figura 48: Perfil de ativação das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 2 expressando CD69 e/ou CD314 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A análise da expressão dos marcadores associados a capacidade citotóxica CD16 e CD56 em células V δ 2 derivadas dos subgrupos BR e AR também não revelou diferenças

significativas, independentemente do compartimento (**Figura 49**). Na circulação periférica (**Fig. 49a**), os pacientes estratificados como AR tiveram mais células expressando apenas CD16 ou CD56. Além disso, o subgrupo BR possuía um percentual maior de células V δ 2 co-expressando ambos os marcadores, enquanto a frequência de células duplo-negativas não diferiu entre os dois subgrupos. Na MO, os achados foram semelhantes (**Fig. 49b**), com células V δ 2 expressando mais CD16 ou nenhum dos marcadores no subgrupo AR, enquanto a presença de células CD56⁺ ou duplo-negativas não diferiu expressivamente entre os subgrupos.

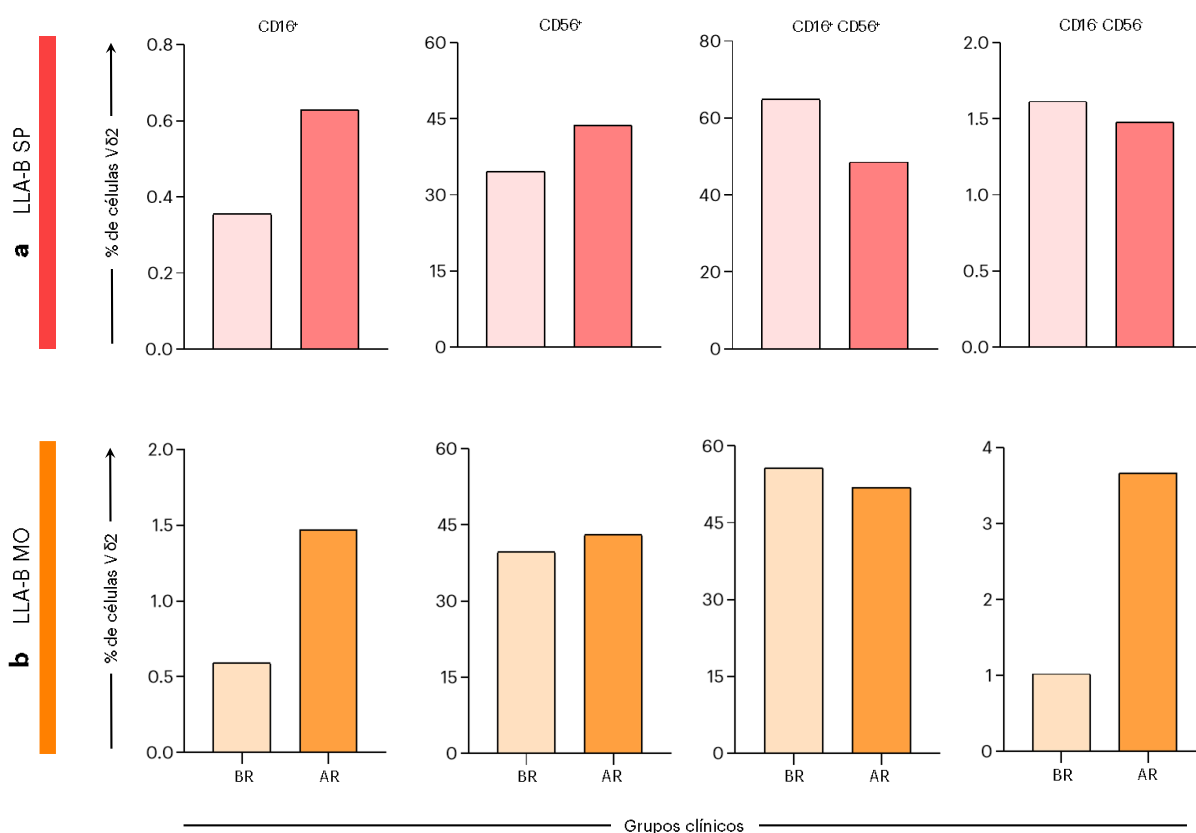


Figura 49: Perfil de citotoxicidade das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 2 expressando CD16 e/ou CD56 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A expressão dos *checkpoints* imunológicos também foi avaliada nas células V δ 2 dos subgrupos BR e AR e não se observou mudanças significativas (**Figura 50**). Na circulação

sanguínea (**Fig. 50a**), as células V δ 2 expressavam individualmente mais CTLA4 ou PD1 nos pacientes classificados como AR. Em contraste, observamos que o subgrupo BR exibiu maior frequência de células V δ 2 duplo-positivas ou duplo-negativas. No compartimento medular (**Fig. 50b**), as células V δ 2 expressando apenas CTLA4 foram mais encontradas no subgrupo BR. Em contraste, a expressão de PD1, assim como a presença de células duplo-positivas ou duplo-negativas mostraram uma tendência de aumento nos pacientes de AR, em comparação com os pacientes classificados como BR.

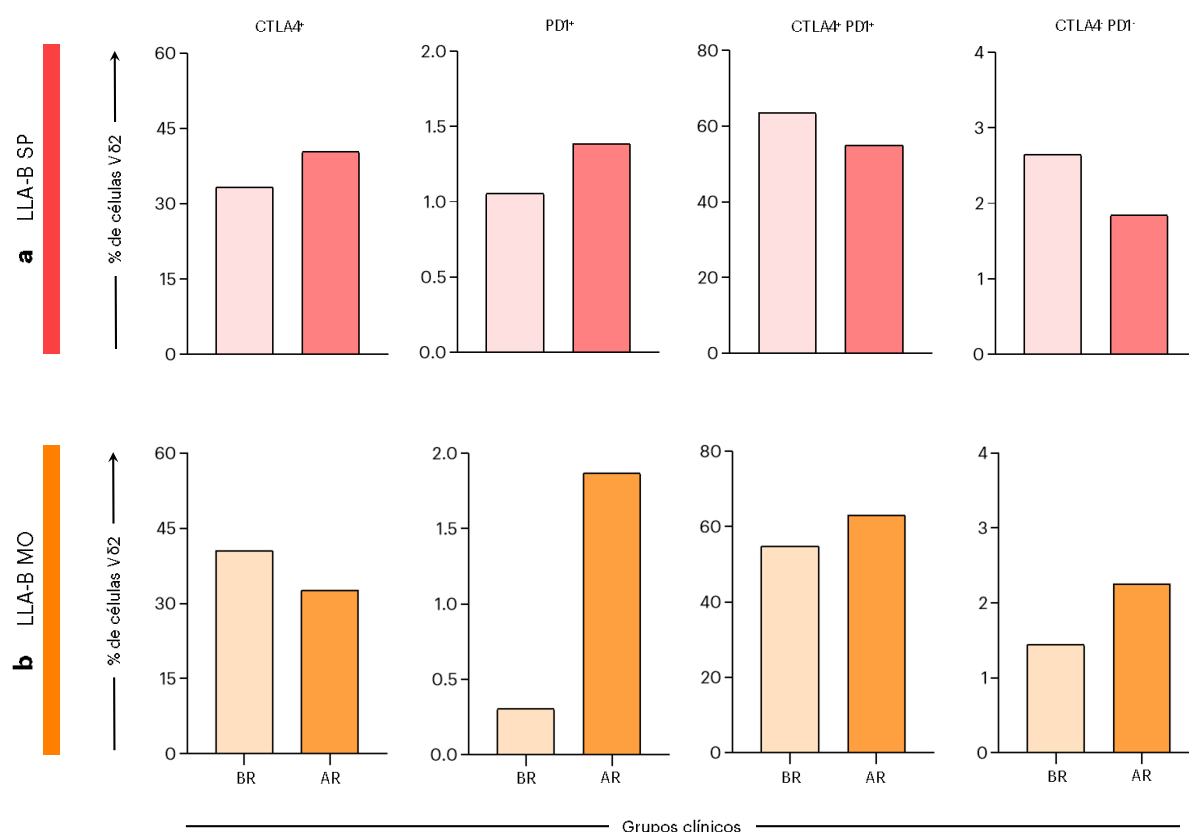


Figura 50: Perfil da expressão de *checkpoints* imunológicos em células V δ 2 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 2 expressando CTLA4 e/ou PD1 no sangue periférico (**a**) e medula óssea (**b**) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Os resultados da análise da expressão dos marcadores ligados a capacidade migratória CXCR3 e CXCR4 nos subgrupos BR e AR são demonstrados na **Figura 51**. Não foram observadas mudanças significativas na dinâmica de expressão desses marcadores,

independentemente do compartimento. Ainda assim, pacientes de AR mostraram maior frequência de células V δ 2 CXCR4⁺ ou duplo-negativas no SP, enquanto o subgrupo BR possuía uma presença maior de células duplo-positivas circulantes (**Fig. 51a**). No compartimento medular, as células V δ 2 mantiveram maior expressão única de CXCR3 ou CXCR4 no subgrupo AR (**Fig. 51b**). Também foi observado maior frequência de células duplo-positivas na MO do subgrupo BR, enquanto as células duplo-negativas foram mais encontradas nos pacientes classificados como AR.

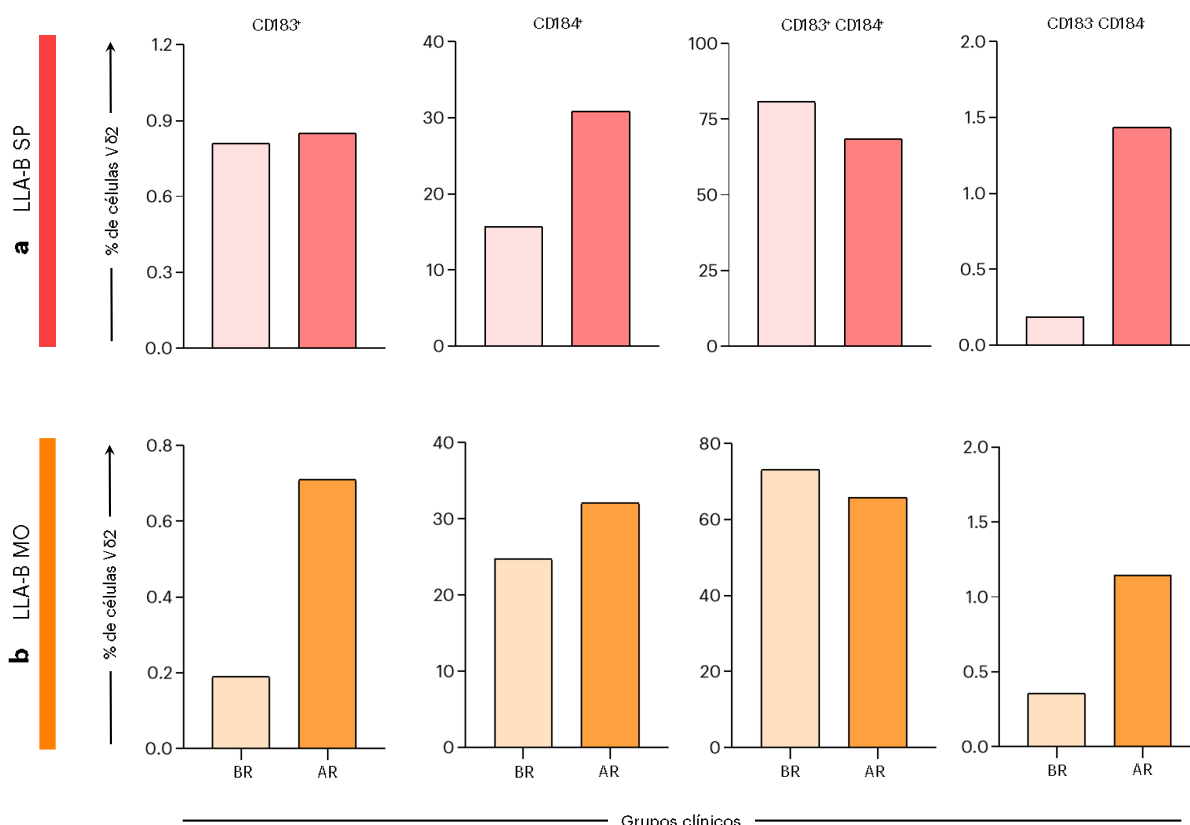


Figura 51: Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células V δ 2 de pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 2 expressando CXCR3 e/ou CXCR4 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Finalmente, o perfil de diferenciação das células V δ 2 também foi avaliado nos subgrupos BR e AR, como demonstrado na **Figura 52**. Na circulação sanguínea (**Fig. 52a**), as células V δ 2 *naive* foram mais frequentes nos pacientes classificados como BR, enquanto as células T_{CM} e

T_{EM} foram praticamente ausentes nesse subgrupo. Em contraste, o subgrupo AR exibiu frequência significativamente maior de células T_{EM} , assim como maior presença de células de T_{CM} e T_{EMRA} . No compartimento medular (**Fig. 52b**), o percentual de células V δ 2 *naive* não diferiu entre os subgrupos, mas as células T_{EMRA} mostraram uma tendência de aumento no subgrupo AR. As células locais com fenótipo T_{CM} foram mais encontradas no subgrupo AR, enquanto as células T_{EM} foram praticamente ausentes em ambos os subgrupos.

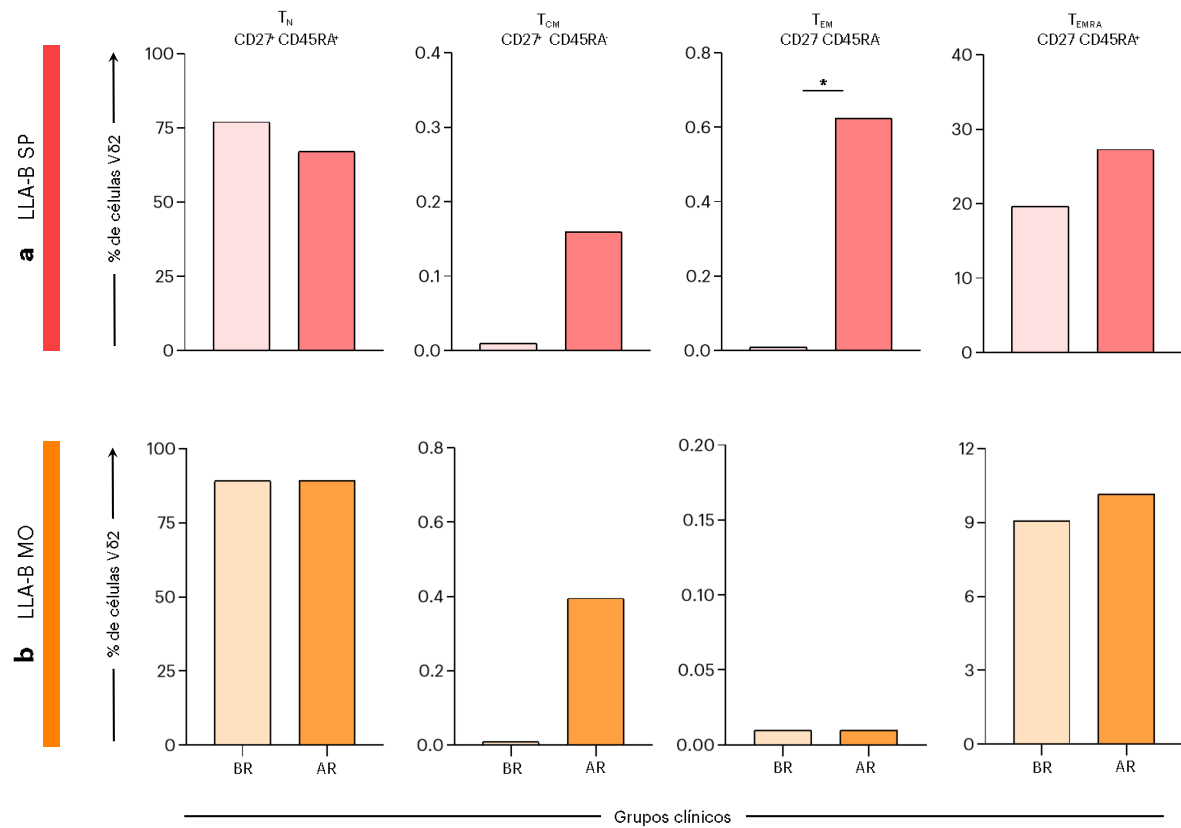


Figura 52: Estado de diferenciação das células V δ 2 em pacientes com LLA-B de acordo com a estratificação de risco no D15. Os números de células V δ 2 expressando CD45RA e/ou CD27 no sangue periférico (a) e medula óssea (b) foram medidos no D15 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes pediátricos com LLA-B categorizados, conforme a estratificação do grupo de risco, em subgrupo BR (baixo risco) e subgrupo AR (alto risco). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste t de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*). T_N , *naive*; T_{CM} , memória central; T_{EM} , memória efetora; T_{EMRA} , terminalmente diferenciada.

5.6. Análise da frequência e perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ de acordo com a detecção de DRM medular no D35 da quimioterapia de remissão

Por último, realizamos uma análise transversal dos pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35 da quimioterapia de indução da remissão. Os pacientes foram categorizados em DRM⁽⁻⁾ e DRM⁽⁺⁾. Inicialmente, a frequência das células V δ 1 e V δ 2 foi caracterizada na MO de ambos os subgrupos, conforme mostrado na **Figura 53**. Os resultados não demonstraram diferenças significativas no que diz respeito a frequência dos subconjuntos de células T $\gamma\delta$. No geral, o percentual foi semelhante entre os dois subgrupos, com células V δ 1 e V δ 2 representando menos de 3% das células T totais derivadas da MO dos pacientes classificados como DRM⁽⁻⁾ ou DRM⁽⁺⁾.

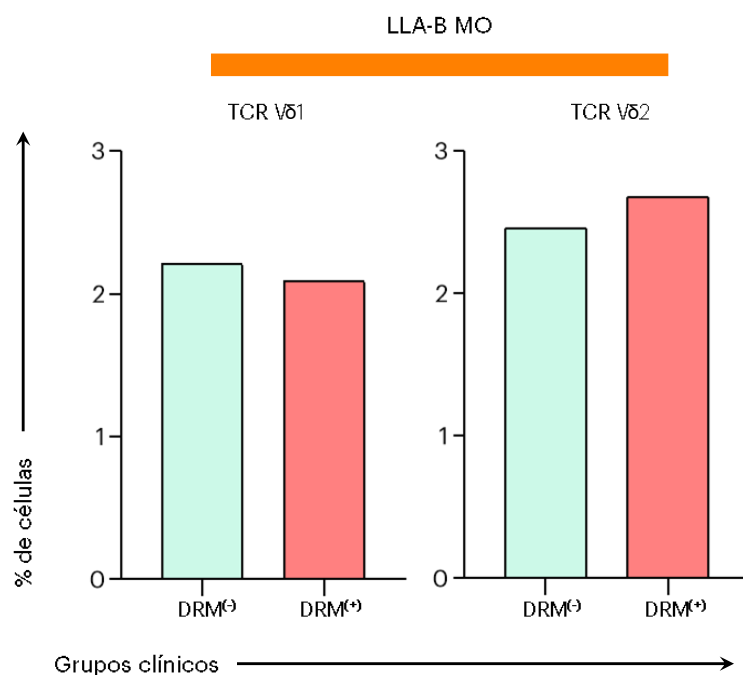


Figura 53: Frequência de células T $\gamma\delta$ em pacientes pediátricos com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células expressando o TCR V δ 1 ou V δ 2 na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais em DRM⁽⁻⁾ (□) e DRM⁽⁺⁾ (■). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A expressão de marcadores de ativação em células V δ 1 e V δ 2 é apresentada na **Figura 54**. Os resultados não mostraram diferenças na expressão individual de CD69 ou NKG2D no

subconjunto V δ 1, no entanto, observou-se que o subgrupo DRM⁽⁻⁾ possuiu uma frequência maior de células duplo-positivas, enquanto o subgrupo DRM⁽⁺⁾ exibiu maior percentual de células duplo-negativas. As células V δ 2, por sua vez, mostraram uma expressão maior, mas não significativa, de CD69 nos pacientes DRM⁽⁻⁾. Além disso, os pacientes DRM⁽⁺⁾ exibiram tendência de aumento no percentual de células V δ 2 duplo-negativas. A presença de células expressando apenas NKG2D ou de células duplo-positivas não diferiu entre os subgrupos, embora constituíssem grande parte das células V δ 2.

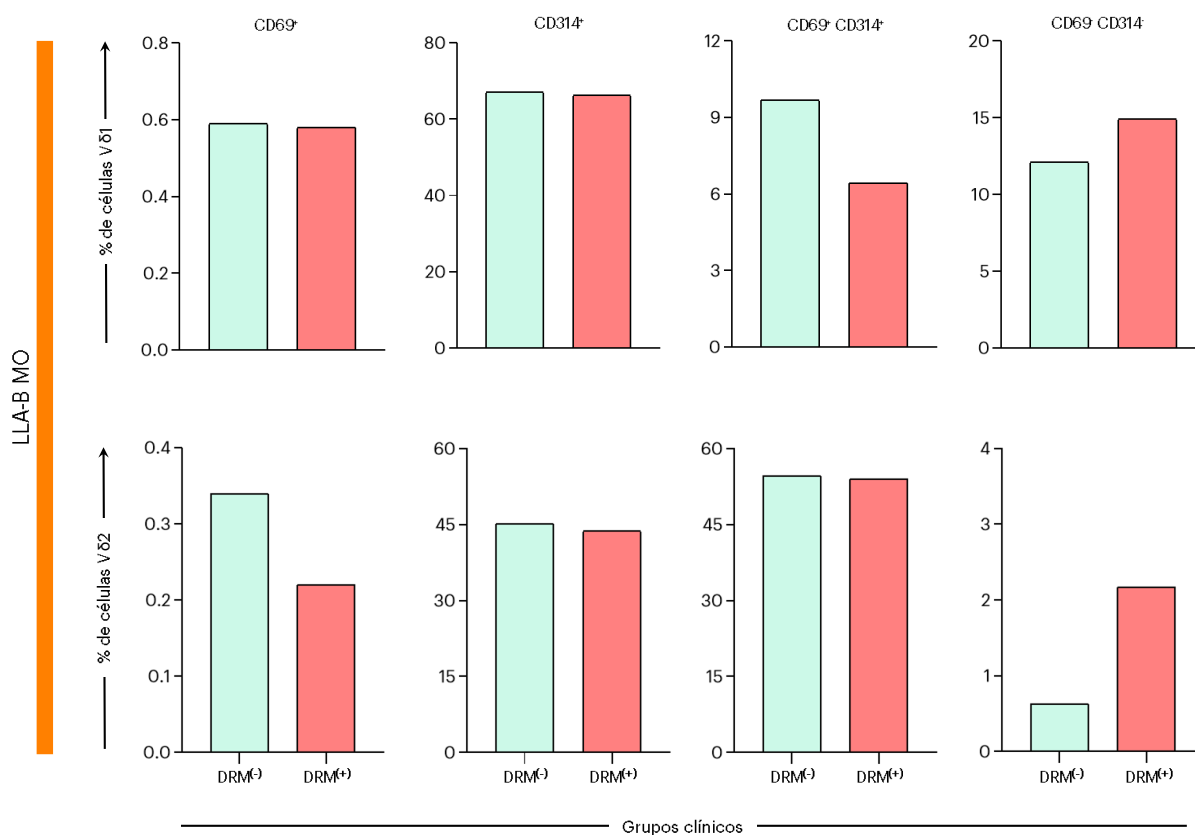


Figura 54: Perfil de ativação das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células V δ 1 e V δ 2 expressando CD69 e/ou NKG2D (CD314) na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais em DRM⁽⁻⁾ (verde) e DRM⁽⁺⁾ (vermelho). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A caracterização da expressão dos marcadores CD16 e CD56 em células T $\gamma\delta$ também não revelou diferenças significativas, independentemente do subconjunto (**Figura 55**). No entanto, mais da metade do *pool* de células V δ 1 não expressava estes marcadores de

citotoxicidade e isso foi observado em ambos os subgrupos de pacientes. As células V δ 1 com expressão única de CD69, NKG2D ou co-expressando os dois marcadores, foram mais encontradas no subgrupo DRM⁽⁻⁾. Diferentemente da sua contraparte V δ 1⁺, as células V δ 2 predominantes eram duplo-positivas nos pacientes DRM⁽⁻⁾ enquanto nos pacientes DRM⁽⁺⁾, essas células exibiam maior expressão individual de CD56. A frequência de células CD16⁺ também foi maior no subgrupo DRM⁽⁻⁾ e o percentual de células V δ 2 duplo-negativas não diferiu entre os subgrupos de pacientes.

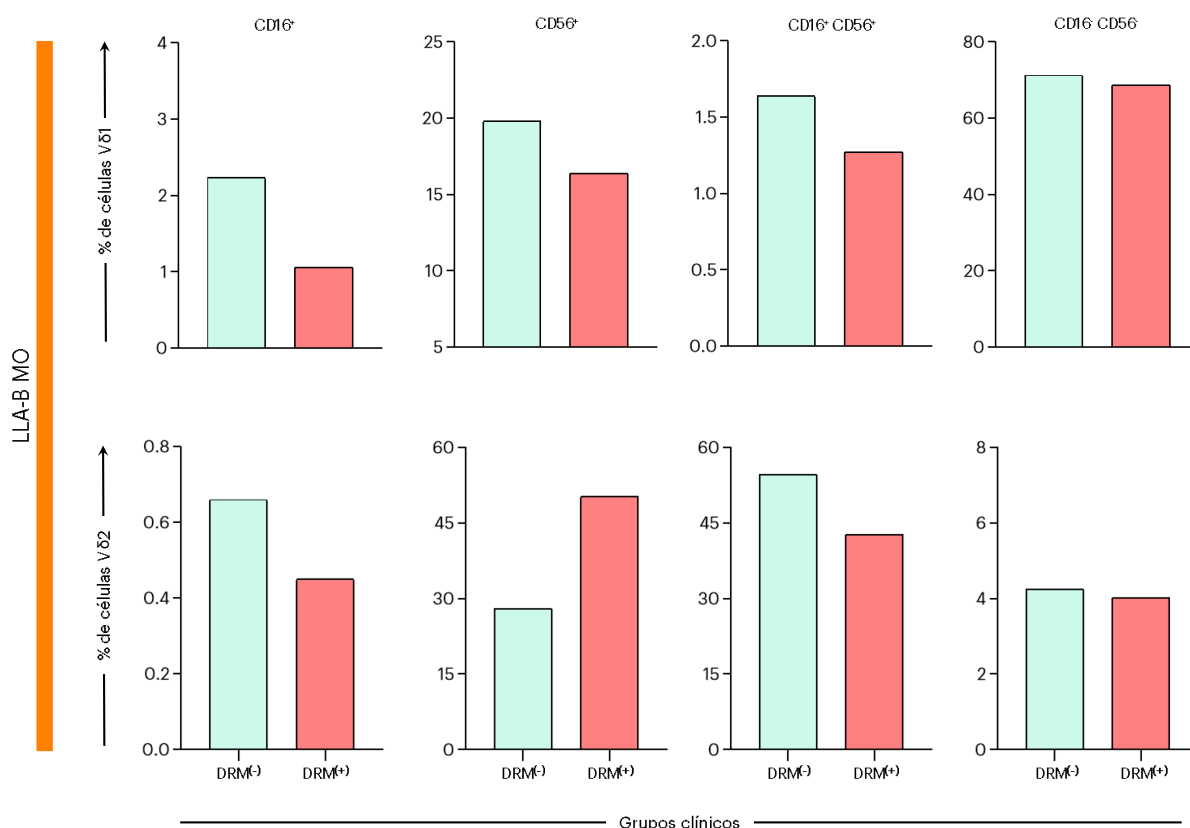


Figura 55: Perfil de citotoxicidade das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células V δ 1 e V δ 2 expressando CD16 e/ou CD56 na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais em DRM⁽⁻⁾ (verde) e DRM⁽⁺⁾ (vermelho). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

A expressão dos *checkpoints* imunológicos CTLA4 e PD1 também foi avaliada nas células T $\gamma\delta$ dos subgrupos DRM⁽⁻⁾ e DRM⁽⁺⁾, e não foram identificadas diferenças consideráveis (Figura 56). No entanto, as células V δ 1 expressavam individualmente mais

CTLA4 ou nenhum dos *checkpoints* imunológicos no subgrupo DRM⁽⁺⁾. Também foi observado que o subgrupo DRM⁽⁻⁾ exibiu maior presença de células Vδ1 duplo-positivas, enquanto a expressão única de PD1 não diferiu entre os dois subgrupos de pacientes. É importante notar que mais da metade das células Vδ1 eram duplo-negativas em ambos os subgrupos. As células Vδ2, por sua vez, eram principalmente duplo-positivas, com um segundo subconjunto predominante que expressava apenas CTLA4. Os pacientes classificados como DRM⁽⁺⁾ apresentaram um percentual maior de células Vδ2 CTLA4⁺ enquanto o subgrupo DRM⁽⁻⁾ apresentou maior presença de células Vδ2 PD1⁺.

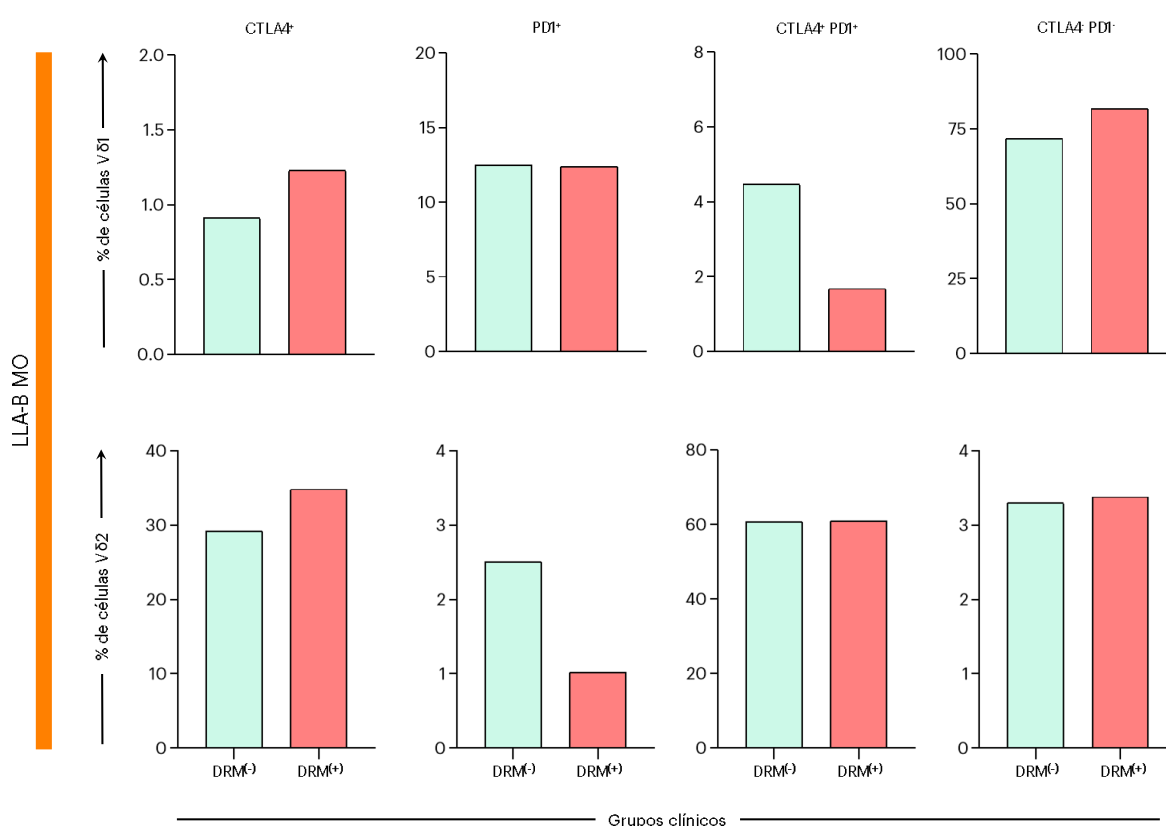


Figura 56: Perfil da expressão dos checkpoints imunológicos em células T γδ de pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células Vδ1 e Vδ2 expressando CTLA4 e/ou PD1 na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais DRM⁽⁻⁾ (verde) e DRM⁽⁺⁾ (vermelho). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Os resultados da análise da expressão de CXCR3 e CXCR4 nos pacientes DRM⁽⁻⁾ e DRM⁽⁺⁾ são demonstrados na **Figura 57**. As células Vδ1 mantiveram um perfil heterogêneo de expressão desses marcadores. Os pacientes DRM⁽⁺⁾ exibiram percentual mais aumentado de células Vδ1 CXCR3⁺ ou CXCR4⁺, assim como células co-expressando os dois marcadores. No entanto, os pacientes DRM⁽⁻⁾ exibiram uma frequência significativamente maior de células Vδ1 duplo-negativas. As células Vδ2 não demonstraram diferenças significativas, porém, a expressão de única de CXCR3 nesse subconjunto era praticamente ausente nos pacientes DRM⁽⁺⁾. Por outro lado, a grande maioria das células Vδ2, em ambos os subgrupos, eram duplo-positivas, seguidas de uma população menor que expressava apenas CXCR4. Além disso, as células duplo-negativas foram mais detectadas nos pacientes classificados como DRM⁽⁺⁾.

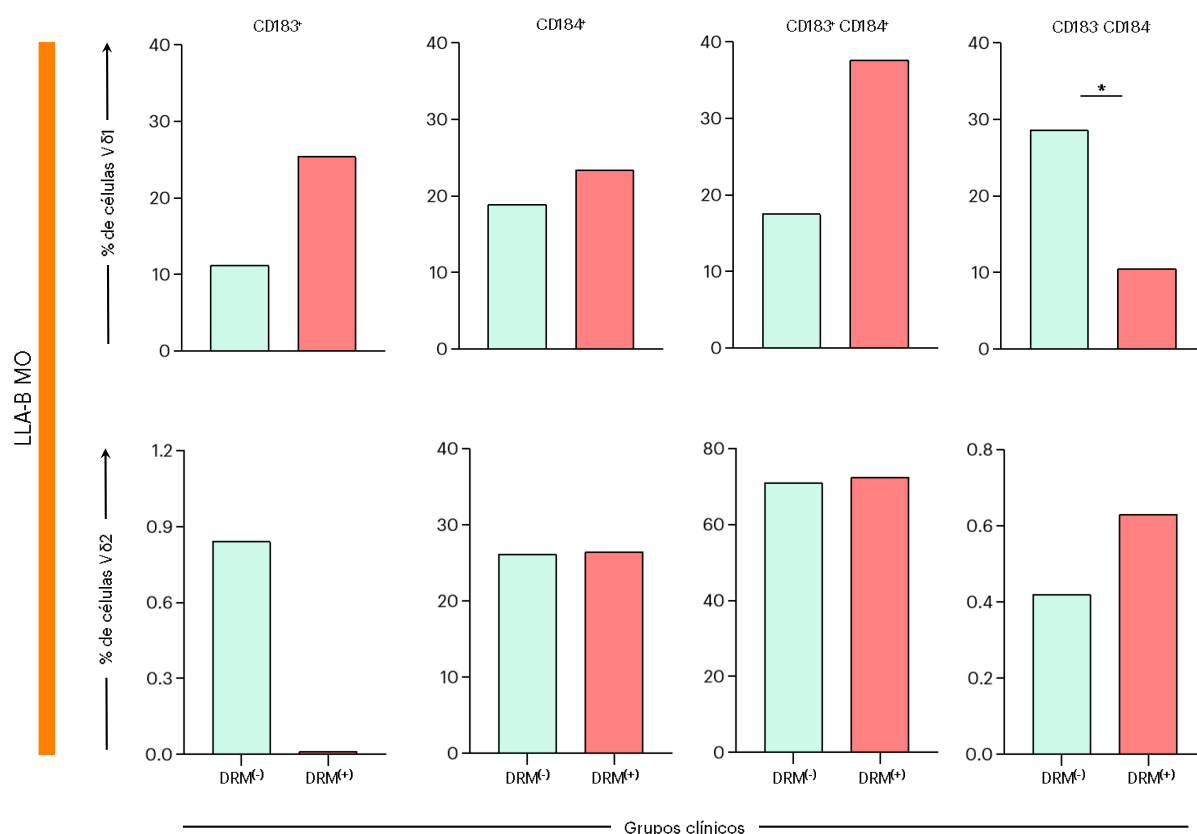


Figura 57: Perfil da expressão de receptores de quimiocina em células T γδ de pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células Vδ1 e Vδ2 expressando CXCR3 (CD183) e/ou CXCR4 (CD184) na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais DRM⁽⁻⁾ (verde) e DRM⁽⁺⁾ (vermelho). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*).

Por fim, focamos no perfil de diferenciação das células T $\gamma\delta$ de ambos os subgrupos, como demonstrado na **Figura 58**. Aqui, também não detectamos diferenças significativas. As células V δ 1 *naive* foram mais frequentes nos pacientes DRM⁽⁺⁾, enquanto as células T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA} foram mais presentes no subgrupo DRM⁽⁻⁾. Um perfil semelhante foi observado em células V δ 2 *naive*, que representaram quase que a totalidade deste subconjunto na MO. As células locais com fenótipo T_{CM} foram extremamente raras e encontradas principalmente no subgrupo DRM⁽⁻⁾, enquanto os pacientes DRM⁽⁺⁾ praticamente não possuíam essas células. Da mesma forma, as células V δ 2 T_{EM} também foram detectadas com um percentual muito pequeno em ambos os subgrupos de pacientes. As células T_{EMRA} foram mais presentes nos pacientes classificados como DRM⁽⁻⁾.

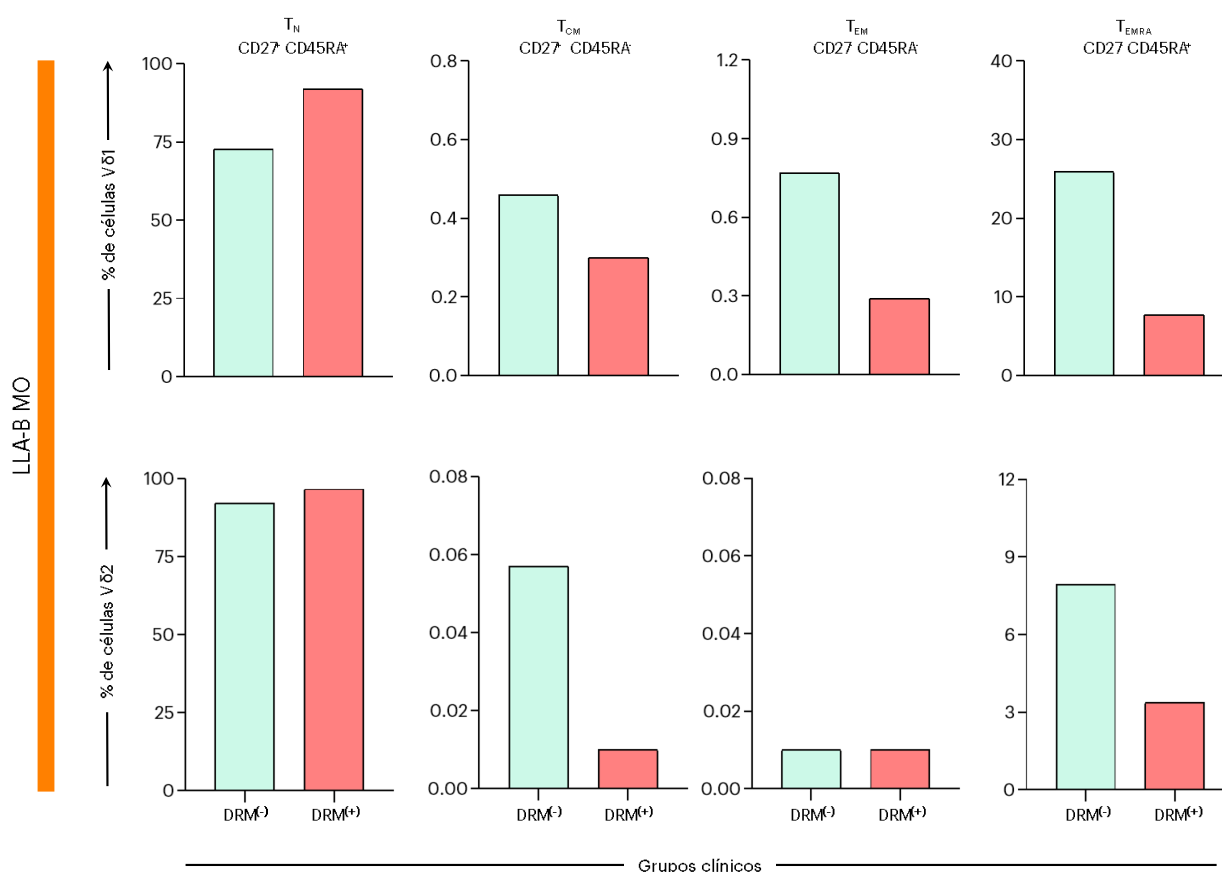


Figura 58: Estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$ em pacientes com LLA-B de acordo com a detecção de DRM medular no D35. Os números de células V δ 1 e V δ 2 expressando CD45RA e/ou CD27 na medula óssea foram medidos no D35 da quimioterapia de indução da remissão em pacientes com LLA-B categorizados conforme a presença ou ausência de células leucêmicas residuais em DRM⁽⁻⁾ (verde) e DRM⁽⁺⁾ (vermelho). Os dados são mostrados como mediana global expressa em porcentagem de células (%). As análises estatísticas foram realizadas usando o teste de normalidade Shapiro-Wilk e em seguida o teste *t* de Student não-pareado ou o teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas são sublinhadas por linhas de conexão e destacadas por asteriscos quando $p < 0.05$ (*). T_N, *naive*; T_{CM}, memória central; T_{EM}, memória efetora; T_{EMRA}, terminalmente diferenciada.

5.7. Análise das redes biológicas integrativas de células T $\gamma\delta$ e os mediadores imunológicos solúveis durante a quimioterapia de remissão

Para investigar potenciais interações entre os subconjuntos de células T $\gamma\delta$, citocinas e quimiocinas durante o desenvolvimento do tumor e ao final do tratamento quimioterápico, foram construídas redes integrativas de correlação, conforme mostrado na **Figura 59**. Os resultados revelaram que os pacientes com LLA-B apresentam uma rede de sinalização global com participação pobre de células T $\gamma\delta$, exibindo um número mínimo de conexões com os mediadores imunológicos solúveis.

Na circulação sanguínea, observou-se correlação negativa entre células V δ 2 e as citocinas IL-7 e IL-17 no momento do diagnóstico, enquanto no compartimento medular essas células se correlacionaram negativamente com as quimiocinas CXCL8 e CXCL10. Da mesma forma, o GC também exibiu um número pequeno de conexões, com correlação positiva entre os subconjuntos de células T $\gamma\delta$ e uma correlação negativa entre o subconjunto V δ 2 e a quimiocina CCL4.

Ao final da quimioterapia de remissão, no D84, observou-se a mesma deficiência geral no número de correlações, marcado pelo surgimento de interações mediadas por células V δ 1, que exibiram correlações negativas com as quimiocinas CCL3 e CXCL8. Por fim, no compartimento da MO, os pacientes com LLA-B apresentaram um aumento no número de correlações, evoluindo para um perfil potencialmente pró-inflamatório e regulado, com surgimento de conexões entre as células V δ 1 e as citocinas TNF, IL-2 e IL-10.

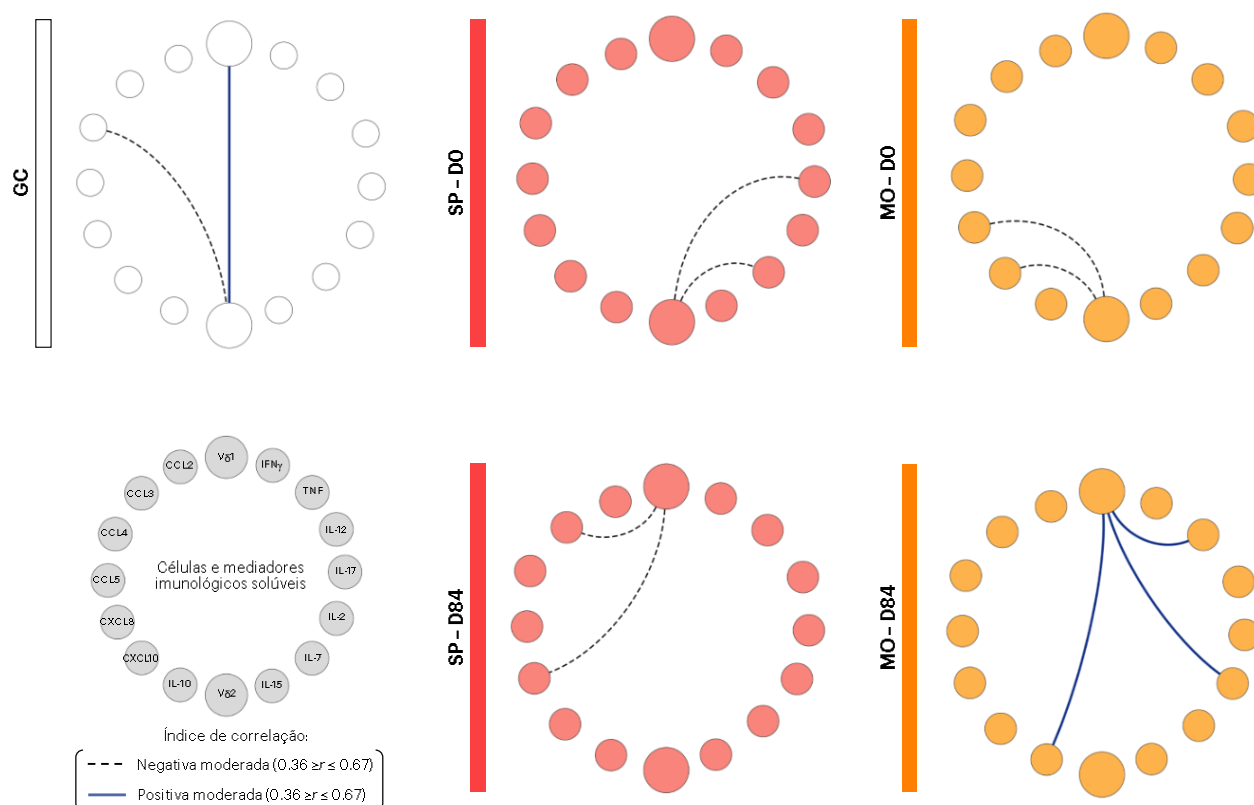


Figura 59: Redes biológicas de células T $\gamma\delta$ durante a quimioterapia de remissão. As redes integrativas foram projetadas para demonstrar as interações complexas entre células V δ 1, células V δ 2, citocinas e quimiocinas no momento do diagnóstico (D0) e ao final da quimioterapia de remissão (D84). Elipses foram utilizadas para identificar as células e os mediadores imunológicos solúveis nos grupos LLA-B SP (●), LLA-B MO (●) e grupo controle (GC, ○). As análises de correlação foram empregadas para construir as redes de acordo com a significância estatística ($p < 0.05$) e o valor de “r”, através do teste de correlação de Spearman. As linhas de conexão tracejadas (----) ilustram as correlações negativas moderadas entre os elementos, enquanto as linhas contínuas azul-escuras (—) ilustram as correlações positivas moderadas.

6. DISCUSSÃO

Evidências crescentes demonstram que as células T $\gamma\delta$ desempenham funções protetivas e não redundantes. Essa população linfocitária “pequena” é constitutivamente maior em sítios periféricos, nos quais elas contribuem para a homeostase tecidual e vigilância imunológica (236). Mais de quatro décadas após a sua descoberta, ainda permanecem enigmáticas, restando muitas questões abertas sobre a sua imunobiologia (21). O acúmulo de estudos sobre os papéis desempenhados pelas células T $\gamma\delta$ em vários microambientes de tecido e tumores, juntamente com o crescente interesse clínico em traduzi-las em imunoterapias contra o câncer, justificam a necessidade emergente de uma melhor compreensão deste tipo único de células. Aqui,

realizamos um estudo abrangente onde caracterizamos, pela primeira vez, o perfil fenotípico-funcional das células T $\gamma\delta$ humanas no contexto da LLA-B pediátrica.

Nossas descobertas oferecem *insights* básicos sobre a resposta imune a tumores hematológicos pediátricos que coletivamente apoiam a integração dessa subpopulação de linfócitos como um alvo atraente para pesquisa clínica e translacional. Primeiro, as avaliações transversais permitiram identificar que, no momento do diagnóstico, as células T $\gamma\delta$ podem não sofrer alterações numéricas expressivas na circulação sanguínea em comparação com indivíduos saudáveis, mas são capazes de aumentar de forma significativa no compartimento medular, a exemplo das células V δ 1. Alguns estudos já relataram uma infiltração maior deste subconjunto na MO de pacientes com leucemia (288,297,298). Esse aumento local já foi relacionado a uma resposta antitumoral ativa e maior sobrevida livre da doença em humanos e camundongos (263,299–302). Por outro lado, as células V δ 2 permaneceram abundantes na circulação periférica dos pacientes e não mostraram aumento expressivo na MO.

Durante as avaliações do estado de diferenciação das células T $\gamma\delta$, observamos que ambos os subconjuntos exibiram um perfil distinto ao diagnóstico. Cerca de 80% das células V δ 1 no sangue de cordão umbilical humano adotam um fenótipo T_N e reduzem para ~30% após os 2 anos de idade (275,303). Nossas análises de controle são consistentes com esses dados, uma vez que foi observado o mesmo comportamento em nossa coorte pediátrica. No entanto, os pacientes com LLA-B exibiram uma tendência de aumento no percentual de células V δ 1 T_{EMRA} à medida em que as células T_N estiveram reduzidas e esse fenômeno se mostrou presente tanto na MO quanto na circulação sanguínea, acompanhado do aumento significativo de células V δ 1 com fenótipo T_{CM} e T_{EM}.

Conforme já descrito, as células T_{EMRA} são altamente enriquecidas em tecidos e sítios inflamatórios, possuem pouca capacidade proliferativa, mas funções efectoras robustas (277,278). A aquisição desse fenótipo pelas células T $\gamma\delta$ está ligada a uma rápida eliminação de patógenos (276,304,305) e é um evento comumente observado em células T $\alpha\beta$ como um sinal da geração de células potencialmente reativas ao tumor (306–309). Semelhante às células T CD8⁺, as células V δ 1 T_{EMRA} foram ligadas a produção de IFN γ e citotoxicidade direta (310), mas ainda não está claro se elas possuem relevância funcional benéfica no contexto da leucemia, apesar de haverem sido detectadas na MO em um único estudo recentemente (297).

Muito provavelmente, a presença enriquecida de células V δ 1 com fenótipos T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA} na MO poderia ser um mecanismo para contenção rápida das CLs por reconhecimento direto e eliminação. É importante notar que, assim como observado em nosso estudo, esses subconjuntos estão significativamente aumentados e em diferentes tipos de tumores sólidos

foram preditivos de remissão contínua e resposta positiva à terapia (284,311,312). Também é importante notar que esses subconjuntos de células V δ 1 são altamente responsivos a IL-2, IL-7 e/ou IL-15 (313), citocinas homeostáticas que foram altamente detectadas na MO dos pacientes em nosso estudo.

De forma distinta, descobrimos que o subconjunto V δ 2 se manteve principalmente no estado T_N, acompanhado de uma redução considerável de células T_{EMRA}. No entanto, um aumento pequeno e significativo de células T_{CM} e T_{EM} foi observado na MO. Em pacientes adultos com leucemia aguda e crônica, já foi descrito um perfil de memória aumentado em células T $\gamma\delta$ derivadas do SP e MO, mas em contraste com nosso estudo, foi relatada uma diferenciação mais direcionada a um fenótipo principal T_{EM} (314,315). Esse fenômeno é aparentemente induzido pelo reconhecimento do tumor, já que mostrou ser independente da idade e da presença de infecções, e foi normalizado em um microambiente livre de leucemia, ou seja, em pacientes em remissão após a quimioterapia (314).

Isso é curioso e, à luz dos dados observados em nosso estudo, nos leva então a duas hipóteses: (i) como os pacientes da nossa pesquisa são pediátricos, é justificável que um fenótipo T_N enriquecido seja característico dessa fase da vida, uma vez que as células V δ 2 são mais ingênuas na infância e são diferenciadas ao longo do tempo após sinalização *via* TCR durante exposição microbiana, por exemplo (235,316,317); (ii) as células V δ 2 nos pacientes com LLA-B ao diagnóstico não são adequadamente ativadas e permanecem “aprisionadas” em um estado “*naive-like*”, com capacidade proliferativa conservada e funções efetoras limitadas (276), mas que ainda assim conseguem ser iniciadas e diferenciadas em células efetoras, conforme observado neste trabalho.

Também observamos que, no momento do diagnóstico, as células T $\gamma\delta$ conservam a expressão de NKG2D. Sua expressão simultânea com CD69 em células V δ 1 não diferiu em comparação com o GC. No entanto, as células V δ 2 aumentaram de forma considerável a expressão de NKG2D no SP e, principalmente, na MO. A glicoproteína de superfície CD69 é amplamente utilizada para rastrear a ativação precoce das células T e é regulada positivamente após a sinalização do TCR (318). Da mesma forma, NKG2D foi descoberto como um receptor importante para a ativação e citotoxicidade das células T $\gamma\delta$, e o engajamento com seus ligantes leva a regulação positiva de CD69 na superfície de membrana (255,319). Isso justifica o uso combinado de ambos os marcadores para avaliar o estado de ativação desses linfócitos.

Em células T $\gamma\delta$, NKG2D desencadeia a produção de IFN γ , TNF e liberação de grânulos citotóxicos contendo perforinas, granzimas e granulicina (20,255,319–321). Seu bloqueio reduz em cerca de 50% a capacidade das células T $\gamma\delta$ em detectar CLs *in vitro* e seu papel na resposta

antileucêmica *in vivo* já foi bem documentado (261,322,323). Células V δ 1 com expressão reduzida de NKG2D são funcionalmente comprometidas e já foram detectadas em tumor sólido, por exemplo (324). Da mesma forma, a baixa expressão desse receptor em células V δ 2 foi sugestivo de pior prognóstico em pacientes com leucemia crônica que não respondiam satisfatoriamente a quimioterapia (292). Percebemos em nosso estudo que elas aumentaram a presença de NKG2D na superfície, mas não co-expressaram CD69 de forma significativa, indicando que talvez não estejam sendo adequadamente ativadas ou estejam em um estado mais tardio de ativação, com ausência de CD69 e co-expressão de outros marcadores, como CD25 ou HLA-DR (318).

As células V δ 1 avaliadas em nosso trabalho tiveram expressão muito rara de CD56 e CD16, achado este que foi reforçado pela detecção de um alto percentual de células duplo-negativas. Estudos apontam que CD56 é um importante marcador de função citotóxica em células NK, células V δ 2 e em algumas subpopulações de células T $\alpha\beta$ (325), mas isso pode não se aplicar a células V δ 1, conforme observado em um trabalho indicando que o subconjunto mais reativo ao tumor era CD56⁻ (326). Essa descoberta não foi sustentada em outros estudos, que mostraram que células V δ 1 CD56⁺ é que são mais citotóxicas contra CLs *in vitro* e *in vivo* (263,291,327). Já a expressão de CD16 é presente nas células V δ 1, mas a ADCC mediada por esse receptor não parece ser um mecanismo comumente utilizado por esse subconjunto, que depende principalmente do TCR e dos NKRs para desempenhar a sua citotoxicidade (21,328).

Os pacientes exibiram uma expressão preferencialmente aumentada de CD56 no subconjunto V δ 2, enquanto a co-expressão de CD16 foi significativamente reduzida. Ao contrário das células V δ 1, a expressão desses marcadores em células V δ 2 é bem descrita e já foi relatada em diferentes tipos de câncer (329–335). Um estudo demonstrou que pacientes adultos com LMA possuem células V δ 2 com alta expressão de CD56 (336). Além disso, células V δ 2 expandidas *ex vivo* aumentam de forma robusta a expressão de CD56 quando estimuladas com IL-2 e/ou IL-15 e tem uma potente capacidade citotóxica *in vitro*, indicando que a presença desse marcador define células T $\gamma\delta$ com maior atividade antitumoral (337,338).

A expressão de *checkpoints* imunológicos foi distinta entre os dois subconjuntos de células T $\gamma\delta$. Um percentual muito pequeno de células V δ 1 expressava apenas CTLA4 ou PD1 e isso foi confirmado pela alta detecção de células duplo-negativas. Embora o processo de exaustão celular esteja claramente estabelecido para células T $\alpha\beta$, a capacidade das células T $\gamma\delta$ em se tornarem “exaustas” ainda é pouco clara (339). Células V δ 1 expressando PD1 já foram observadas na MO de pacientes adultos com LMA e, assim como demonstrado em nosso estudo, a presença de PD1 era maior nesse subconjunto do que em células V δ 2 (297). No

entanto, sua relevância funcional e prognóstica na leucemia não foi determinada e a sua expansão *ex vivo* para ensaios de imunoterapia resultaram em células V δ 1 com expressão mínima desses receptores inibitórios (263).

Em concordância com um trabalho recente mostrando que células T $\gamma\delta$ circulantes possuem maior expressão de CTLA4 em pacientes pediátricos com LLA (340), também observamos que as células V δ 2 expressavam de forma significativa esse receptor inibitório, enquanto nenhuma diferença foi observada na expressão de PD1. Além disso, as células co-expressando ambos os *checkpoints* imunológicos foram a segunda população mais predominante, mas diminuíram significativamente nos pacientes. A expressão de CTLA4 já foi considerada rara em células T $\gamma\delta$ (250,341). No entanto, pacientes com melanoma exibem células V δ 2 CTLA4⁺ e no contexto da imunoterapia com mAbs bloqueadores de CTLA4, foi demonstrado que o aumento de células V δ 2 se correlacionou com um benefício clínico (342), mas a relevância biológica de CTLA4 nessas células ainda é indefinida, apesar de indicar um papel imunossupressor (339).

Demonstramos que os receptores de quimiocina CXCR3 e CXCR4 são expressos de forma distinta, com maior grau de heterogeneidade em células V δ 1. No SP, essas células reduziram significativamente a expressão de CXCR3, mas aumentaram CXCR4. Em contraste, as células V δ 2 não tinham expressão considerável de CXCR3, mas regularam positivamente a expressão de CXCR4. O padrão de migração de células T $\gamma\delta$ ainda não foi totalmente caracterizado no contexto do câncer e representa uma questão importante a ser investigada (16,343). Apesar disso, um comportamento semelhante já foi observado em pacientes com HIV e em doadores saudáveis, onde as células T $\gamma\delta$ exibiram um perfil diversificado de expressão desses marcadores (296). Nossos resultados são consistentes com este último trabalho, já que as células V δ 1 e V δ 2 detectadas eram principalmente CXCR4⁺ ou duplo-positivas.

Em teoria, as células T $\gamma\delta$ que observamos na circulação sanguínea expressando esses receptores de quimiocina poderiam estar sendo recrutadas para a MO. Nossa hipótese é a de que as células V δ 1 ou, principalmente, as células V δ 2 circulantes podem ser recrutadas para a MO por meio da relação quimioatraente entre CXCR4-CXCL12 e CXCR3-CXCL10, quimiocinas altamente secretadas como consequência do aumento da inflamação intramedular induzida pelo tumor (5,344). Embora não tenhamos avaliado a presença de CXCL12, acreditamos que essa relação possa ser aplicada devido aos demais mediadores inflamatórios que foram altamente detectados no compartimento medular dos pacientes com LLA-B neste estudo.

Nossa próxima questão era se a frequência e o perfil imunológico dos subconjuntos de células T $\gamma\delta$ são modificados durante a quimioterapia de remissão. Através de análises longitudinais, investigamos então a frequência relativa de células T $\gamma\delta$ ao longo do tempo, a nível de circulação periférica e compartimento medular. Curiosamente, foi observado que os linfócitos T totais sofrem uma expansão significativa após a terapia de indução, atingindo maior nível no D84. Embora não tenhamos aprofundado a imunofenotipagem para determinar a presença de seus subconjuntos expressando CD4 ou CD8, é importante notar que uma expansão clonal de linfócitos T pode refletir uma intensa reatividade ao tumor, potencialmente precedendo uma remissão duradoura em pacientes com leucemia (345–349).

As células V δ 1 não acompanharam essa expansão ao longo da quimioterapia, pois demonstraram uma queda significativa nos pacientes com LLA-B após o diagnóstico e retornaram a um nível próximo do controle basal ao final do tratamento. Em contraste, as células V δ 2 aumentaram quase três vezes o seu percentual inicial na circulação sanguínea. Essas células se recuperaram de uma diminuição drástica no D35 para uma expansão robusta no D84, indicando uma possível proliferação clonal deste subconjunto na periferia. Esse comportamento já foi observado em pacientes adultos com LMA que, ao final da quimioterapia, demonstraram um aumento significativo no número total de células T $\gamma\delta$ circulantes (289).

Também estudamos a expressão dos marcadores de ativação ao longo do tempo. Enquanto células V δ 1 diminuíram a expressão de CD69 e NKG2D, o subconjunto V δ 2 manteve alta expressão desses marcadores. Curiosamente, também observamos que as células V δ 2 da MO aumentaram progressivamente a expressão de CD69, mas reduziram o nível de NKG2D. Isso foi confirmado pela queda no percentual de células duplo-positivas, indicando que talvez este subconjunto estivesse sendo ativado por uma via dependente do TCR e/ou alternativa ao NKG2D. Considerando que elas exibem um painel robusto de receptores de reconhecimento, é totalmente aplicável propor que outros NKRs possam atuar no reconhecimento do tumor e ativação desses linfócitos. De fato, um segundo NKR altamente envolvido na ativação de células V δ 2 é o DNAM-1 (20). Já foi demonstrado que esse subconjunto elimina CLs de forma dependente de TCR e DNAM-1, com alta produção de perforinas e granzimas (314).

Da mesma forma, as células V δ 1 não aumentaram a expressão de CD16 e CD56 ao longo do tratamento, mas as células circulantes expressando apenas CD56 ou ambos os marcadores retornaram para percentuais próximos da linha de base do GC no D84. Em contraste, as células V δ 2 aumentaram significativamente a presença de seus subconjuntos expressando CD16 e CD56 dentro da MO, sugerindo um aumento na capacidade citotóxica. Esse fenômeno já foi descrito como sendo relevante para a atividade antitumoral das células V δ 2 (331,335). Isso abre

uma perspectiva clínica muito importante, visto que atualmente há diferentes imunoterapias baseadas em Acs monoclonais direcionados a células B malignas, as quais estão sendo testadas e validadas à luz das funções efetoras das células T $\gamma\delta$ (16,21,257,339).

Confirmamos que a expressão dos *checkpoints* imunológicos CTLA4 e PD1 reduziu de maneira significativa em células V δ 1 e que isso refletiu em um aumento considerável na frequência de células duplo-negativas. Surpreendentemente, foi observado um comportamento inverso no subconjunto V δ 2, que diminuiu a expressão de CTLA4 e aumentou a expressão de PD1. Além disso, houve um aumento no número de células V δ 2 que não expressavam nenhum dos marcadores avaliados.

Conforme já destacado, o significado da expressão de PD1 e CTLA4 em células T $\gamma\delta$ ainda é muito controverso. De fato, a regulação positiva de PD1 em células T $\gamma\delta$ parece diminuir sua capacidade de produzir IFN γ *in vitro* (350), por exemplo. No entanto, um mero aumento na expressão desses receptores inibitórios por si só não define completamente um estado ligado à exaustão, mas pode indicar uma hiperativação desses linfócitos (351). Em pacientes adultos com LMA, as células V δ 2 PD1⁺ produzem mais IFN γ e TNF do que sua contraparte PD1⁻ (352). Da mesma forma, já foi relatado que elas são funcionalmente mais ativas, produzem maiores concentrações de IL-2 e são altamente citotóxicas (353). Portanto, considerando que as células V δ 2 avaliadas em nosso estudo aumentaram a expressão de PD1, juntamente com CD69, CD16 e CD56, é mais plausível propor que esses linfócitos estejam mais próximos de um estado hiperativo e não de exaustão celular.

A enorme complexidade do sistema de quimiocinas e seus receptores, sua redundância aparente, bem como, em alguns casos, papéis contraditórios durante o desenvolvimento do tumor têm dificultado até agora uma compreensão integrada de sua importância na resposta das células T em pacientes com leucemia. Demonstramos que as células V δ 1 da MO reduziram a expressão de CXCR3 e CXCR4, resultando em um percentual elevado de células duplo-negativas após o D35. Na circulação sanguínea, esse subconjunto também manteve baixo a expressão de CXCR3 e conservou uma alta expressão de CXCR4 que pareceu diminuir ao final da quimioterapia, indicando um possível retorno a linha de base do GC. Em contraste, as células V δ 2 regularam positivamente a expressão de CXCR3 e mantiveram alta a expressão de CXCR4 no SP durante o tratamento.

O receptor de quimiocina CXCR3, juntamente com seus ligantes (ex.: CXCL10), são intimamente ligados a um perfil de resposta do tipo Th1 (354,355). Em tumores, CXCR3 está ligado ao recrutamento de células T CD8⁺/NK (356–358) e se correlaciona com a mobilização de TILs, menor ocorrência de metástases e sobrevida melhorada (359–361). Além disso,

CXCR4 aumenta a migração de células T CD8⁺ citotóxicas em direção a MO e essa mobilização confere maior expansão efetora e proteção antitumoral em modelos murinos de linfoma, por exemplo (362). Neste contexto, podemos propor que as células T $\gamma\delta$ reativas ao tumor regulam fortemente esses marcadores, resultando em *homing* para o microambiente leucêmico e uma possível resposta do tipo Th1. O recrutamento de células V δ 1 e V δ 2 no câncer já foi observado, mas até então poucos estudos investigaram os receptores responsáveis por essas habilidades migratórias (296,363–366).

O perfil de maturação fenotípica das células T $\gamma\delta$ mostrou que ao longo do tempo o subconjunto V δ 1 da MO aumentou a presença de um fenótipo T_N e reduziu o percentual de células T_{CM} e T_{EMRA}, seguido por recuperação ao longo do tempo. Além disso, o percentual de células T_{EM} foi menor durante o tratamento e mostrou tendência de aumento ao final da quimioterapia. Enquanto isso, as células V δ 1 circulantes com fenótipos T_N, T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA} apresentaram oscilações, mas com um aumento consistente em determinados pontos. Da mesma forma, as células V δ 2 mantiveram alto um fenótipo T_N durante todo o tratamento, mas reduziram significativamente a presença do subconjunto T_{EMRA}. Além disso, esses linfócitos aumentaram a frequência de subconjuntos T_{CM} e T_{EM} no SP, enquanto os diminuíram na MO.

Um maior número de células T $\gamma\delta$ *naive* já foi observado em pacientes com leucemia crônica ao diagnóstico e após o tratamento (367). Esse fenômeno foi mais evidente durante o co-cultivo com CLs, que resultou em uma expansão global de células V δ 2 CD45RA⁺ CD27⁺, consistente com um fenótipo ingênuo (367). Além disso, esse subconjunto produzia concentrações maiores de IFN γ , enquanto nenhuma diferença foi observada no subconjunto T_{EMRA}, por exemplo. O percentual dessas células T $\gamma\delta$ *naive* IFN γ ⁺ foi notavelmente maior em pacientes estáveis e foram correlacionadas a uma resposta satisfatória ao tratamento (367). Ainda faltam muitos estudos mecanicistas para entender o impacto dessa remodelação fenotípica observada nas células T $\gamma\delta$ em nosso trabalho. Nossa hipótese é a de que o microambiente do tumor e a quimioterapia são potenciais fatores que modulam a diferenciação e funcionalidade desses linfócitos, como já observado em alguns estudos (368–370).

Nossa próxima pergunta foi se a carga tumoral ao diagnóstico estaria potencialmente ligada a frequência relativa das células T $\gamma\delta$ e seu perfil imunológico. Devido ao pequeno número de pacientes e aos eventos relativamente raros, alguns dados não demonstraram diferenças significativas entre os grupos e houve limitações para uma análise mais extensa e conclusiva em alguns parâmetros. Apesar disso, pacientes com carga leucêmica alta no SP exibiram um maior percentual de células V δ 1, enquanto aqueles com carga leucêmica baixa

mostraram maior frequência de células V δ 2. Na MO, o comportamento das células T $\gamma\delta$ foi semelhante entre os dois grupos de pacientes e não revelou diferenças consideráveis.

Uma razão V δ 1/V δ 2 invertida já foi detectada em tumores sólidos e doenças infecciosas (371–373). Em populações saudáveis, o subconjunto V δ 2 geralmente predomina na circulação periférica. Na doença, essa predominância pode ser modificada pela expansão de células V δ 1. Isso poderia ser explicado pela rápida proliferação clonal deste último subconjunto mais "adaptativo" após desafios antigênicos durante a progressão tumoral ou infecções, enquanto a população V δ 2 mais "inata" não prolifera sob estimulação crônica e sofre morte celular induzida por ativação (265,374). A hipótese é a de que o equilíbrio V δ 1/V δ 2 pode ser distorcido durante a tumorigênese e pelo microambiente do tumor (324,371,375), resultando em uma quebra dessa razão V δ 1/V δ 2 no SP dos pacientes com alta carga leucêmica, como observado em nosso estudo, por exemplo. No entanto, mais evidências científicas são necessárias para certificar esta hipótese.

Nossas análises permitiram identificar que, ao contrário dos pacientes com baixa carga leucêmica, os pacientes com alta carga tumoral mostraram redução de células V δ 1 NKG2D⁺ e aumento de células V δ 1 duplo-negativas na MO. Além disso, as células V δ 2 nesse compartimento expressavam mais CD69, mas não NKG2D, reduzindo o percentual de células duplo-positivas. As células V δ 1 também diminuíram a expressão de CD56 enquanto o subconjunto V δ 2 aumentaram o fenótipo duplo-negativo. Essa redução de receptores de ativação e citotoxicidade foi acompanhada pela queda de CTLA4 e PD1 nas células V δ 1, indicando que estes marcadores podem não indicar um estado de exaustão neste subconjunto. Também foi observado maior nível de CXCR3 e menor expressão de CXCR4 em células V δ 1 circulantes, sugerindo capacidade migratória para a MO reduzida. As células V δ 1 T_N, T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA} permaneceram aumentadas no SP, mas reduziram o fenótipo T_{EMRA} na MO. Em contraste, as células V δ 2 diminuíram o fenótipo T_N e aumentaram o fenótipo T_{EMRA} na MO.

Esses dados oferecem uma visão abrangente sobre as mudanças funcionais e fenotípicas das células T $\gamma\delta$ nos pacientes com LLA-B, com implicações importantes para entender o impacto que a carga leucêmica exerce sobre esse subconjunto de linfócitos. A diminuição dos marcadores de ativação e citotoxicidade reforçam a nossa interpretação de que a ausência de funções efetoras nas células V δ 1 e V δ 2 pode favorecer o crescimento do tumor. Um achado importante que apoia essa ideia é a expressão reduzida de CXCR4, que sugere que essas células estão mais propensas a permanecer no SP do que migrar para a MO, possivelmente reduzindo sua resposta antitumoral nesse compartimento. Da mesma forma, a baixa expressão de *checkpoints* imunológicos, geralmente associados à exaustão de células T, apontam para uma

imunossupressão funcional que deriva do próprio microambiente, o qual amortece a capacidade das células T $\gamma\delta$ em serem ativadas e de desempenhar sua atividade citotóxica.

Ao avaliar a frequência das células T $\gamma\delta$ de acordo com o grupo de risco, foi observado que a frequência de células V δ 1 circulantes foi similar entre os pacientes. No entanto, o grupo AR exibiu um percentual significativamente maior de células V δ 2 circulantes, evidenciando uma expansão desse subconjunto com a progressão da doença. Na MO, observou-se uma tendência de maior frequência de ambos os subconjuntos no grupo AR. No entanto, essa diferença não foi significativa e pode indicar a necessidade de um maior número amostral para melhor análise. A proliferação de células T $\gamma\delta$, portando particularmente o TCR V δ 1, já foi observada no SP de pacientes adultos com LLC classificados em estágios equivalentes ao alto risco (376,377). Além disso, uma menor frequência desse subconjunto já foi relatada em pacientes de baixo risco que, ao longo do tempo, tiveram um pior prognóstico e foram classificados como alto risco (261). Nosso estudo é o primeiro a reportar uma frequência elevada de células V δ 2 no SP de pacientes pediátricos com LLA-B de alto risco.

Diferentemente do grupo BR, os pacientes de alto risco apresentaram células V δ 1 com menor expressão de CD69 e NKG2D, sugerindo uma possível redução na ativação funcional. No caso das células V δ 2, observamos um aumento na expressão de CD69, junto a uma frequência elevada de células duplo-negativas, evidenciando uma dinâmica heterogênea, possivelmente relacionada à coexistência de células ativas e células potencialmente suprimidas. As células V δ 2 também regularam positivamente a expressão única de CD16 ou CD56 no SP, mas aumentaram a presença de células duplo-negativas na MO, sugerindo uma possível modulação funcional no microambiente da medula. Da mesma forma, as células V δ 1 tinham maior expressão desses marcadores no SP, enquanto diminuíram na MO. Houve diminuição de células V δ 1 CTLA4⁺ ou PD1⁺ e aumento de células duplo-positivas no SP, enquanto as células V δ 2 circulantes aumentaram a expressão única de CTLA4 ou PD1. Na MO, essas células tiveram comportamento semelhante, diminuindo a expressão de CTLA4 e aumentando a expressão de PD1. Além disso, observamos mais células T $\gamma\delta$ CXCR3⁺ ou duplo-negativas no grupo AR, com células V δ 1 T_N e T_{EM} aumentadas e células T_{CM} e T_{EMRA} diminuídas, enquanto as células V δ 2 aumentaram a presença de seus subconjuntos T_{CM}, T_{EM} e T_{EMRA}.

Ao investigarmos se a frequência e o perfil imunológico das células T $\gamma\delta$ são modificados nos pacientes com presença ou ausência de DRM medular ao final da terapia de indução, observamos que o percentual dos subconjuntos V δ 1 e V δ 2 não era significativamente alterado. Os pacientes DRM⁽⁺⁾ exibiram células T $\gamma\delta$ com expressão reduzida de marcadores de ativação

e citotoxicidade, além da maior expressão de CTLA4. Além disso, observamos que, na MO, houve maior expressão de CXCR3 e CXCR4 em células V δ 1, enquanto o subconjunto V δ 2 reduziu a expressão de CXCR3 e CXCR4. Também foi observado um aumento no fenótipo T_N em células V δ 1 e diminuição de células V δ 2 T_{CM} e T_{EMRA}. Em pacientes adultos com LMA, uma maior frequência de células T $\gamma\delta$ circulantes foi relatada naqueles que apresentavam DRM em comparação com aqueles que alcançaram a remissão completa (289). Um estudo recente em pacientes com LLA infantil observou uma correlação negativa entre a frequência de células T $\gamma\delta$ circulantes e a ocorrência de DRM (378). Nosso estudo explorou particularmente o compartimento da MO, devido à escassez de dados e por não haver estudos deste porte até o momento. Mais investigações longitudinais integrando análises de MO e SP serão necessárias para confirmar nossas observações.

Finalmente, as análises das redes integrativas de células T $\gamma\delta$ exibiram mudanças notáveis. Primeiro, mostramos que no GC existe uma correlação positiva entre os subconjuntos de células T $\gamma\delta$, além de uma correlação negativa entre o subconjunto V δ 2 e CCL4. Essa relação sugere que células V δ 1 e V δ 2 atuam de forma sinérgica ou complementar na manutenção da homeostase imunológica. Esse equilíbrio pode ser crucial para responder de forma eficiente a desafios imunológicos no início da vida, seja nos tecidos ou no sangue (236). Uma alta produção de CCL4 já foi atribuída a esses linfócitos durante a resposta imune contra patógenos (379,380). Particularmente, as células V δ 2 expressam muito CCR5, que é um receptor para CCL4 e que está ligado a um perfil de resposta do tipo Th1 (363). Além disso, essa quimiocina já foi ligada ao recrutamento de células T $\gamma\delta$ no câncer (381).

Em seguida, percebemos que, ao diagnóstico, os pacientes com LLA-B mantêm conexões derivadas de células V δ 2 no SP e na MO. Inicialmente, observamos correlações negativas com as citocinas IL-7 e IL-17 no SP, e com as quimiocinas CXCL8 e CXCL10 na MO. A IL-7 é uma citocina homeostática fundamental para a sobrevivência das células T $\gamma\delta$ (382). Curiosamente, essa citocina atua na expansão de células T $\gamma\delta$ na infância, mas não na vida adulta (383) e mostrou induzir a produção de IL-17 nesses linfócitos (382). Talvez, um alto consumo de IL-7 por células T $\alpha\beta$ ou até mesmo pelas CLs, possa potencialmente competir com as células V δ 2 circulantes por essa sinalização, resultando em correlação negativa. A mesma hipótese pode ser aplicada para CXCL8 e CXCL10, resultando na menor disponibilidade desses mediadores para interagir com as células V δ 2. Além disso, é importante notar que, em nosso estudo, as células V δ 2 exibiram menor expressão de CXCR3 na MO ao D0, indicando que

presenças menores de receptores para essas quimiocinas podem reduzir sua resposta a esses sinais.

Mais tardiamente, ao D84, as conexões passaram a derivar de células V δ 1, tanto no SP como na MO. Foi observado correlações negativas entre este subconjunto e as quimiocinas CCL3 e CXCL8 no SP. Esse subconjunto expressa CXCR1, que é um receptor para CXCL8 (363), e secreta CCL3 quando ativado (379,384). A presença dessas conexões pode sugerir que as células V δ 1 estejam possivelmente ajudando a modular a inflamação e a restaurar a homeostase periférica. Talvez, isso possa ocorrer porque o tratamento reduz a carga tumoral e, consequentemente, a inflamação associada. Em contraste, na MO, as células V δ 1 mostraram correlações positivas com as citocinas TNF, IL-2 e IL-10. Essas conexões podem indicar que o subconjunto V δ 1 pode estar potencialmente mais ativado e contribuindo para a resposta antitumoral na MO e controle imunológico local. As citocinas TNF, IL-2 e IL-10, produzidas por células V δ 1 após ativação, suportam a sua expansão e citotoxicidade (16) mas também regulam a inflamação (385).

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Durante o desenvolvimento do presente estudo, houve alguns fatores limitantes, como (i) um tamanho amostral relativamente pequeno de pacientes pediátricos; (ii) a ausência de acesso a amostras de MO saudáveis, que resultou em uma lacuna durante a investigação do perfil imunológico; e (iii) um painel limitado de marcadores disponíveis para aprofundar a análise fenotípica e funcional dos subconjuntos de células T $\gamma\delta$. Com isso, temos como perspectivas a realização de um estudo mais robusto com um número amostral mais elevado, com foco particular em testes funcionais *in vitro*, adotando um painel de imunofenotipagem ainda mais ampliado. Além disso, nossa expectativa é aprofundar as análises estatísticas para uma caracterização completa da rede de sinalização entre as citocinas, quimiocinas e o perfil fenotípico e funcional das células T $\gamma\delta$ analisadas neste estudo, para entender as interações entre esses linfócitos e o microambiente leucêmico.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente projeto de pesquisa emergiu da necessidade de entender as muitas características imunobiológicas de um tipo único de células T, que já está sendo largamente traduzido em pesquisas clínicas e translacionais (16,19,21,339,386,387). É necessária uma compreensão aprofundada do funcionamento da vigilância imunológica na leucemia e seus

impactos clínicos. Isso envolve não apenas a descoberta de ligantes tumorais ainda desconhecidos e mecanismos efetores utilizados por células T $\gamma\delta$, mas também estudos adicionais em pacientes adultos e pediátricos, com comparações relevantes em doadores saudáveis, devido à baixa quantidade de informações translacionais da pesquisa com esses linfócitos T em modelos não-humanos.

Nosso trabalho identifica um papel atraente para as células T $\gamma\delta$ na detecção e eliminação de CLs, que, em última análise, aumenta as respostas antitumorais no sítio primário da doença e na periferia. Os dados apresentados aqui fornecem uma boa justificativa para explorar se os subconjuntos V δ 1 e V δ 2 podem ser utilizados em um ambiente clínico para auxiliar no desenvolvimento de novas plataformas de imunoterapia direcionadas a leucemia. Levando em conta todas as limitações apontadas, as observações feitas neste estudo devem ser interpretadas com cautela até que sejam validadas em uma coorte maior e com metodologias ainda mais robustas. Mas ainda assim, expandimos o conhecimento sobre a atividade antileucêmica das células V δ 1 e V δ 2 ao demonstrar suas mudanças fenotípicas e funcionais antes, durante e após o tratamento quimioterápico. Finalmente, nossos dados indicaram que:

- As células V δ 1 e V δ 2 estão significativamente aumentadas na MO e SP de pacientes com LLA-B, indicando uma expansão de células T $\gamma\delta$ potencialmente protetiva;
- O subconjunto V δ 2 possui expressão elevada de receptores de ativação e citotoxicidade (CD69, NKG2D e CD56) ao diagnóstico, sugerindo maior capacidade antitumoral;
- As células T $\gamma\delta$ exibem pouca expressão de *checkpoints* imunológicos (CTLA4 e PD1) ao diagnóstico, compatível com menor susceptibilidade à exaustão;
- As células T $\gamma\delta$ aumentam a expressão de CXCR4, indicando recrutamento ativo para o compartimento medular durante o desenvolvimento do tumor;
- Ao longo do tratamento, os pacientes com LLA-B exibem uma expansão robusta de linfócitos T acompanhada pelo aumento de células V δ 2, indicando uma recuperação imunológica e ativação linfocitária;
- As células V δ 2 mantém elevada a expressão de CD69, NKG2D e CD16 no SP durante o tratamento, mas reduzem a expressão de CD56 e NKG2D na MO, o que sugere maior ativação na periferia;
- O subconjunto V δ 1 diminui a expressão de *checkpoints* imunológicos durante o tratamento, enquanto as células V δ 2 aumentam a expressão de PD1, sugerindo maior ativação e não exaustão;

- A expressão de CXCR3 e CXCR4 por células Vδ2 aumenta durante a quimioterapia, indicando aquisição de um fenótipo Th1 e maior recrutamento para a MO;
- Pacientes com baixa carga leucêmica ao diagnóstico mostraram maior presença de células Vδ1 NKG2D⁺ e células Vδ2 CD69⁺ NKG2D⁺. Além disso, também exibiram maior presença de células Vδ1 CTLA4⁺ ou CTLA4⁺ PD1⁺, assim como maior frequência de células Vδ1 CXCR4⁺ circulantes;
- Em pacientes com alta carga leucêmica, foi detectado maior presença de células Vδ1 CXCR3⁺ circulantes;
- Pacientes de alto risco mostraram maior frequência de células Vδ2 circulantes com fenótipo T_{EM} predominante, além da presença aumentada de células Vδ1 CD69⁻ NKG2D⁻ na MO e SP;
- Pacientes de baixo risco exibiram maior frequência de células Vδ1 NKG2D⁺ circulantes e maior número de células Vδ1 CTLA4⁺ na MO;
- Pacientes DRM⁽⁻⁾ possuem maior percentual de células Vδ1 CXCR3⁻ CXCR4⁻ na MO.

Em conclusão, as células T γδ representam um campo potencial de pesquisa na leucemia. Essas descobertas podem estimular o desenvolvimento de novas terapêuticas e apoiar o melhoramento de tratamentos já existentes, como a terapia de bloqueio de *checkpoints* imunológicos e o uso de células T geneticamente modificadas. Estudos futuros devem explorar ainda mais a capacidade funcional de cada subconjunto de células T γδ e entender como eles podem interagir com diferentes elementos do microambiente leucêmico e, em última análise, seu potencial como um biomarcador de prognóstico na LLA-B.

9. FINANCIAMENTO E INFRAESTRUTURA

Este projeto foi desenvolvido com recursos provenientes de Projeto de Pesquisa aprovado no Âmbito do Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO), Resolução N° 002/2008, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM). Foi realizado nas dependências do Hemocentro do Estado do Amazonas - Fundação HEMOAM, através do uso da Plataforma de Citometria de Fluxo do Laboratório de Marcadores Celulares. Além disso, foi executado em parceria com o Laboratório de Biomarcadores do IRR/Fiocruz-Minas, que juntos deram todo o suporte técnico necessário para a realização desta pesquisa.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Terwilliger T, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer J.* 2017;7(6):e577.
2. Teachey DT, Pui CH. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* março de 2019;20(3):e142–54.
3. Whiteley AE, Price TT, Cantelli G, Sipkins DA. Leukaemia: a model metastatic disease. *Nat Rev Cancer.* julho de 2021;21(7):461–75.
4. Witkowski MT, Kousteni S, Aifantis I. Mapping and targeting of the leukemic microenvironment. *J Exp Med.* 3 de fevereiro de 2020;217(2).
5. Curran EK, Godfrey J, Kline J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends Immunol.* 1º de julho de 2017;38(7):513–25.
6. Lustfeld I, Altvater B, Ahlmann M, Ligges S, Brinkrolf P, Rosemann A, et al. High Proportions of CD4+ T Cells among Residual Bone Marrow T Cells in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Are Associated with Favorable Early Responses. *Acta Haematol.* 2014;131(1):28–36.
7. Traxel S, Schadt L, Eyer T, Mordasini V, Gysin C, Munthe LA, et al. Bone marrow T helper cells with a Th1 phenotype induce activation and proliferation of leukemic cells in precursor B acute lymphoblastic leukemia patients. *Oncogene.* março de 2019;38(13):2420–31.
8. Palen K, Thakar M, Johnson BD, Gershan JA. Bone Marrow-derived CD8+ T Cells From Pediatric Leukemia Patients Express PD1 and Expand Ex Vivo Following Induction Chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol.* novembro de 2019;41(8):648–52.
9. Radpour R, Riether C, Simillion C, Höpner S, Bruggmann R, Ochsenbein AF. CD8+ T cells expand stem and progenitor cells in favorable but not adverse risk acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1º de outubro de 2019;33(10):2379–92.
10. Hohtari H, Brück O, Blom S, Turkki R, Sinisalo M, Kovanen PE, et al. Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL. *Leukemia.* 1º de julho de 2019;33(7):1570–82.
11. Bolouri H, Ries RE, Wiedeman AE, Hylkema T, Scheiding S, Gersuk VH, et al. Inflammatory bone marrow signaling in pediatric acute myeloid leukemia distinguishes patients with poor outcomes. *Nat Commun.* 23 de novembro de 2022;13(1):7186.
12. Brummel K, Eerkens AL, De Bruyn M, Nijman HW. Tumour-infiltrating lymphocytes: from prognosis to treatment selection. *Br J Cancer.* 2 de fevereiro de 2023;128(3):451–8.
13. Borrello I, Noonan KA. Marrow-Infiltrating Lymphocytes – Role in Biology and Cancer Therapy. *Front Immunol* [Internet]. 30 de março de 2016 [citado 6 de novembro de 2024];7. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00112/abstract>
14. Wei L, Wang Z, Zhang Z, Li Y, Fan S, Zhao Y, et al. Assessment of the presence and anti-tumor potential of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Manag Res.* abril de 2019;Volume 11:3187–96.

15. De Araújo ND, Gama FM, De Souza Barros M, Ribeiro TLP, Alves FS, Xabregas LA, et al. Translating Unconventional T Cells and Their Roles in Leukemia Antitumor Immunity. Zhang XL, organizador. *J Immunol Res*. 7 de janeiro de 2021;2021:1–15.
16. Barros MDS, De Araújo ND, Magalhães-Gama F, Pereira Ribeiro TL, Alves Hanna FS, Tarragô AM, et al. $\gamma\delta$ T Cells for Leukemia Immunotherapy: New and Expanding Trends. *Front Immunol*. 22 de setembro de 2021;12:729085.
17. Zamora AE, Crawford JC, Allen EK, Guo X zhi J, Bakke J, Carter RA, et al. Pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia generate abundant and functional neoantigen-specific CD8⁺ T cell responses. *Sci Transl Med*. 26 de junho de 2019;11(498):eaat8549.
18. Bailur JK, McCachren SS, Pendleton K, Vasquez JC, Lim HS, Duffy A, et al. Risk-associated alterations in marrow T cells in pediatric leukemia. *JCI Insight*. 20 de agosto de 2020;5(16):e140179.
19. Silva-Santos B, Mensurado S, Coffelt SB. $\gamma\delta$ T cells: pleiotropic immune effectors with therapeutic potential in cancer. *Nat Rev Cancer*. 1º de julho de 2019;19(7):392–404.
20. Simões AE, Di Lorenzo B, Silva-Santos B. Molecular determinants of target cell recognition by human $\gamma\delta$ T cells. *Front Immunol*. 2018;9(APR):1–7.
21. Mensurado S, Blanco-Domínguez R, Silva-Santos B. The emerging roles of $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. março de 2023;20(3):178–91.
22. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21(8):938–45.
23. Tosolini M, Pont F, Poupot M, Vergez F, Nicolau-Travers ML, Vermijlen D, et al. Assessment of tumor-infiltrating TCRV γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. *OncoImmunology*. 4 de março de 2017;6(3).
24. Pawlik-Gwozdecka D, Zieliński M, Sakowska J, Adamkiewicz-Drożyńska E, Trzonkowski P, Niedźwiecki M. CD8⁺ gamma-delta T cells correlate with favorable prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Sci*. 1º de março de 2021;17(2):561–3.
25. Lin L, Yan L, Liu Y, Yuan F, Li H, Ni J. Incidence and death in 29 cancer groups in 2017 and trend analysis from 1990 to 2017 from the Global Burden of Disease Study. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. dezembro de 2019;12(1):96.
26. Fitzmaurice C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, Dicker DJ, et al. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *JAMA Oncol*. 1º de abril de 2017;3(4):524.
27. 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. Jabbour E, organizador. *PLoS ONE*. 22 de agosto de 2019;14(8):e0221518.

28. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Moreno F, Dolya A, Bray F, et al. International incidence of childhood cancer, 2001–10: a population-based registry study. *Lancet Oncol.* junho de 2017;18(6):719–31.
29. Pui CH, Yang JJ, Bhakta N, Rodriguez-Galindo C. Global efforts toward the cure of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Child Adolesc Health.* junho de 2018;2(6):440–54.
30. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer.* 1º de agosto de 2018;18(8):471–84.
31. Averill LW, Acikgoz G, Miller RE, Kandula VVR, Epelman M. Update on Pediatric Leukemia and Lymphoma Imaging. *Semin Ultrasound CT MRI.* dezembro de 2013;34(6):578–99.
32. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* janeiro de 2022;72(1):7–33.
33. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394–424.
34. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol.* janeiro de 2018;5(1):e14–24.
35. Du M, Chen W, Liu K, Wang L, Hu Y, Mao Y, et al. The Global Burden of Leukemia and Its Attributable Factors in 204 Countries and Territories: Findings from the Global Burden of Disease 2019 Study and Projections to 2030. Ilic I, organizador. *J Oncol.* 25 de abril de 2022;2022:1–14.
36. Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med.* junho de 2020;10(6):a034819.
37. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Instituto Nacional de Câncer - INCA. [citado 6 de novembro de 2024]. Estimativa 2023-2025. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/apresentacao>
38. Santos MDO. 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. *Rev Bras Cancerol.* 15 de fevereiro de 2019;64(3):439–40.
39. Santos MDO. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. *Rev Bras Cancerol.* 30 de março de 2018;64(1):119–20.
40. 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.* fevereiro de 2010;126(3):715–20.
41. 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.* 17 de fevereiro de 2016;33(2):83–93.

42. 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*. janeiro de 2011;56(1):58–64.
43. Vieira AF, Neves B, Tonelli SR. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA LEUCEMIA LINFOIDE NAS REGIÕES DO BRASIL. *UNILUS Ensino E Pesqui*. 31 de março de 2018;14(37):130–43.
44. Balmant NV, de Souza Reis R, de Oliveira Santos M, Pinto Oliveira J, de Camargo B. Trends in Cancer Mortality Among Adolescents and Young Adults in Brazil. *J Adolesc Young Adult Oncol*. junho de 2017;6(2):341–7.
45. Haouas H, Haouas S, Hafsia A. A retrospective study of leukemia epidemiology in Northern Tunisia. *Hematology*. maio de 2011;16(3):151–4.
46. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer*. 15 de outubro de 1988;42(4):511–20.
47. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Dis Primer*. 10 de março de 2016;2(1):16010.
48. Greaves MF, Pegram SM, Chan LC. Collaborative group study of the epidemiology of acute lymphoblastic leukaemia subtypes: Background and first report. *Leuk Res*. janeiro de 1985;9(6):715–33.
49. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol E Med Lab*. 2004;40(2):91–8.
50. Mullighan CG. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematology*. 5 de dezembro de 2014;2014(1):174–80.
51. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol*. abril de 2019;16(4):227–40.
52. Omar AA, Basiouny L, Elnoby AS, Zaki A, Abouzid M. St. Jude Total Therapy studies from I to XVII for childhood acute lymphoblastic leukemia: a brief review. *J Egypt Natl Cancer Inst*. dezembro de 2022;34(1):25.
53. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2013;45(3):242–52.
54. Buffler PA, Kwan ML, Reynolds P, Urayama KY. Environmental and Genetic Risk Factors for Childhood Leukemia: Appraising the Evidence. *Cancer Invest*. janeiro de 2005;23(1):60–75.
55. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect*. janeiro de 2007;115(1):138–45.
56. Schmidt JA, Hornhardt S, Erdmann F, Sánchez-García I, Fischer U, Schüz J, et al. Risk Factors for Childhood Leukemia: Radiation and Beyond. *Front Public Health*. 24 de dezembro de 2021;9:805757.
57. Bhatia S, Sklar C. Second cancers in survivors of childhood cancer. *Nat Rev Cancer*. fevereiro de 2002;2(2):124–32.

58. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *The Lancet*. janeiro de 2000;355(9199):165–9.
59. Hijiya N, Ness KK, Ribeiro RC, Hudson MM. Acute leukemia as a secondary malignancy in children and adolescents: Current findings and issues. *Cancer*. janeiro de 2009;115(1):23–35.
60. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol*. 1º de fevereiro de 1997;70(830):130–9.
61. Kendall GM, Little MP, Wakeford R, Bunch KJ, Miles JCH, Vincent TJ, et al. A record-based case-control study of natural background radiation and the incidence of childhood leukaemia and other cancers in Great Britain during 1980–2006. *Leukemia*. janeiro de 2013;27(1):3–9.
62. Herkert CMM, Cardoso AIDQ, Carvalho AMAC. Fontes de radiação não ionizante e casos de leucemia infantil: uma revisão integrativa. *Res Soc Dev*. 3 de outubro de 2021;10(13):e19101320745.
63. Ghosh T, Richardson M, Ryder J, Spector L, Turcotte L. Abstract 3118: Obesity as a risk factor for pediatric acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer Res*. 1º de julho de 2019;79(13_Supplement):3118–3118.
64. Cobaleda C, Vicente-Dueñas C, Sanchez-Garcia I. Infectious triggers and novel therapeutic opportunities in childhood B cell leukaemia. *Nat Rev Immunol*. setembro de 2021;21(9):570–81.
65. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. janeiro de 2018;118(1):127–37.
66. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer*. março de 2006;6(3):193–203.
67. Kinlen L. EVIDENCE FOR AN INFECTIVE CAUSE OF CHILDHOOD LEUKAEMIA: COMPARISON OF A SCOTTISH NEW TOWN WITH NUCLEAR REPROCESSING SITES IN BRITAIN. *The Lancet*. dezembro de 1988;332(8624):1323–7.
68. Linet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, Check D, Ostroumova E, Landgren A, et al. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0–19 years. *Int J Cancer*. 15 de abril de 2016;138(8):1862–74.
69. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. junho de 2015;12(6):344–57.
70. Ferrando AA, López-Otín C. Clonal evolution in leukemia. *Nat Med*. outubro de 2017;23(10):1135–45.
71. Fischer U, Yang JJ, Ikawa T, Hein D, Vicente-Dueñas C, Borkhardt A, et al. Cell Fate Decisions: The Role of Transcription Factors in Early B-cell Development and Leukemia. *Blood Cancer Discov*. 1º de novembro de 2020;1(3):224–33.

72. Gocho Y, Yang JJ. Genetic defects in hematopoietic transcription factors and predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 5 de setembro de 2019;134(10):793–7.
73. Ford AM, Bennett CA, Price CM, Bruin MCA, Van Wering ER, Greaves M. Fetal origins of the *TEL-AML1* fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 14 de abril de 1998;95(8):4584–8.
74. Hein D, Dreisig K, Metzler M, Izraeli S, Schmiegelow K, Borkhardt A, et al. The preleukemic TCF3-PBX1 gene fusion can be generated in utero and is present in $\approx 0.6\%$ of healthy newborns. *Blood*. 17 de outubro de 2019;134(16):1355–8.
75. Wiemels J, Cazzaniga G, Daniotti M, Eden O, Addison G, Masera G, et al. Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *The Lancet*. outubro de 1999;354(9189):1499–503.
76. Hong D, Gupta R, Ancliff P, Atzberger A, Brown J, Soneji S, et al. Initiating and Cancer-Propagating Cells in *TEL-AML1* -Associated Childhood Leukemia. *Science*. 18 de janeiro de 2008;319(5861):336–9.
77. Castor A, Nilsson L, Åstrand-Grundström I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. junho de 2005;11(6):630–7.
78. Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, Auer F, González-Herrero I, García-Ramírez I, et al. Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of *Pax5* -Inherited Susceptibility. *Cancer Discov*. 1º de dezembro de 2015;5(12):1328–43.
79. Qian M, Xu H, Perez-Andreu V, Roberts KG, Zhang H, Yang W, et al. Novel susceptibility variants at the ERG locus for childhood acute lymphoblastic leukemia in Hispanics. *Blood*. 14 de fevereiro de 2019;133(7):724–9.
80. Papaemmanuil E, Hosking FJ, Vijayakrishnan J, Price A, Olver B, Sheridan E, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. setembro de 2009;41(9):1006–10.
81. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. abril de 2007;446(7137):758–64.
82. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of *IKZF1* and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 29 de janeiro de 2009;360(5):470–80.
83. Perez-Garcia A, Ambesi-Impiombato A, Hadler M, Rigo I, LeDuc CA, Kelly K, et al. Genetic loss of SH2B3 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 3 de outubro de 2013;122(14):2425–32.
84. Rodríguez-Hernández G, Hauer J, Martín-Lorenzo A, Schäfer D, Bartenhagen C, García-Ramírez I, et al. Infection Exposure Promotes *ETV6-RUNX1* Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Res*. 15 de agosto de 2017;77(16):4365–77.

85. Cazzaniga G, Van Delft FW, Lo Nigro L, Ford AM, Score J, Iacobucci I, et al. Developmental origins and impact of BCR-ABL1 fusion and IKZF1 deletions in monozygotic twins with Ph⁺ acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 17 de novembro de 2011;118(20):5559–64.
86. Symeonidou V, Jakobczyk H, Bashanfer S, Malouf C, Fotopoulou F, Kotecha RS, et al. Defining the fetal origin of MLL-AF4 infant leukemia highlights specific fatty acid requirements. *Cell Rep*. outubro de 2021;37(4):109900.
87. Pang SHM, Carotta S, Nutt SL. Transcriptional Control of Pre-B Cell Development and Leukemia Prevention. Em: Ellmeier W, Taniuchi I, organizadores. *Transcriptional Control of Lineage Differentiation in Immune Cells* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2014 [citado 6 de novembro de 2024]. p. 189–213. (Current Topics in Microbiology and Immunology; vol. 381). Disponível em: https://link.springer.com/10.1007/82_2014_377
88. Boulianne B, Robinson ME, May PC, Castellano L, Blighe K, Thomas J, et al. Lineage-Specific Genes Are Prominent DNA Damage Hotspots during Leukemic Transformation of B Cell Precursors. *Cell Rep*. fevereiro de 2017;18(7):1687–98.
89. Crouch S, Lightfoot T, Simpson J, Smith A, Ansell P, Roman E. Infectious Illness in Children Subsequently Diagnosed With Acute Lymphoblastic Leukemia: Modeling the Trends From Birth to Diagnosis. *Am J Epidemiol*. 1º de setembro de 2012;176(5):402–8.
90. McNally RJQ, Eden TOB. An infectious aetiology for childhood acute leukaemia: a review of the evidence. *Br J Haematol*. novembro de 2004;127(3):243–63.
91. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U, et al. Acute Lymphoblastic Leukemia, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. outubro de 2015;13(10):1240–79.
92. Heisterkamp N, Voncken JW, Senadheera D, Gonzalez-Gomez I, Reichert A, Haataja L, et al. Reduced oncogenicity of p190 Bcr/Abl F-actin-binding domain mutants. *Blood*. 15 de setembro de 2000;96(6):2226–32.
93. 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. *Blood*. 19 de maio de 2016;127(20):2391–405.
94. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*. 12 de maio de 2011;117(19):5019–32.
95. 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*. fevereiro de 2012;29(1):2–11.
96. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014;6(1).
97. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. fevereiro de 1998;351(9102):550–4.

98. DiGiuseppe JA, Wood BL. Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry B Clin Cytom.* julho de 2019;96(4):256–65.
99. Wohlfahrt AB, Hannel L, Oliveira LZ, Soares PB, Silva JEP. The importance of immunophenotyping by flow cytometry in distinction between hematogones and B lymphoblasts. *J Bras Patol E Med Lab* [Internet]. 2015 [citado 6 de novembro de 2024];51(1). Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1676-2444.20150002>
100. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 30 de julho de 2009;114(5):937–51.
101. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia.* julho de 2022;36(7):1720–48.
102. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 1º de fevereiro de 2006;6(2):117–29.
103. Capria S, Molica M, Mohamed S, Bianchi S, Moleti ML, Trisolini SM, et al. A review of current induction strategies and emerging prognostic factors in the management of children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Expert Rev Hematol.* 2 de julho de 2020;13(7):755–69.
104. Bhojwani D, Howard SC, Pui CH. High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma.* setembro de 2009;9:S222–30.
105. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 10 de setembro de 2020;105(11):2524–39.
106. Pui CH, Relling MV, Sandlund JT, Downing JR, Campana D, Evans WE. Rationale and design of Total Therapy Study XV for newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol.* 2004;83 Suppl 1:S124-126.
107. Nachman JB, Sather HN, Sensel MG, Trigg ME, Cherlow JM, Lukens JN, et al. Augmented Post-Induction Therapy for Children with High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia and a Slow Response to Initial Therapy. *N Engl J Med.* 4 de junho de 1998;338(23):1663–71.
108. Chen G, Huang R, Huang Z, Chen Z, Liu H, Wu J, et al. Comparative effectiveness of different consolidation chemotherapy regimens for pediatric acute lymphoblastic leukemia: A protocol for systematic review and network meta analysis. *Medicine (Baltimore).* 18 de setembro de 2020;99(38):e22208.
109. Kato M, Ishimaru S, Seki M, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, et al. Long-term outcome of 6-month maintenance chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia in children. *Leukemia.* março de 2017;31(3):580–4.

110. Brandalise S, Odone V, Pereira W, Andrea M, Zanichelli M, Aranega V. Treatment results of three consecutive Brazilian cooperative childhood ALL protocols: GBTLI-80, GBTLI-82 and -85. ALL Brazilian Group. *Leukemia*. agosto de 1993;7 Suppl 2:S142-145.
111. Salina TDDC, 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*. 16 de agosto de 2016;6(1):31179.
112. Campbell M, Kiss C, Zimmermann M, Riccheri C, Kowalczyk J, Felice MS, et al. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental-Berlin-Frankfurt-Münster 2009 Trial. *J Clin Oncol*. 1º de julho de 2023;41(19):3499–511.
113. Gonçalves TS, Fontes LF, Sousa AVL de, Nascimento MMG do, Santos PCJ de L. Cuidado Farmacêutico ao Paciente da Oncopediatria: Construção de Cartilhas Educativas para o Tratamento das Leucemias Linfoblásticas Agudas. *Rev Bras Cancerol*. 7 de junho de 2024;70(2):e-144578.
114. Laks D, Longhi F, Wagner MB, Garcia PCR. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. *J Pediatr (Rio J)*. abril de 2003;79:149–58.
115. Campana D, Coustan-Smith E. Measurements of treatment response in childhood acute leukemia. *Korean J Hematol*. 2012;47(4):245.
116. Saygin C, Cannova J, Stock W, Muffly L. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. *Haematologica*. 1º de dezembro de 2022;107(12):2783–93.
117. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, organizador. *N Engl J Med*. 15 de outubro de 2015;373(16):1541–52.
118. Hunger SP, Raetz EA. How I treat relapsed acute lymphoblastic leukemia in the pediatric population. *Blood*. 15 de outubro de 2020;136(16):1803–12.
119. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1–2):7–25.
120. Batsivari A, Haltalli MLR, Passaro D, Pospori C, Lo Celso C, Bonnet D. Dynamic responses of the haematopoietic stem cell niche to diverse stresses. *Nat Cell Biol*. 1º de janeiro de 2020;22(1):7–17.
121. Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, et al. A Cellular Taxonomy of the Bone Marrow Stroma in Homeostasis and Leukemia. *Cell*. junho de 2019;177(7):1915-1932.e16.
122. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 1º de maio de 2019;20(5):303–20.
123. Kiel MJ, Iwashita T, Yilmaz ÖH, Morrison SJ. Spatial differences in hematopoiesis but not in stem cells indicate a lack of regional patterning in definitive hematopoietic stem cells. *Dev Biol*. 1º de julho de 2005;283(1):29–39.

124. Kricun ME. Red-yellow marrow conversion: Its effect on the location of some solitary bone lesions. *Skeletal Radiol.* junho de 1985;14(1):10–9.
125. Chanavaz M. Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with ⁸⁵Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implantol.* 1995;21(3):214–9.
126. Maryanovich M, Takeishi S, Frenette PS. Neural Regulation of Bone and Bone Marrow. *Cold Spring Harb Perspect Med.* setembro de 2018;8(9):a031344.
127. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature.* agosto de 2010;466(7308):829–34.
128. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature.* 31 de outubro de 2013;502(7473):637–43.
129. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature.* janeiro de 2014;505(7483):327–34.
130. Watson EC, Adams RH. Biology of Bone: The Vasculature of the Skeletal System. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2 de julho de 2018;8(7):a031559.
131. Ramasamy SK, Kusumbe AP, Itkin T, Gur-Cohen S, Lapidot T, Adams RH. Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel–Derived Signals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 6 de outubro de 2016;32(1):649–75.
132. Méndez-Ferrer S, Bonnet D, Steensma DP, Hasserjian RP, Ghobrial IM, Gribben JG, et al. Bone marrow niches in haematological malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(5):285–98.
133. Acar M, Kocherlakota KS, Murphy MM, Peyer JG, Oguro H, Inra CN, et al. Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature.* 1º de outubro de 2015;526(7571):126–30.
134. Zhang J, Wu Q, Johnson CB, Pham G, Kinder JM, Olsson A, et al. In situ mapping identifies distinct vascular niches for myelopoiesis. *Nature.* 18 de fevereiro de 2021;590(7846):457–62.
135. Beerman I, Luis TC, Singbrant S, Celso CL, Méndez-Ferrer S. The evolving view of the hematopoietic stem cell niche. *Exp Hematol.* 1º de junho de 2017;50:22–6.
136. Zhao M, Tao F, Venkatraman A, Li Z, Smith SE, Unruh J, et al. N-Cadherin-Expressing Bone and Marrow Stromal Progenitor Cells Maintain Reserve Hematopoietic Stem Cells. *Cell Rep.* 15 de janeiro de 2019;26(3):652–669.e6.
137. Mercier FE, Ragu C, Scadden DT. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat Rev Immunol.* janeiro de 2012;12(1):49–60.
138. Wilkinson AC, Igarashi KJ, Nakauchi H. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nat Rev Genet.* setembro de 2020;21(9):541–54.

139. Yamashita M, Dellorusso PV, Olson OC, Passegué E. Dysregulated haematopoietic stem cell behaviour in myeloid leukaemogenesis. *Nat Rev Cancer*. julho de 2020;20(7):365–82.
140. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. fevereiro de 2006;6(2):93–106.
141. Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. “Mesenchymal” stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*. setembro de 2010;21(9):1057–66.
142. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. setembro de 2008;8(9):726–36.
143. Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, et al. Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted Participants in Bone Maintenance and Regeneration. *Cell Stem Cell*. 2 de março de 2012;10(3):259–72.
144. Sugiyama T, Omatsu Y, Nagasawa T. Niches for hematopoietic stem cells and immune cell progenitors. *Int Immunol*. 6 de fevereiro de 2019;31(1):5–11.
145. Coşkun S, Chao H, Vasavada H, Heydari K, Gonzales N, Zhou X, et al. Development of the fetal bone marrow niche and regulation of HSC quiescence and homing ability by emerging osteolineage cells. *Cell Rep*. 23 de outubro de 2014;9(2):581–90.
146. Kim SW, Pajevic PD, Selig M, Barry KJ, Yang JY, Shin CS, et al. Intermittent parathyroid hormone administration converts quiescent lining cells to active osteoblasts. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. outubro de 2012;27(10):2075–84.
147. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 9 de julho de 2009;460(7252):259–63.
148. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 25 de janeiro de 2012;481(7382):457–62.
149. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. novembro de 2014;20(11):1315–20.
150. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de julho de 2008;181(2):1232–44.
151. Seyfried AN, Maloney JM, MacNamara KC. Macrophages Orchestrate Hematopoietic Programs and Regulate HSC Function During Inflammatory Stress. *Front Immunol*. 23 de julho de 2020;11:1499.
152. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. março de 2016;12(3):154–68.

153. Dührsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann Hematol.* 13 de agosto de 1996;73(2):53–70.
154. 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 Overt Leukemia. *Int J Mol Sci.* 23 de abril de 2021;22(9):4426.
155. Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, et al. Biological, Functional and Genetic Characterization of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells from Pediatric Patients Affected by Acute Lymphoblastic Leukemia. Menendez P, organizador. *PLoS ONE.* 7 de novembro de 2013;8(11):e76989.
156. Vicente López Á, Vázquez García MN, Melen GJ, Entrena Martínez A, Cubillo Moreno I, García-Castro J, et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from the Bone Marrow of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Show Altered BMP4 Production: Correlations with the Course of Disease. Almeida-Porada G, organizador. *PLoS ONE.* 6 de janeiro de 2014;9(1):e84496.
157. Van Den Berk LCJ, Van Der Veer A, Willemse ME, Theeuwes MJGA, Luijendijk MW, Tong WH, et al. Disturbed CXCR 4/ CXCL 12 axis in paediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* julho de 2014;166(2):240–9.
158. De Vasconcellos JF, Laranjeira ABA, Zanchin NIT, Otubo R, Vaz TH, Cardoso AA, et al. Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* abril de 2011;56(4):568–77.
159. Halton JM, Atkinson SA, Fraher L, Webber CE, Cockshott WP, Tam C, et al. Mineral homeostasis and bone mass at diagnosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr.* 1º de abril de 1995;126(4):557–64.
160. Cheung LC, Tickner J, Hughes AM, Skut P, Howlett M, Foley B, et al. New therapeutic opportunities from dissecting the pre-B leukemia bone marrow microenvironment. *Leukemia.* novembro de 2018;32(11):2326–38.
161. Yang GC, Xu YH, Chen HX, Wang XJ. Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Inhibit the Differentiation of Bone Mesenchymal Stem Cells into Osteoblasts In Vitro by Activating Notch Signaling. *Stem Cells Int.* 2015;2015:162410.
162. Dias S, Hattori K, Heissig B, Zhu Z, Wu Y, Witte L, et al. Inhibition of both paracrine and autocrine VEGF/ VEGFR-2 signaling pathways is essential to induce long-term remission of xenotransplanted human leukemias. *Proc Natl Acad Sci.* 11 de setembro de 2001;98(19):10857–62.
163. Åhsberg J, Xiao P, Okuyama K, Somasundaram R, Strid T, Qian H, et al. Progression of progenitor B-cell leukemia is associated with alterations of the bone marrow micro-environment. *Haematologica.* março de 2020;105(3):e102.
164. Pulè MA, Gullmann C, Dennis D, McMahon C, Jeffers M, Smith OP. Increased angiogenesis in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukaemia has no prognostic significance. *Br J Haematol.* setembro de 2002;118(4):991–8.

165. Velázquez-Avila M, Balandrán JC, Ramírez-Ramírez D, Velázquez-Avila M, Sandoval A, Felipe-López A, et al. High cortactin expression in B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with increased transendothelial migration and bone marrow relapse. *Leukemia*. junho de 2019;33(6):1337–48.
166. Magalhães-Gama F, Alves-Hanna FS, Araújo ND, Barros MS, Silva FS, Catão CLS, et al. The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications. *Front Immunol*. 1º de dezembro de 2022;13:1071188.
167. Song JX, Wen Y, Li RW, Dong T, Tang YF, Zhang JJ, et al. Phenotypic characterization of macrophages in the BMB sample of human acute leukemia. *Ann Hematol*. março de 2020;99(3):539–47.
168. Boissard F, Laurent C, Ramsay AG, Quillet-Mary A, Fournié JJ, Poupot M, et al. Nurse-like cells impact on disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 15 de janeiro de 2016;6(1):e381.
169. Witkowski MT, Dolgalev I, Evensen NA, Ma C, Chambers T, Roberts KG, et al. Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 8 de junho de 2020;37(6):867-882.e12.
170. Liu Y feng, Chen Y ying, He Y yi, Wang J yi, Yang J ping, Zhong S ling, et al. Expansion and activation of granulocytic, myeloid-derived suppressor cells in childhood precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *J Leukoc Biol*. 15 de junho de 2017;102(2):449–58.
171. Maecker B, Mougiakakos D, Zimmermann M, Behrens M, Hollander S, Schrauder A, et al. Dendritic cell deficiencies in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Leukemia*. abril de 2006;20(4):645–9.
172. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 7 de janeiro de 2000;100(1):57–70.
173. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov*. 12 de janeiro de 2022;12(1):31–46.
174. Hiam-Galvez KJ, Allen BM, Spitzer MH. Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer*. junho de 2021;21(6):345–59.
175. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget*. 24 de janeiro de 2017;8(4):7175–80.
176. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. agosto de 2004;21(2):137–48.
177. Burnet FM. The Concept of Immunological Surveillance. Em: Schwartz RS, organizador. *Progress in Tumor Research* [Internet]. S. Karger AG; 1970 [citado 6 de novembro de 2024]. p. 1–27. Disponível em: <https://karger.com/books/book/483/chapter/5575692>
178. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. março de 2019;16(3):151–67.

179. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci.* 23 de junho de 1998;95(13):7556–61.
180. Van Den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1º de novembro de 1996;184(5):1781–90.
181. Smyth MJ, Thia KYT, Street SEA, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential Tumor Surveillance by Natural Killer (Nk) and Nkt Cells. *J Exp Med.* 21 de fevereiro de 2000;191(4):661–8.
182. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, et al. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science.* 19 de outubro de 2001;294(5542):605–9.
183. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 1º de novembro de 2002;3(11):991–8.
184. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* março de 2019;16(3):151–67.
185. Matzinger P. Tolerance, Danger, and the Extended Family. *Annu Rev Immunol.* abril de 1994;12(1):991–1045.
186. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* dezembro de 2007;450(7171):903–7.
187. Teng MWL, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. *Cancer Res.* 6 de agosto de 2012;72(16):3987.
188. Müller-Hermelink N, Braumüller H, Pichler B, Wieder T, Mailhammer R, Schaak K, et al. TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. *Cancer Cell.* junho de 2008;13(6):507–18.
189. Rathmann S, Glatzel S, Schönberg K, Uhrberg M, Follo M, Schulz-Huotari C, et al. Expansion of NKG2A-LIR1- natural killer cells in HLA-matched, killer cell immunoglobulin-like receptors/HLA-ligand mismatched patients following hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* abril de 2010;16(4):469–81.
190. Stutman O, Paige CJ, Figarella EF. Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice. I. Strain and age distribution and target cell susceptibility. *J Immunol Baltim Md* 1950. novembro de 1978;121(5):1819–26.
191. Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci.* setembro de 1989;86(18):7159–63.
192. Huntington ND, Cursons J, Rautela J. The cancer–natural killer cell immunity cycle. *Nat Rev Cancer.* agosto de 2020;20(8):437–54.

193. Torelli GF, Peragine N, Raponi S, Pagliara D, De Propriis MS, Vitale A, et al. Recognition of adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia blasts by natural killer cells. *Haematologica*. julho de 2014;99(7):1248–54.
194. Jardine L, Hambleton S, Bigley V, Pagan S, Wang XN, Collin M. Sensitizing primary acute lymphoblastic leukemia to natural killer cell recognition by induction of NKG2D ligands. *Leuk Lymphoma*. 8 de setembro de 2012;54(1):167.
195. Hilpert J, Zeiser M, Kanz L, Baessler T, Steinle A, Salih HR. NKG2D and Its Ligands In Leukemia: Comprehensive Analysis of Expression, Release and Modulation of NK Cell Reactivity. *Blood*. 19 de novembro de 2010;116(21):1686.
196. Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, et al. The TGF- β /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. abril de 2016;30(4):800–11.
197. Alves E, McLeish E, Blancafort P, Coudert JD, Gaudieri S. Manipulating the NKG2D Receptor-Ligand Axis Using CRISPR: Novel Technologies for Improved Host Immunity. *Front Immunol*. 2021;12:712722.
198. Sullivan EM, Jeha S, Kang G, Cheng C, Rooney B, Holladay M, et al. NK cell genotype and phenotype at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia correlate with postinduction residual disease. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1º de dezembro de 2014;20(23):5986–94.
199. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 8 de fevereiro de 2012;482(7385):400–4.
200. Philip M, Schietinger A. CD8⁺ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol*. abril de 2022;22(4):209–23.
201. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *N Engl J Med*. 12 de setembro de 1957;257(11):491–6.
202. Chabannon C, Kuball J, Bondanza A, Dazzi F, Pedrazzoli P, Toubert A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Sci Transl Med*. 11 de abril de 2018;10(436):eaap9630.
203. Van Pel A, Boon T. Protection against a nonimmunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci*. agosto de 1982;79(15):4718–22.
204. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood*. 1º de janeiro de 2000;95(1):286–93.
205. Manlove LS, Berquam-Vrieze KE, Pauken KE, Williams RT, Jenkins MK, Farrar MA. Adaptive Immunity to Leukemia Is Inhibited by Cross-Reactive Induced Regulatory T Cells. *J Immunol*. 15 de outubro de 2015;195(8):4028–37.

206. Kebelmann-Betzing C, Körner G, Badiali L, Buchwald D, Möricke A, Korte A, et al. Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine*. 7 de janeiro de 2001;13(1):39–50.
207. Luczyński W, Stasiak-Barmuta A, Iłendo E, Kovalchuk O, Krawczuk-Rybak M, Malinowska I, et al. Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma*. 2006;53(4):301–4.
208. 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*. 1º de agosto de 2004;104(3):744–51.
209. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol*. agosto de 2015;15(8):486–99.
210. Hellstrom KE, Hellstrom I. Chapter One - From the Hellstrom paradox toward cancer cure. Em: Teplow DB, organizador. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2019 [citado 7 de novembro de 2024]. p. 1–24. (Cancer Immunotherapy; vol. 164). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877117318301480>
211. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*. agosto de 2008;224:166–82.
212. Ledford H, Else H, Warren M. Cancer immunologists scoop medicine Nobel prize. *Nature*. outubro de 2018;562(7725):20–1.
213. Van Den Broek T, Borghans JAM, Van Wijk F. The full spectrum of human naive T cells. *Nat Rev Immunol*. junho de 2018;18(6):363–73.
214. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol*. fevereiro de 2016;39(1):98–106.
215. Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. dezembro de 1994;1(9):793–801.
216. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat Rev Immunol*. dezembro de 2001;1(3):220–8.
217. Schnorfeil FM, Lichtenegger FS, Emmerig K, Schlueter M, Neitz JS, Draenert R, et al. T cells are functionally not impaired in AML: increased PD-1 expression is only seen at time of relapse and correlates with a shift towards the memory T cell compartment. *J Hematol Oncol*. 30 de julho de 2015;8:93.
218. Park SH, You E, Park C, Cho Y, Jang S, Im H, et al. Increased expression of immune checkpoint programmed cell death protein-1 (PD-1) on T cell subsets of bone marrow aspirates in patients with B-LYMPHOBLASTIC leukemia, especially in relapse and at diagnosis. *Cytometry B Clin Cytom*. julho de 2020;98(4):336–47.

219. Feucht J, Kayser S, Gorodezki D, Hamieh M, Döring M, Blaeschke F, et al. T-cell responses against CD19+ pediatric acute lymphoblastic leukemia mediated by bispecific T-cell engager (BiTE) are regulated contrarily by PD-L1 and CD80/CD86 on leukemic blasts. *Oncotarget*. 22 de novembro de 2016;7(47):76902–19.
220. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. maio de 2016;16(5):275–87.
221. Qin S, Xu L, Yi M, Yu S, Wu K, Luo S. Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol Cancer*. dezembro de 2019;18(1):155.
222. Shah NN, Fry TJ. Mechanisms of resistance to CAR T cell therapy. *Nat Rev Clin Oncol* [Internet]. 5 de março de 2019 [citado 7 de novembro de 2024]; Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41571-019-0184-6>
223. Adams NM, Grassmann S, Sun JC. Clonal expansion of innate and adaptive lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. novembro de 2020;20(11):694–707.
224. Parrott DV, De Sousa MA, East J. Thymus-dependent areas in the lymphoid organs of neonatally thymectomized mice. *J Exp Med*. 1º de janeiro de 1966;123(1):191–204.
225. Miller JF, Mitchell GF. Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J Exp Med*. 1º de outubro de 1968;128(4):801–20.
226. Kersh GJ, Kersh EN, Fremont DH, Allen PM. High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling. *Immunity*. dezembro de 1998;9(6):817–26.
227. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*. 17 de março de 2000;100(6):655–69.
228. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*. janeiro de 2006;16(1):3–10.
229. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*. 22 de setembro de 2006;126(6):1121–33.
230. Tschärke DC, Croft NP, Doherty PC, La Gruta NL. Sizing up the key determinants of the CD8+ T cell response. *Nat Rev Immunol*. novembro de 2015;15(11):705–16.
231. Mayassi T, Barreiro LB, Rossjohn J, Jabri B. A multilayered immune system through the lens of unconventional T cells. *Nature*. 22 de julho de 2021;595(7868):501–10.
232. Godfrey DI, Uldrich AP, McCluskey J, Rossjohn J, Moody DB. The burgeoning family of unconventional T cells. *Nat Immunol*. novembro de 2015;16(11):1114–23.

233. Pellicci DG, Koay HF, Berzins SP. Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and $\gamma\delta$ T cells emerge. *Nat Rev Immunol.* dezembro de 2020;20(12):756–70.
234. Fiala GJ, Gomes AQ, Silva-Santos B. From thymus to periphery: Molecular basis of effector $\gamma\delta$ -T cell differentiation. *Immunol Rev.* novembro de 2020;298(1):47–60.
235. Sanchez Sanchez G, Tafesse Y, Papadopoulou M, Vermijlen D. Surfing on the waves of the human $\gamma\delta$ T cell ontogenic sea. *Immunol Rev.* maio de 2023;315(1):89–107.
236. Ribot JC, Lopes N, Silva-Santos B. $\gamma\delta$ T cells in tissue physiology and surveillance. *Nat Rev Immunol.* 14 de outubro de 2020;1–12.
237. LeFranc MP, Forster A, Baer R, Stinson MA, Rabbitts TH. Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging γ genes: Nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell.* 25 de abril de 1986;45(2):237–46.
238. Heilig JS, Tonegawa S. Diversity of murine gamma genes and expression in fetal and adult T lymphocytes. *Nature.* agosto de 1986;322(6082):836–40.
239. Haas JD, Ravens S, Düber S, Sandrock I, Oberdörfer L, Kashani E, et al. Development of Interleukin-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells Is Restricted to a Functional Embryonic Wave. *Immunity.* julho de 2012;37(1):48–59.
240. Boehme L, Roels J, Taghon T. Development of $\gamma\delta$ T cells in the thymus - A human perspective. *Semin Immunol.* novembro de 2022;61–64:101662.
241. Willcox CR, Davey MS, Willcox BE. Development and selection of the human $V\gamma 9V\delta 2^+$ T-Cell Repertoire. *Front Immunol.* 2 de julho de 2018;9(JUL):1501.
242. Papadopoulou M, Tieppo P, McGovern N, Gosselin F, Chan JKY, Goetgeluk G, et al. TCR Sequencing Reveals the Distinct Development of Fetal and Adult Human $V\gamma 9V\delta 2$ T Cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 15 de setembro de 2019;203(6):1468–79.
243. Papadopoulou M, Dimova T, Shey M, Briel L, Veldtsman H, Khomba N, et al. Fetal public $V\gamma 9V\delta 2$ T cells expand and gain potent cytotoxic functions early after birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 de agosto de 2020;117(31):18638–48.
244. Krangel MS, Yssel H, Brocklehurst C, Spits H. A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J Exp Med.* 1º de setembro de 1990;172(3):847–59.
245. Davey MS, Willcox CR, Baker AT, Hunter S, Willcox BE. Recasting Human $V\delta 1$ Lymphocytes in an Adaptive Role. *Trends Immunol.* 1º de junho de 2018;39(6):446–59.
246. Muñoz-Ruiz M, Sumaria N, Pennington DJ, Silva-Santos B. Thymic Determinants of $\gamma\delta$ T Cell Differentiation. *Trends Immunol.* 1º de maio de 2017;38(5):336–44.
247. Fenoglio D, Poggi A, Catellani S, Battaglia F, Ferrera A, Setti M, et al. $V\delta 1$ T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood.* 25 de junho de 2009;113(26):6611–8.

248. Peng MY, Wang ZH, Yao CY, Jiang LN, Jin QL, Wang J, et al. Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell Mol Immunol*. junho de 2008;5(3):203–8.
249. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):88–100.
250. Ribeiro ST, Ribot JC, Silva-Santos B. Five Layers of Receptor Signaling in $\gamma\delta$ T-Cell Differentiation and Activation. *Front Immunol* [Internet]. 26 de janeiro de 2015 [citado 7 de novembro de 2024];6. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00015/abstract>
251. Sheridan BS, Romagnoli PA, Pham QM, Fu HH, Francis Alonzo III, Schubert WD, et al. $\gamma\delta$ T cells exhibit multifunctional and protective memory in intestinal tissues. *Immunity*. 25 de julho de 2013;39(1):184.
252. Rigau M, Ostrouska S, Fulford TS, Johnson DN, Woods K, Ruan Z, et al. Butyrophilin 2A1 is essential for phosphoantigen reactivity by $\gamma\delta$ T cells. *Science*. 7 de fevereiro de 2020;367(6478).
253. Karunakaran MM, Willcox CR, Salim M, Paletta D, Fichtner AS, Noll A, et al. Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the V γ 9V δ 2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing. *Immunity*. 17 de março de 2020;52(3):487–498.e6.
254. Juarez D, Fruman DA. Targeting the Mevalonate Pathway in Cancer. *Trends Cancer*. 1º de junho de 2021;7(6):525–40.
255. Silva-Santos B, Strid J. Working in “NK mode”: Natural killer group 2 member D and natural cytotoxicity receptors in stress-surveillance by $\gamma\delta$ T cells. *Front Immunol*. 24 de abril de 2018;9(APR):24.
256. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*. 18 de agosto de 2003;198(4):557–67.
257. Hoeres T, Pretscher D, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Triebel J, et al. Improving Immunotherapy Against B-Cell Malignancies Using $\gamma\delta$ T-Cell-specific Stimulation and Therapeutic Monoclonal Antibodies. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2019;42(9):331–44.
258. Brandes M, Willimann K, Moser B. Immunology: Professional antigen-presentation function by human $\gamma\delta$ cells. *Science*. 8 de julho de 2005;309(5732):264–8.
259. Holmen Olofsson G, Idorn M, Carnaz Simões AM, Aehnlich P, Skadborg SK, Noessner E, et al. V γ 9V δ 2 T Cells Concurrently Kill Cancer Cells and Cross-Present Tumor Antigens. *Front Immunol*. 2021;12:645131.
260. Brandes M, Willimann K, Bioley G, Lévy N, Eberl M, Luo M, et al. Cross-presenting human $\gamma\delta$ T cells induce robust CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell responses. *Proc Natl Acad Sci*. 17 de fevereiro de 2009;106(7):2307–12.
261. Poggi A, Venturino C, Catellani S, Clavio M, Miglino M, Gobbi M, et al. V δ 1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res*. 15 de dezembro de 2004;64(24):9172–9.

262. Di Lorenzo B, Simões AE, Caiado F, Tieppo P, Correia DV, Carvalho T, et al. Broad cytotoxic targeting of acute myeloid leukemia by polyclonal delta one T cells. *Cancer Immunol Res.* 1º de abril de 2019;7(4):552–8.
263. Almeida AR, Correia DV, Fernandes-Platzgummer A, Da Silva CL, Da Silva MG, Anjos DR, et al. Delta one T cells for immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia: Clinical-grade expansion/differentiation and preclinical proof of concept. *Clin Cancer Res.* 1º de dezembro de 2016;22(23):5795–804.
264. Knight A, MacKinnon S, Lowdell MW. Human Vdelta1 gamma-delta T cells exert potent specific cytotoxicity against primary multiple myeloma cells. *Cytotherapy.* outubro de 2012;14(9):1110–8.
265. Correia DV, Fogli M, Hudspeth K, Gomes Da Silva M, Mavilio D, Silva-Santos B. Differentiation of human peripheral blood Vδ1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. *Blood.* 2011;118(4):992–1001.
266. Mikulak J, Oriolo F, Bruni E, Roberto A, Colombo FS, Villa A, et al. NKp46-expressing human gut-resident intraepithelial Vδ1 T cell subpopulation exhibits high antitumor activity against colorectal cancer. *JCI Insight.* 19 de dezembro de 2019;4(24):e125884.
267. Willcox BE, Mohammed F, Willcox CR. γδ TCR Recognition of MR1: Adapting to Life on the Flip Side. *Trends Biochem Sci.* 1º de julho de 2020;45(7):551–3.
268. Uldrich AP, Le Nours J, Pellicci DG, Gherardin NA, McPherson KG, Lim RT, et al. CD1d-lipid antigen recognition by the γδ TCR. *Nat Immunol.* novembro de 2013;14(11):1137–45.
269. Luoma AM, Castro CD, Adams EJ. γδ T cell surveillance via CD1 molecules. *Trends Immunol.* 2014;35(12):613–21.
270. Bai L, Picard D, Anderson B, Chaudhary V, Luoma A, Jabri B, et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vδ1 TCR. *Eur J Immunol.* setembro de 2012;42(9):2505–10.
271. Kjer-Nielsen L, Patel O, Corbett AJ, Le Nours J, Meehan B, Liu L, et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature.* 29 de novembro de 2012;491(7426):717–23.
272. Corbett AJ, Eckle SBG, Birkinshaw RW, Liu L, Patel O, Mahony J, et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. *Nature.* 15 de maio de 2014;509(7500):361–5.
273. Crowther MD, Dolton G, Legut M, Caillaud ME, Lloyd A, Attaf M, et al. Genome-wide CRISPR–Cas9 screening reveals ubiquitous T cell cancer targeting via the monomorphic MHC class I-related protein MR1. *Nat Immunol.* 1º de fevereiro de 2020;21(2):178–85.
274. Lepore M, Kalinichenko A, Calogero S, Kumar P, Paleja B, Schmalzer M, et al. Functionally diverse human T cells recognize non-microbial antigens presented by MR1. *eLife.* 18 de maio de 2017;6:e24476.
275. Pang DJ, Neves JF, Sumaria N, Pennington DJ. Understanding the complexity of γδ T-cell subsets in mouse and human. *Immunology.* julho de 2012;136(3):283–90.

276. Dieli F, Poccia F, Lipp M, Sireci G, Caccamo N, Di Sano C, et al. Differentiation of Effector/Memory V δ 2 T Cells and Migratory Routes in Lymph Nodes or Inflammatory Sites. *J Exp Med*. 4 de agosto de 2003;198(3):391–7.
277. Odaira K, Kimura SN, Fujieda N, Kobayashi Y, Kambara K, Takahashi T, et al. CD27(-)CD45(+) $\gamma\delta$ T cells can be divided into two populations, CD27(-)CD45(int) and CD27(-)CD45(hi) with little proliferation potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 23 de setembro de 2016;478(3):1298–303.
278. Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V, Angelini D, Borsellino G, Poccia F, et al. Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human V γ 9V δ 2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol*. junho de 2005;35(6):1764–72.
279. Giannotta C, Castella B, Tripoli E, Grimaldi D, Avonto I, D'Agostino M, et al. Immune dysfunctions affecting bone marrow V γ 9V δ 2 T cells in multiple myeloma: Role of immune checkpoints and disease status. *Front Immunol*. 2022;13:1073227.
280. Papotto PH, Ribot JC, Silva-Santos B. IL-17 + $\gamma\delta$ T cells as kick-starters of inflammation. *Nat Immunol*. 2017;18(6):604–11.
281. Rei M, Pennington DJ, Silva-Santos B. The emerging protumor role of $\gamma\delta$ T lymphocytes: Implications for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2015;75(5):798–802.
282. Ribot JC, Ribeiro ST, Correia DV, Sousa AE, Silva-Santos B. Human $\gamma\delta$ Thymocytes Are Functionally Immature and Differentiate into Cytotoxic Type 1 Effector T Cells upon IL-2/IL-15 Signaling. *J Immunol*. 1º de março de 2014;192(5):2237–43.
283. Wu Y, Kyle-Cezar F, Woolf RT, Naceur-Lombardelli C, Owen J, Biswas D, et al. An innate-like V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cell compartment in the human breast is associated with remission in triple-negative breast cancer. *Sci Transl Med*. 9 de outubro de 2019;11(513):eaax9364.
284. Meraviglia S, Lo Presti E, Tosolini M, La Mendola C, Orlando V, Todaro M, et al. Distinctive features of tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes in human colorectal cancer. *OncoImmunology*. 3 de outubro de 2017;6(10).
285. Lo Presti E, Dieli F, Meraviglia S. Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes: Pathogenic role, clinical significance, and differential programming in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2014;5(NOV):1–8.
286. Maniar A, Zhang X, Lin W, Gastman BR, Pauza CD, Strome SE, et al. Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. *Blood*. 9 de setembro de 2010;116(10):1726–33.
287. Rampoldi F, Ullrich L, Prinz I. Revisiting the Interaction of $\gamma\delta$ T-Cells and B-Cells. *Cells*. 18 de março de 2020;9(3):743.
288. Duval M, Yotnda P, Bensussan A, Oudhiri N, Guidal C, Rohrlisch P, et al. Potential antileukemic effect of $\gamma\delta$ T cells in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. maio de 1995;9(5):863–8.
289. Aswald JM, Wang XH, Aswald S, Lutynski A, Minden MD, Messner HA, et al. Flow cytometric assessment of autologous $\gamma\delta$ T cells in patients with acute myeloid leukemia:

Potential effector cells for immunotherapy? *Cytom Part B - Clin Cytom*. 15 de novembro de 2006;70(6):379–90.

290. Simões C, Silva I, Carvalho A, Silva S, Santos S, Marques G, et al. Quantification and phenotypic characterization of peripheral blood V δ 1 + T cells in chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B cell lymphocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. março de 2019;96(2):164–8.

291. Siegers GM, Dhamko H, Wang XH, Mathieson AM, Kosaka Y, Felizardo TC, et al. Human V δ 1 $\gamma\delta$ T cells expanded from peripheral blood exhibit specific cytotoxicity against B-cell chronic lymphocytic leukemia-derived cells. *Cytotherapy*. 2011;13(6):753–64.

292. Coscia M, Vitale C, Peola S, Foglietta M, Rigoni M, Griggio V, et al. Dysfunctional V γ 9V δ 2 T cells are negative prognosticators and markers of dysregulated mevalonate pathway activity in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 18 de outubro de 2012;120(16):3271–9.

293. Sousa IV de. Fatores de risco associados a comorbidades, recaídas e óbitos de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: implicações para os cuidados de enfermagem [Internet]. Universidade Federal do Amazonas; 2023 [citado 7 de novembro de 2024]. Disponível em: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/10056>

294. Chow A, Perica K, Klebanoff CA, Wolchok JD. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. dezembro de 2022;19(12):775–90.

295. Poggi A, Zancolli M, Catellani S, Borsellino G, Battistini L, Zocchi MR. Migratory pathways of gammadelta T cells and response to CXCR3 and CXCR4 ligands: adhesion molecules involved and implications for multiple sclerosis pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. junho de 2007;1107:68–78.

296. Poggi A, Carosio R, Fenoglio D, Brenci S, Murdaca G, Setti M, et al. Migration of V delta 1 and V delta 2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *Blood*. 15 de março de 2004;103(6):2205–13.

297. Brauneck F, Weimer P, Schulze Zur Wiesch J, Weisel K, Leyboldt L, Vohwinkel G, et al. Bone Marrow-Resident V δ 1 T Cells Co-express TIGIT With PD-1, TIM-3 or CD39 in AML and Myeloma. *Front Med*. 8 de novembro de 2021;8:763773.

298. Meeh PF, King M, O'Brien RL, Muga S, Buckhalts P, Neuberg R, et al. Characterization of the $\gamma\delta$ T cell response to acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother*. 2006;55(9):1072–80.

299. Lamb LS, Musk P, Ye Z, Van Rhee F, Geier SS, Tong JJ, et al. Human $\gamma\delta$ + T lymphocytes have in vitro graft vs leukemia activity in the absence of an allogeneic response. *Bone Marrow Transplant*. 23 de março de 2001;27(6):601–6.

300. Lamb LS, Henslee-Downey PJ, Parrish RS, Godder K, Thompson J, Lee C, et al. Increased frequency of TCR $\gamma\delta$ + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother Stem Cell Res*. 1996;5(5):503–9.

301. Godder KT, Henslee-Downey PJ, Mehta J, Park BS, Chiang KY, Abhyankar S, et al. Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased $\gamma\delta$ T cells

after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* junho de 2007;39(12):751–7.

302. Siegers GM, Felizardo TC, Mathieson AM, Kosaka Y, Wang XH, Medin JA, et al. Anti-Leukemia Activity of In Vitro-Expanded Human Gamma Delta T Cells in a Xenogeneic Ph+ Leukemia Model. *PLoS ONE.* 3 de fevereiro de 2011;6(2):e16700.

303. De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP, Mantovani JJ, Herzenberg LA, Herzenberg LA, et al. Ontogeny of $\gamma\delta$ T Cells in Humans. *J Immunol.* 1º de fevereiro de 2004;172(3):1637–45.

304. Guerra-Maupome M, Palmer MV, Waters WR, McGill JL. Characterization of $\gamma\delta$ T Cell Effector/Memory Subsets Based on CD27 and CD45R Expression in Response to *Mycobacterium bovis* Infection. *ImmunoHorizons.* 1º de junho de 2019;3(6):208–18.

305. Lafarge X, Merville P, Cazin M, Bergé F, Potaux L, Moreau J, et al. Cytomegalovirus Infection in Transplant Recipients Resolves When Circulating $\gamma\delta$ T Lymphocytes Expand, Suggesting a Protective Antiviral Role. *J Infect Dis.* setembro de 2001;184(5):533–41.

306. Yao D, Lai J, Lu Y, Zhong J, Zha X, Huang X, et al. Comprehensive analysis of the immune pattern of T cell subsets in chronic myeloid leukemia before and after TKI treatment. *Front Immunol.* 19 de janeiro de 2023;14:1078118.

307. Maurer K, Park CY, Borji M, Mani S, Southard J, Farhi SL, et al. Expansion of a CD8+ Temra Population and Activating T-Cell Interactions Characterize the Graft Versus Leukemia Response in Relapsed AML. *Blood.* 15 de novembro de 2022;140(Supplement 1):4806–7.

308. Zheng L, Qin S, Si W, Wang A, Xing B, Gao R, et al. Pan-cancer single-cell landscape of tumor-infiltrating T cells. *Science.* 17 de dezembro de 2021;374(6574):abe6474.

309. Mei Y, Liu Y, Liu W, Chen M, Liu X, Wang S, et al. Identifying ADGRG1 as a specific marker for tumor-reactive T cells in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol Oncol.* 6 de setembro de 2024;13(1):92.

310. McMurray JL, von Borstel A, Taher TE, Syrimi E, Taylor GS, Sharif M, et al. Transcriptional profiling of human V δ 1 T cells reveals a pathogen-driven adaptive differentiation program. *Cell Rep.* 24 de maio de 2022;39(8):110858.

311. Wu Y, Biswas D, Usaite I, Angelova M, Boeing S, Karasaki T, et al. A local human V δ 1 T cell population is associated with survival in nonsmall-cell lung cancer. *Nat Cancer.* 30 de maio de 2022;3(6):696–709.

312. de Vries NL, van de Haar J, Veninga V, Chalabi M, Ijsselsteijn ME, van der Ploeg M, et al. $\gamma\delta$ T cells are effectors of immunotherapy in cancers with HLA class I defects. *Nature.* janeiro de 2023;613(7945):743–50.

313. Davey MS, Willcox CR, Joyce SP, Ladell K, Kasatskaya SA, McLaren JE, et al. Clonal selection in the human V δ 1 T cell repertoire indicates $\gamma\delta$ TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat Commun.* 1º de março de 2017;8(1):14760.

314. Gertner-Dardenne J, Castellano R, Mamessier E, Garbit S, Kochbati E, Etienne A, et al. Human V γ 9V δ 2 T Cells Specifically Recognize and Kill Acute Myeloid Leukemic Blasts. *J Immunol.* 1º de maio de 2012;188(9):4701–8.

315. de Weerd I, Terpstra S, Hofland T, Lameris R, de Bruin RCG, Levin MD, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells Are Susceptible to $\gamma\delta$ -T Cell Mediated Killing, Provided CLL-Derived $\gamma\delta$ -T Cell Dysfunction Can be Reversed. *Blood*. 3 de dezembro de 2015;126(23):2914–2914.
316. Ravens S, Tolosa E. Expansion of human $\gamma\delta$ T cells in periphery: Lessons learned from development, infections, and compromised thymic function. *Eur J Immunol*. novembro de 2024;54(11):2451073.
317. Davey MS, Willcox CR, Hunter S, Oo YH, Willcox BE. V δ 2+ T Cells—Two Subsets for the Price of One. *Front Immunol*. 25 de setembro de 2018;9:2106.
318. Poloni C, Schonhofer C, Ivison S, Levings MK, Steiner TS, Cook L. T-cell activation–induced marker assays in health and disease. *Immunol Cell Biol*. julho de 2023;101(6):491–503.
319. Rincon-Orozco B, Kunzmann V, Wrobel P, Kabelitz D, Steinle A, Herrmann T. Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de agosto de 2005;175(4):2144–51.
320. O'Neill K, Pastar I, Tomic-Canic M, Strbo N. Perforins Expression by Cutaneous Gamma Delta T Cells. *Front Immunol*. 14 de agosto de 2020;11:1839.
321. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK Cells and T Cells by NKG2D, a Receptor for Stress-Inducible MICA. *Science*. 30 de julho de 1999;285(5428):727–9.
322. Lança T, Correia DV, Moita CF, Raquel H, Neves-Costa A, Ferreira C, et al. The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to $\gamma\delta$ T-cell cytotoxicity. *Blood*. 2010;115(12):2407–11.
323. Zöllner T, Wittenbrink M, Hoffmeister M, Steinle A. Cutting an NKG2D Ligand Short: Cellular Processing of the Peculiar Human NKG2D Ligand ULBP4. *Front Immunol*. 29 de março de 2018;9:620.
324. Kuroda H, Saito H, Ikeguchi M. Decreased number and reduced NKG2D expression of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells are involved in the impaired function of V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in the tissue of gastric cancer. *Gastric Cancer*. outubro de 2012;15(4):433–9.
325. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol*. 24 de julho de 2017;8:892.
326. Donia M, Ellebaek E, Andersen MH, Straten PT, Svane IM. Analysis of V δ 1 T cells in clinical grade melanoma-infiltrating lymphocytes. *OncoImmunology*. novembro de 2012;1(8):1297–304.
327. Ferry GM, Agbuduwe C, Forrester M, Dunlop S, Chester K, Fisher J, et al. A Simple and Robust Single-Step Method for CAR-V δ 1 $\gamma\delta$ T Cell Expansion and Transduction for Cancer Immunotherapy. *Front Immunol*. 31 de maio de 2022;13:863155.
328. Fisher JPH, Yan M, Heuveljans J, Carter L, Abolhassani A, Frosch J, et al. Neuroblastoma Killing Properties of V δ 2 and V δ 2-Negative $\gamma\delta$ T Cells Following Expansion

by Artificial Antigen-Presenting Cells. *Clin Cancer Res.* 15 de novembro de 2014;20(22):5720–32.

329. Gruenbacher G, Nussbaumer O, Gander H, Steiner B, Leonhartsberger N, Thurnher M. Stress-related and homeostatic cytokines regulate V γ 9V δ 2 T-cell surveillance of mevalonate metabolism. *OncoImmunology.* 3 de agosto de 2014;3(8):e953410.

330. Capietto AH, Martinet L, Fournié JJ. Stimulated $\gamma\delta$ T Cells Increase the In Vivo Efficacy of Trastuzumab in HER-2+ Breast Cancer. *J Immunol.* 15 de julho de 2011;187(2):1031–8.

331. Tokuyama H, Hagi T, Mattarollo SR, Morley J, Wang Q, Fai-So H, et al. V γ 9V δ 2 T cell cytotoxicity against tumor cells is enhanced by monoclonal antibody drugs—Rituximab and trastuzumab. *Int J Cancer.* junho de 2008;122(11):2526–34.

332. Belghali MY, El Moumou L, Hazime R, Brahimi M, El Marrakchi M, Belaid HA, et al. Phenotypic characterization of human peripheral $\gamma\delta$ T-cell subsets in glioblastoma. *Microbiol Immunol.* outubro de 2022;66(10):465–76.

333. Angelini DF, Borsellino G, Poupot M, Diamantini A, Poupot R, Bernardi G, et al. Fc γ RIII discriminates between 2 subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways. *Blood.* 15 de setembro de 2004;104(6):1801–7.

334. Kenna T, Golden-Mason L, Norris S, Hegarty JE, O’Farrelly C, Doherty DG. Distinct subpopulations of $\gamma\delta$ T cells are present in normal and tumor-bearing human liver. *Clin Immunol.* 2004;113(1):56–63.

335. Alexander AAZ, Maniar A, Cummings JS, Hebbeler AM, Schulze DH, Gastman BR, et al. Isopentenyl Pyrophosphate–Activated CD56+ $\gamma\delta$ T Lymphocytes Display Potent Antitumor Activity toward Human Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1º de julho de 2008;14(13):4232–40.

336. Van Acker HH, Anguille S, Willemen Y, Van Den Bergh JM, Berneman ZN, Lion E, et al. Interleukin-15 enhances the proliferation, stimulatory phenotype, and antitumor effector functions of human gamma delta T cells. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 29 de setembro de 2016;9(1):1–13.

337. Nussbaumer O, Gruenbacher G, Gander H, Komuczki J, Rahm A, Thurnher M. Essential Requirements of Zoledronate-Induced Cytokine and $\gamma\delta$ T Cell Proliferative Responses. *J Immunol.* 1º de agosto de 2013;191(3):1346–55.

338. Baker FL, Bigley AB, Agha NH, Pedlar CR, O’Connor DP, Bond RA, et al. Systemic β -Adrenergic Receptor Activation Augments the ex vivo Expansion and Anti-Tumor Activity of V γ 9V δ 2 T-Cells. *Front Immunol.* 24 de janeiro de 2020;10:3082.

339. Arias-Badia M, Chang R, Fong L. $\gamma\delta$ T cells as critical anti-tumor immune effectors. *Nat Cancer.* 26 de julho de 2024;5(8):1145–57.

340. Kang SH, Hwang HJ, Yoo JW, Kim H, Choi ES, Hwang SH, et al. Expression of Immune Checkpoint Receptors on T-Cells and Their Ligands on Leukemia Blasts in Childhood Acute Leukemia. *Anticancer Res.* outubro de 2019;39(10):5531–9.

341. Peters C, Oberg HH, Kabelitz D, Wesch D. Phenotype and regulation of immunosuppressive V δ 2-expressing $\gamma\delta$ T cells. *Cell Mol Life Sci.* maio de 2014;71(10):1943–60.
342. Wistuba-Hamprecht K, Martens A, Haehnel K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, et al. Proportions of blood-borne V δ 1+ and V δ 2+ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab. *Eur J Cancer.* 1º de setembro de 2016;64:116–26.
343. Parwani KK, Branella GM, Burnham RE, Burnham AJ, Bustamante AYS, Foppiani EM, et al. Directing the migration of serum-free, ex vivo-expanded V γ 9V δ 2 T cells. *Front Immunol.* 29 de fevereiro de 2024;15:1331322.
344. Höpken UE, Rehm A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends Cancer.* junho de 2019;5(6):351–64.
345. Schultze-Florey CR, Kuhlmann L, Raha S, Barros-Martins J, Odak I, Tan L, et al. Clonal expansion of CD8+ T cells reflects graft-versus-leukemia activity and precedes durable remission following DLI. *Blood Adv.* 8 de novembro de 2021;5(21):4485.
346. Desai PN, Wang B, Fonseca A, Borges P, Jelloul FZ, Reville PK, et al. Single-Cell Profiling of CD8+ T Cells in Acute Myeloid Leukemia Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation and Clonal Hyperexpansion. *Cancer Immunol Res.* 5 de julho de 2023;11(7):1011–28.
347. Goolsby CL, Kuchnio M, Finn WG, Peterson L. Expansions of clonal and oligoclonal T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia are primarily restricted to the CD3+CD8+ T-cell population. *Cytometry.* 15 de junho de 2000;42(3):188–95.
348. Palma M, Gentilcore G, Heimersson K, Mozaffari F, Näsman-Glaser B, Young E, et al. T cells in chronic lymphocytic leukemia display dysregulated expression of immune checkpoints and activation markers. *Haematologica.* março de 2017;102(3):562–72.
349. Nunes VB da S, Dias CK, Scholl JN, Sant’Ana AN, Dias A de F, Farias MG, et al. Lymphocytes from B-acute lymphoblastic leukemia patients present differential regulation of the adenosinergic axis depending on risk stratification. *Discov Oncol.* 30 de dezembro de 2022;13:143.
350. Hoeres T, Holzmann E, Smetak M, Birkmann J, Wilhelm M. PD-1 signaling modulates interferon- γ production by Gamma Delta ($\gamma\delta$) T-Cells in response to leukemia. *OncoImmunology.* 4 de março de 2019;8(3):1550618.
351. Liu J, Wu M, Yang Y, Wang Z, He S, Tian X, et al. $\gamma\delta$ T cells and the PD-1/PD-L1 axis: a love–hate relationship in the tumor microenvironment. *J Transl Med.* 10 de junho de 2024;22(1):553.
352. Wu K, Feng J, Xiu Y, Li Z, Lin Z, Zhao H, et al. V δ 2 T cell subsets, defined by PD-1 and TIM-3 expression, present varied cytokine responses in acute myeloid leukemia patients. *Int Immunopharmacol.* 1º de março de 2020;80:106122.

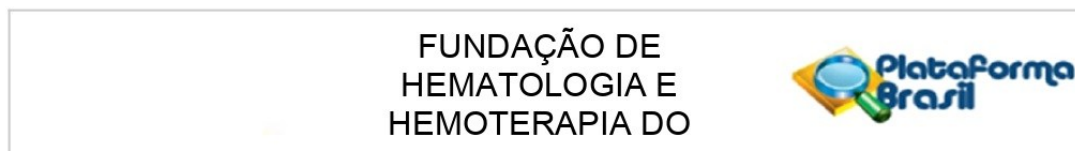
353. Iwasaki M, Tanaka Y, Kobayashi H, Murata-Hirai K, Miyabe H, Sugie T, et al. Expression and function of PD-1 in human $\gamma\delta$ T cells that recognize phosphoantigens. *Eur J Immunol.* fevereiro de 2011;41(2):345–55.
354. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* setembro de 2017;17(9):559–72.
355. Mempel TR, Lill JK, Altenburger LM. How chemokines organize the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer.* janeiro de 2024;24(1):28–50.
356. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8⁺ T-Cell Recruitment. *Cancer Res.* 1º de abril de 2009;69(7):3077–85.
357. Chheda ZS, Sharma RK, Jala VR, Luster AD, Haribabu B. Chemoattractant Receptors BLT1 and CXCR3 Regulate Antitumor Immunity by Facilitating CD8⁺ T Cell Migration into Tumors. *J Immunol.* 1º de setembro de 2016;197(5):2016–26.
358. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural Killer Cell Accumulation in Tumors Is Dependent on IFN- γ and CXCR3 Ligands. *Cancer Res.* 15 de outubro de 2008;68(20):8437–45.
359. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T Cells, Recurrence, and Survival in Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 16 de janeiro de 2003;348(3):203–13.
360. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 22 de dezembro de 2005;353(25):2654–66.
361. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 20 de dezembro de 2005;102(51):18538–43.
362. Khan AB, Carpenter B, Santos E Sousa P, Pospori C, Khorshed R, Griffin J, et al. Redirection to the bone marrow improves T cell persistence and antitumor functions. *J Clin Invest.* 1º de maio de 2018;128(5):2010–24.
363. Glatzel A, Wesch D, Schiemann F, Brandt E, Janssen O, Kabelitz D. Patterns of Chemokine Receptor Expression on Peripheral Blood $\gamma\delta$ T Lymphocytes: Strong Expression of CCR5 Is a Selective Feature of V δ 2/V γ 9 $\gamma\delta$ T Cells. *J Immunol.* 15 de maio de 2002;168(10):4920–9.
364. Zhou J, Kang N, Cui L, Ba D, He W. Anti- $\gamma\delta$ TCR antibody-expanded $\gamma\delta$ T cells: a better choice for the adoptive immunotherapy of lymphoid malignancies. *Cell Mol Immunol.* janeiro de 2012;9(1):34–44.
365. Devaud C, Bilhere E, Loizon S, Pitard V, Behr C, Moreau JF, et al. Antitumor activity of gammadelta T cells reactive against cytomegalovirus-infected cells in a mouse xenograft tumor model. *Cancer Res.* 1º de maio de 2009;69(9):3971–8.

366. Lança T, Costa MF, Gonçalves-Sousa N, Rei M, Grosso AR, Penido C, et al. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic $\gamma\delta$ T lymphocytes to tumor beds. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de junho de 2013;190(12):6673–80.
367. Chang YC, Chiang YH, Hsu K, Chuang CK, Kao CW, Chang YF, et al. Activated naïve $\gamma\delta$ T cells accelerate deep molecular response to BCR-ABL inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood Cancer J*. 16 de novembro de 2021;11(11):182.
368. Lamb LS, Pereboeva L, Youngblood S, Gillespie GY, Nabors LB, Markert JM, et al. A combined treatment regimen of MGMT-modified $\gamma\delta$ T cells and temozolomide chemotherapy is effective against primary high grade gliomas. *Sci Rep*. 26 de outubro de 2021;11(1):21133.
369. Lawrence S Lamb J, Bowersock J, Dasgupta A, Gillespie GY, Su Y, Johnson A, et al. Engineered Drug Resistant $\gamma\delta$ T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy. *PLoS ONE*. 11 de janeiro de 2013;8(1):e51805.
370. Rao A, Agrawal A, Borthakur G, Battula VL, Maiti A. Gamma delta T cells in acute myeloid leukemia: biology and emerging therapeutic strategies. *J Immunother Cancer*. fevereiro de 2024;12(2):e007981.
371. Hu Y, Hu Q, Li Y, Lu L, Xiang Z, Yin Z, et al. $\gamma\delta$ T cells: origin and fate, subsets, diseases and immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther*. 22 de novembro de 2023;8(1):434.
372. Hu Y, Chen D, Hong M, Liu J, Li Y, Hao J, et al. Apoptosis, Pyroptosis, and Ferroptosis Conspiringly Induce Immunosuppressive Hepatocellular Carcinoma Microenvironment and $\gamma\delta$ T-Cell Imbalance. *Front Immunol*. 4 de abril de 2022;13:845974.
373. Lee HW, Chung YS, Kim TJ. Heterogeneity of Human $\gamma\delta$ T Cells and Their Role in Cancer Immunity. *Immune Netw*. 2020;20(1):e5.
374. Chen D, Guo Y, Jiang J, Wu P, Zhang T, Wei Q, et al. $\gamma\delta$ T cell exhaustion: Opportunities for intervention. *J Leukoc Biol*. 25 de novembro de 2022;112(6):1669–76.
375. Bao Y, Guo L, Mo J. Characterization of $\gamma\delta$ T cells in patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. julho de 2017;14(1):1133–40.
376. Simões C, Silva I, Carvalho A, Silva S, Santos S, Marques G, et al. Quantification and phenotypic characterization of peripheral blood V δ 1 + T cells in chronic lymphocytic leukemia and monoclonal B cell lymphocytosis. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(2):164–8.
377. Bartkowiak J, Kulczycka-Wojdala D, Blonski JZ, Robak T. Molecular diversity of $\gamma\delta$ T cells in peripheral blood from patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Neoplasma*. 2002;49(2):86–90.
378. Pawlik-Gwozdecka D, Zieliński M, Sakowska J, Adamkiewicz-Drożyńska E, Trzonkowski P, Niedźwiecki M. CD8+ gamma-delta T cells correlate with favorable prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Arch Med Sci*. 1º de março de 2021;17(2):561–3.

379. Hudspeth K, Fogli M, Correia DV, Mikulak J, Roberto A, Della Bella S, et al. Engagement of NKp30 on V δ 1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication. *Blood*. 26 de abril de 2012;119(17):4013–6.
380. Lafont V, Liautard J, Sablé-Teychené M, Sainte-Marie Y, Favero J. Isopentenyl Pyrophosphate, a Mycobacterial Non-peptidic Antigen, Triggers Delayed and Highly Sustained Signaling in Human $\gamma\delta$ T Lymphocytes without Inducing Down-modulation of T Cell Antigen Receptor. *J Biol Chem*. maio de 2001;276(19):15961–7.
381. Zhao N, Dang H, Ma L, Martin SP, Forgues M, Ylaya K, et al. Intratumoral $\gamma\delta$ T-Cell Infiltrates, Chemokine (C-C Motif) Ligand 4/Chemokine (C-C Motif) Ligand 5 Protein Expression and Survival in Patients With Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* Baltim Md. março de 2021;73(3):1045.
382. Corpuz TM, Stolp J, Kim HO, Pinget GV, Gray DHD, Cho JH, et al. Differential Responsiveness of Innate-like IL-17- and IFN- γ -Producing $\gamma\delta$ T Cells to Homeostatic Cytokines. *J Immunol* Baltim Md 1950. 15 de janeiro de 2016;196(2):645–54.
383. Michel ML, Pang DJ, Haque SFY, Potocnik AJ, Pennington DJ, Hayday AC. Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing $\gamma\delta$ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de outubro de 2012;109(43):17549–54.
384. Kabelitz D, Wesch D. Features and Functions of $\gamma\delta$ T Lymphocytes: Focus on Chemokines and Their Receptors. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(5–6):339–70.
385. Mao Y, Yin S, Zhang J, Hu Y, Huang B, Cui L, et al. A new effect of IL-4 on human $\gamma\delta$ T cells: promoting regulatory V δ 1 T cells via IL-10 production and inhibiting function of V δ 2 T cells. *Cell Mol Immunol*. março de 2016;13(2):217–28.
386. Silva-Santos B, Serre K, Norell H. $\gamma\delta$ T cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 9 de novembro de 2015;15(11):683–91.
387. Sebestyen Z, Prinz I, Déchanet-Merville J, Silva-Santos B, Kuball J. Translating gammadelta ($\gamma\delta$) T cells and their receptors into cancer cell therapies. *Nat Rev Drug Discov*. 1º de março de 2020;19(3):169–84.

11. 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

FUNDAÇÃO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.982.395

Objetivo da Pesquisa:

Estudar o papel dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de novo em tratamento como possíveis biomarcadores de prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Existem riscos próprios do aspirado de medula óssea e da coleta de sangue, tais como hematomas, equimoses (manchas arroxeadas) no local da punção, que fazem parte dos riscos da rotina.

Benefícios: Com relação aos benefícios, está a contribuição para o conhecimento dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica dos pacientes, de modo a possibilitar o estabelecimento de novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica, que proporcionará melhores resultados no tratamento para novos pacientes com LLA.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de relevância científica podendo gerar grande contribuição para o acompanhamento do tratamento das leucemias agudas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória estão adequados conforme a legislação vigente.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram identificadas questões éticas que impeçam o início do estudo. Sendo assim, não há pendências e inadequações a serem apontadas.

Considerações Finais a critério do CEP:

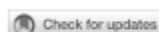
O projeto é executável e importante para estudar o papel dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda de novo em tratamento como possíveis biomarcadores de prognóstico. O projeto é viável do ponto de vista ético e está de acordo com a Res. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Diante do exposto, esse CEP julga o projeto APROVADO. Salvo melhor juízo é o parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

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. Publicação do Artigo Científico intitulado “The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications”
(<https://doi.org/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.

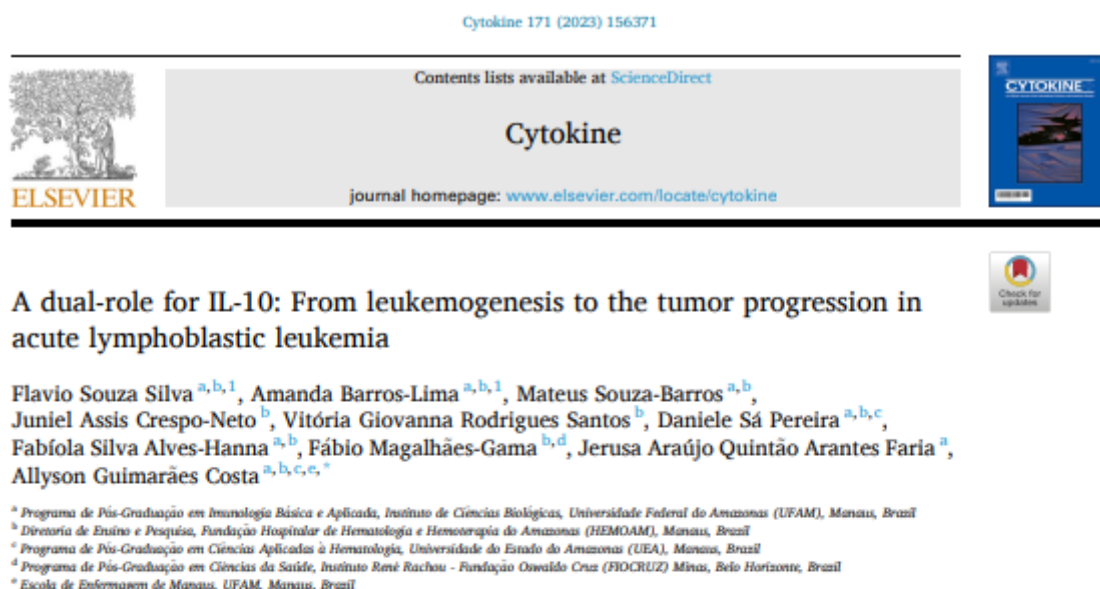
The Yin-Yang of myeloid cells in the leukemic microenvironment: Immunological role and clinical implications

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 III. Publicação do Artigo Científico intitulado “A dual-role for IL-10: from leukemogenesis to the tumor progression in acute lymphoblastic leukemia” (<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2023.156371>)



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

Available online 17 September 2023

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

Anexo IV. Apresentação do Trabalho Científico intitulado “Investigando o papel das células T não convencionais na leucemia linfoblástica aguda de células B: avaliações preliminares de células NKT, células MAIT e células T $\gamma\delta$ ”

CERTIFICADO



O programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo certifica que o trabalho intitulado **“INVESTIGANDO O PAPEL DAS CÉLULAS T NÃO CONVENCIONAIS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B: AVALIAÇÕES PRELIMINARES DE CÉLULAS NKT, CÉLULAS MAIT E CÉLULAS T $\gamma\delta$ ”**, de autoria de Mateus S. Barros, Nilberto D. Araújo, Fábio M. Gama, Thaís L.P. Ribeiro, Flavio S. Silva, Júlia S. Moraes, Fabiola S. A. Hanna, Andréa M. Tarragô, Adriana M. A. Marie e Allyson G. Costa, foi apresentado na modalidade oral durante o **XIV Curso de Inverno em Imunologia** realizado, de forma on-line, no período de 18 a 22 de julho de 2022.

Profª Drª Daniela Carlos Sartori
Comissão Organizadora do XIV Curso
de Inverno em Imunologia



Profª Drª Vânia Luiza Deperon Bonato
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada

CERTIFICADO



O programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo certifica que **MATEUS DE SOUZA BARROS** recebeu a premiação de 1º Lugar nas Apresentações Oraís, na categoria mestrado, pelo trabalho intitulado **“INVESTIGANDO O PAPEL DAS CÉLULAS T NÃO CONVENCIONAIS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS B: AVALIAÇÕES PRELIMINARES DE CÉLULAS NKT, CÉLULAS MAIT E CÉLULAS T $\gamma\delta$ ”**, no **XIV Curso de Inverno em Imunologia** realizado, de forma on-line, no período de 18 a 22 de julho de 2022.

Profª Drª Daniela Carlos Sartori
Comissão Organizadora do XIV Curso
de Inverno em Imunologia



Profª Drª Vânia Luiza Deperon Bonato
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Imunologia Básica e Aplicada

Anexo V. Apresentação e Publicação do Resumo Científico intitulado “AMD3100 promotes a rapid and efficient mobilization of bone marrow-derived hematopoietic stem cells in the bloodstream of BALB/c mice” (Hematology, Transfusion and Cell Therapy – Volume 44, Supplement 2, October 2022, Pages S324-S325).

S324

HEMATOL TRANSFUS CELL THER. 2022;44(S2):S1–S689

^a Hemocentro de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brasil

^b Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

No contexto da terapia celular, o uso de células estromais mesenquimais multipotentes (MSC) se dá em grande parte pela sua propriedade imunomodulatória. Neste processo, as MSC liberam fatores solúveis que gerenciam a citotoxicidade e proliferação das células do sistema imunológico melhorando o prognóstico de doenças inflamatórias. Entre os principais fatores está a prostaglandina E2 (PGE2), um eicosanoide sintetizado após a estimulação das MSC com a citocina inflamatória TNF- α e o aumento de expressão nas células de ciclo-oxigenase 2 (COX-2). Baseado nisto, propõe-se que moléculas que mimetizam a ação da citocina inflamatória poderiam ser selecionadas como novos moduladores de COX-2 e otimizariam funcionalmente as MSC na terapia. Diante desta hipótese, o objetivo deste trabalho foi realizar um ensaio de qPCR em larga escala para seleção destas novas moléculas. Para o desenvolvimento da abordagem, foi selecionada uma linhagem primária de MSC isolada de cordão umbilical (UC-MSC) com expressão gênica e proteica de COX-2 aumentadas após o tratamento com 100 ng/mL de TNF- α por 72 horas. No ensaio, a cultura de células recebeu os seguintes tratamentos: controle positivo de modulação de COX-2, TNF- α 100 ng/mL; controle negativo, o solvente da coleção de moléculas, DMSO, a 0,5% e, por fim, 715 moléculas, adicionadas poço a poço, com concentração de 50 μ M. O período de tratamento foi de 72 horas e, posteriormente, as placas de cultivo seguiram para extração automatizada de RNA total e síntese de cDNA. Para a reação de qPCR, o gene alvo foi PTGS2 (COX-2) e o endógeno, B2M. O método de análise dos dados foi $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Foram feitas duas triagens. As moléculas selecionadas seguiram para ensaio de validação, no qual, a UC-MSC foi tratada com diferentes concentrações da molécula (50 a 0,8 μ M) em diluição seriada fator 2. Após período de 72 horas, a proteína total foi extraída de cada tratamento e avaliada por Western Blot (WB) para expressão de COX-2. Os resultados demonstraram que em decorrência de efeitos citotóxicos e baixo rendimento, de 715 tratamentos, 590 foram analisados no qPCR. A triagem primária selecionou 53 alvos e a secundária, duas moléculas: o produto natural indirubina (PubChem: 46386581) e o anti-inflamatório piroxicam (PubChem: 46386918). Resultados preliminares da etapa de validação por WB de um isômero de indirubina (Sigma-Aldrich - PHL89716) mostram que as concentrações 12,5 e 6,2 μ M apresentam bandas mais intensas de COX-2 (volume relativo de banda: 0,159 e 0,111, respectivamente) em comparação ao tratamento com solvente DMSO (volume relativo de banda: 0,082). Para o piroxicam (PubChem: 46386918), a expressão positiva para COX-2 foi observada nas concentrações de 50 a 12,5 μ M. Não foram analisados os volumes de banda. A conclusão até o momento, é que o ensaio de qPCR em larga escala baseado no eixo TNF- α - COX-2 permitiu a seleção de duas moléculas candidatas a moduladores de COX-2. Para os próximos passos pretende-se repetir a validação por WB, determinar EC50 com base na quantificação de PGE2 em meio condicionado pelas células após o tratamento com diferentes concentrações das moléculas selecionadas e, por fim, elaborar uma abordagem

in vitro para avaliar a funcionalidade de UC-MSC previamente tratadas. **Financiamento:** CTC-FAPESP-(2013/08135-2); INCT-CNPq (465539/2014-9); CAPES (88882.378939/2019-1); FUNDHERP).

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.548>

AMD3100 PROMOTES A RAPID AND EFFICIENT MOBILIZATION OF BONE MARROW-DERIVED HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN THE BLOODSTREAM OF BALB/C MICE

MS Barros ^{a,b}, F Magalhães-Gama ^{b,c}, WLL Neves ^b, NP Garcia ^b, HNS Ibiapina ^d, AM Tarragó ^{b,d}, EB Leon ^a, AG Costa ^{a,b,d,e}, A Malheiro ^{a,b,d}, ND Araújo ^{a,b}

^a Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

^b Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil

^c Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil

^e Escola de Enfermagem de Manaus (EEM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

Introduction: Hematopoietic stem cells (HSCs) are the basis of bone marrow (BM) transplantation. Its clinical success depends on the efficient HSCs mobilization from BM to peripheral blood (PB) for leukapheresis and clinical harnessing. Although granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is the “gold standard” to stimulate the HSCs trafficking to PB, AMD3100 has emerged as a well-tolerated pharmacological strategy without significant toxicity. **Objective:** Evaluate the influence of AMD3100 and G-CSF on HSCs mobilization in BM to PB in BALB/c mice. **Material and methods:** Forty-five BALB/c mice were distributed into 5 groups to receive pre-treatment with intraperitoneal (i.p.) injection of phosphate-buffered saline (PBS) solution (160 μ l/i.p.) or G-CSF (200 μ g/kg/i.p.) for 4 consecutive days. On day 5 (D5), mice were also injected with PBS or AMD3100 (5 mg/kg/i.p.). These mice were then grouped into PBS+PBS control group (CG, n=9) PBS+G-CSF group (n=9), PBS+AMD3100 group (n=9), G-CSF+PBS group (n=9) and G-CSF+AMD3100 group (n=9). After 1 hour, BM and PB samples were subsequently collected. The mobilized CD45⁺ CD34⁺ HSCs were assessed ex vivo using Flow Cytometry. Statistical analyses were performed through GraphPad Prism (v.5) using the One-way ANOVA test with Tukey’s post-test. **Results and discussion:** Mice of the PBS+AMD3100 group exhibited significant HSCs enrichment into the BM and mobilization to PB when compared to CG and to the PBS+G-CSF group (p=0.0002). Furthermore, it was observed that mice of the G-CSF+PBS group also exhibited a higher frequency of HSCs in BM and PB compared to CG and to the PBS+G-CSF group (p=0.0002). Interestingly, mice of the G-CSF+PBS group had a significant increase of HSCs in BM when compared to

CERTIFICADO

HEMO[®]
2022

Certificamos que o trabalho "AMD3100 PROMOTES A RAPID AND EFFICIENT MOBILIZATION OF BONE MARROW-DERIVED HEMATOPOIETIC STEM CELLS IN THE BLOODSTREAM OF BALB/C MICE" de autoria de "Barros MS, Magalhães-Gama F, Neves WLL, Garcia NP, Ibiapina HNS, Tarragô AM, Leon EB, Costa AG, Malheiro A, Araújo ND" foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022, realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2022 no Transamérica Expo Center/SP, na categoria Painel - Visita Guiada.

São Paulo, 29 de outubro de 2022.

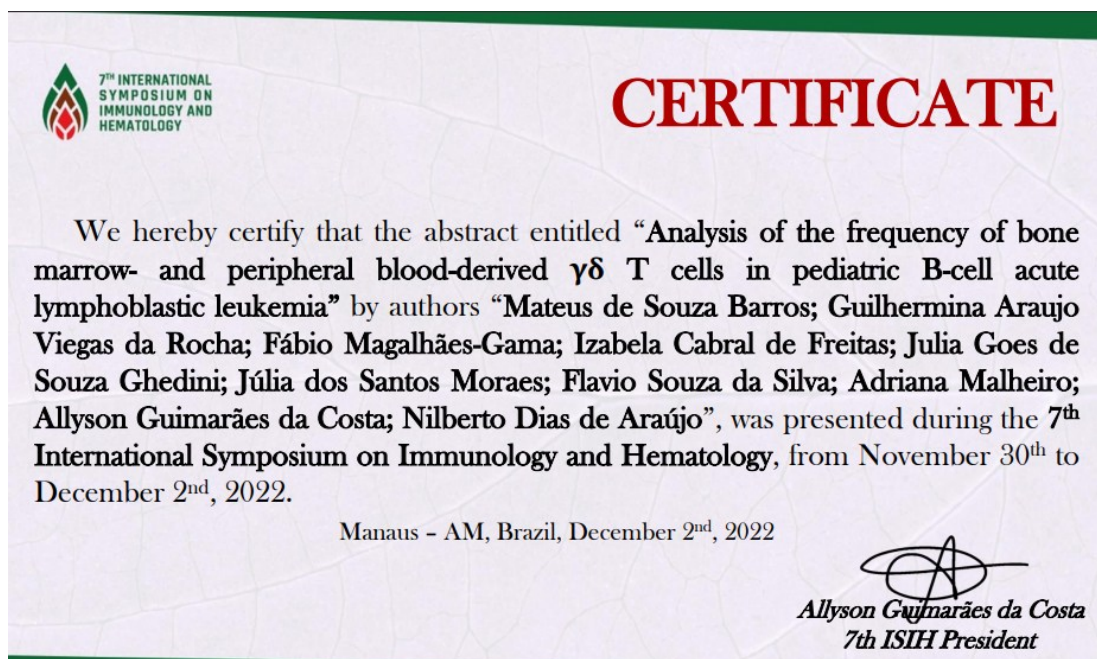


ABHH
Associação Brasileira
de Hematologia, Hemoterapia
e Terapia Celular

Rodrigo Calado
Presidente do HEMO 2022

José Francisco Comenali Marques Júnior
Presidente da ABHH

Anexo VI. Apresentação e Publicação do Resumo Científico intitulado “Analysis of the frequency of bone marrow- and peripheral blood-derived $\gamma\delta$ T cells in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia” (Anais do 7th International Symposium on Immunology and Hematology – 7th ISIH).



Honorary Mention 7th ISIH

Area: Immunology

Manaus, 02nd December 2022

Allyson G. da Costa



7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOLOGY AND HEMATOLOGY



PPGIBA
Programa de Pós-graduação em
Biologia Básica e Aplicada





7TH INTERNATIONAL
SYMPOSIUM ON
IMMUNOLOGY AND
HEMATOLOGY

Scientia Amazonia, v. 12, n.1, B1-B12, 2023

Revista on-line <http://www.scientia-amazonia.org>

ISSN:2238.1910



Realization - November 30th and December 2nd, 2022 – Manaus – Amazonas -Brazil

ANALYSIS OF THE FREQUENCY OF BONE MARROW- AND PERIPHERAL BLOOD- DERIVED $\gamma\delta$ T CELLS IN PEDIATRIC B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

Mateus de Souza Barros^{1,2*}; Guilhermina Araujo Viegas da Rocha¹; Fábio Magalhães-Gama^{1,3}; Izabela Cabral de Freitas¹; Julia Goes de Souza Ghedini¹; Júlia dos Santos Moraes¹; Flavio Souza da Silva^{1,2}; Adriana Malheiro^{1,2,4}; Allyson Guimarães da Costa^{1,2,4,5} & Nilberto Dias de Araújo^{1,2}

¹ Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil.

^{2*} Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil.

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

⁴ Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil.

⁵ Escola de Enfermagem de Manaus, UFAM, Manaus, AM, Brazil.

Background: B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) represents the most frequent cancer type in childhood. The leukemic burden in bone marrow (BM) and its release in peripheral blood (PB) results in an effector T cell mobilization that contributes to disease control. While classical T cells are strongly affected by the disease, lymphocytes, such as gamma-delta ($\gamma\delta$) T cells, exhibit higher cytotoxicity and less exhaustion, but their functional and prognostic value in B-ALL remains elusive. Thus, this study aimed to evaluate the frequency of $\gamma\delta$ T cells in children with B-ALL. **Methods:** In this study, BM and PB samples were collected from 10 children (6 males and 4 females; median age=6 years; IQR=3-8) diagnosed with B-ALL, during two-time points referred to as the day of diagnosis (D0) and the end of remission chemotherapy (D35). To constitute a control group (CG), 10 healthy children (5 males and 5 females; median age=9 years; IQR=6-13) were recruited and only PB was collected. The analysis of $\gamma\delta$ T cell frequency was performed using flow cytometry. The results were analyzed using FlowJo software (v9.4), and statistical analysis and graphing were performed using GraphPad Prism (v8.2). **Results:** We observed that, on D0, $\gamma\delta$ T cells were more frequent in PB than in BM in the B-ALL patients, although no statistical significance was observed ($p=0.0928$). Furthermore, it was observed that $\gamma\delta$ T cells were significantly more frequent in the PB of the B-ALL patients compared to the CG ($p<0.0001$) on D0. In a side-by-side analysis between the BM and PB compartments on D0 and D35, it was observed that the frequency of $\gamma\delta$ T cells in both the BM ($p=0.0465$) and PB ($p=0.0371$) was higher on D0, but decreased on D35. **Conclusion:** We demonstrated that $\gamma\delta$ T cells are affected in B-ALL. Our data indicate that these T cells expand in response to the tumor development and tend to decrease at the end of chemotherapy, and it seems that the leukemic burden is controlled after treatment, thus indicating a possible immune response. Further studies will be needed to understand the kinetics of these T cells and their prognostic value in the context of B-ALL.

Keywords: B-cell acute lymphoblastic leukemia, gamma-delta T cells, tumor microenvironment, immunosurveillance.

Financial Support: FAPEAM, CAPES and CNPq.