



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



**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL10* NO PROGNÓSTICO  
CLÍNICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA  
AGUDA**

**Mestranda: AMANDA BARROS DE LIMA**

**Orientador: Prof. Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA**

**Coorientador: Prof. Dr. GEORGE ALLAN VILLAROUCO DA SILVA**

**MANAUS - AM**

**2024**

**AMANDA BARROS DE LIMA**

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL10* NO PROGNÓSTICO  
CLÍNICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA  
AGUDA**

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

**Orientador:** Prof. Dr. ALLYSON GUIMARÃES DA COSTA

**Coorientador:** Prof. Dr. GEORGE ALLAN VILLAROUÇO DA SILVA

**MANAUS - AM**

**2024**

## Ficha Catalográfica

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

L732i Lima, Amanda Barros de  
Influência de polimorfismos no gene IL10 no prognóstico clínico de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda / Amanda Barros de Lima . 2024  
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Allyson Guimarães da Costa  
Coorientador: George Allan Villarouco da Silva  
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leucemia. 2. Polimorfismo. 3. SNV - Variante de Nucleotídeo Único. 4. IL-10 - Interleucina 10. 5. Prognóstico. I. Costa, Allyson Guimarães da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

---

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E**  
**APLICADA**

**INFLUÊNCIA DE POLIMORFISMOS NO GENE *IL10* NO PROGNÓSTICO**  
**CLÍNICO DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA**  
**AGUDA**

**Banca examinadora composta por:**

---

**Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa**  
**(Presidente)**

---

**Aya Sadahiro**  
**(Membro Titular Interno do Programa)**

---

**Dhemerson Souza de Lima**  
**(Membro Titular Externo ao Programa)**

*A minha mãe **Maria** e a minha tia **Valdeles**, pelo exemplo de vida e por todo incentivo e dedicação. Estou certa de que o maior motivo de cada conquista minha está em suas orações e apoio.*

***Dedico!***

## AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por seu grande amor e bondade em me permitir viver tantos momentos felizes e me ajudar superar os dias difíceis e a manter a esperança durante todo o percurso. Obrigada por me conceder vida, saúde e por conduzir a minha vida.

A minha *família*, em especial, minha *mãe Maria*, *minha tia Valdeles* e *minha irmã Alice* pela paciência e motivação que serviram de alicerce e combustível para as minhas realizações.

Aos meus *amigos* de longa data e a todos os que conheci pelo caminho. Obrigada pela amizade, conselhos, apoio e pela força nos momentos em que precisei, por cada bom momento que partilhamos. Vocês trouxeram leveza à minha vida e motivos para continuar sempre.

Ao meu querido e admirável amigo *Fábio Gama* que sempre esteve pronto a ajudar e fez isso com toda sua paciência e dedicação. Você esteve presente em todo processo e é mais que tudo, um grande pesquisador e um dos meus maiores exemplos nessa jornada.

À minha amiga *Juliana Neves* a quem eu tenho tanto carinho e apreço, por cada conselho e ensinamento. Obrigada por toda a disposição em ajudar e por me permitir compartilhar dos momentos de alegria, tristeza e desespero. Você trouxe um colorido novo aos meus dias cinzas, e me ensinou sobre força e persistência.

À minha amiga *Daniele de Sá* em memória aos dias cansativos de *qPCR* e aos desesperos que compartilhamos durante o mestrado, sempre seguidos de boas risadas e lições aprendidas. Obrigada por acreditar em mim e por todo incentivo, carinho e respeito.

À minha amiga *Luciana Viana* por esclarecer todas as dúvidas e por sua contribuição e apoio em momentos de incerteza e desânimo. Obrigada por estar sempre disposta a ajudar e aconselhar.

Ao *Flávio Silva*, meu grande amigo e minha dupla desde a graduação. Sou grata por todos os momentos que vivemos juntos, pelos sorrisos e pelas lágrimas que compartilhamos durante a caminhada. Você é um dos meus maiores exemplos de força, fé e bondade. Obrigada por tudo.

A meu querido *Orientador, Dr. Allyson Guimarães* por me acolher e ensinar tantas lições (muito além de termos científicos), pela paciência, e por me incentivar a fazer sempre o melhor e a superar todos os obstáculos. Você é um grande exemplo de profissional, mas acima de tudo é um ser humano maravilhoso. Obrigada por não soltar minha mão.

Ao meu *Co-Orientador, Dr. George Villarouco*, por toda contribuição para a realização desse projeto.

À *MSc. Fabíola Hanna*, pela imensurável ajuda e contribuição nas várias etapas do processo. Por todos os ensinamentos durante todos esses anos.

A **Dra. Aya Sadahiro**, pela disponibilidade e dedicação em me instruir durante o estágio docência. Foram momentos de muito aprendizado. Agradeço por toda sua contribuição em minha formação.

Ao **Edson Brazão**, por toda paciência ao esclarecer minhas dúvidas e atender as minhas solicitações. Sou grata por sua gentileza e ajuda ao longo do mestrado.

A todos os colegas do **Grupo de Pesquisa AmazonInterScience**. Guardarei com muito carinho os momentos de alegria e seriedade que partilhamos.

Aos colaboradores do **Laboratório Genômica**, em especial à **Dra. Andréa Tarragô** por todo o apoio oferecido para que os projetos sejam realizados com excelência.

A equipe de enfermagem da **Fundação HEMOAM**, em especial, **Ivani e Josema** e a equipe do **Laboratório de Marcadores Celulares da Fundação HEMOAM**, em especial, **Dr. João Paulo e Dr. Nilberto Dias** pela ajuda com a obtenção de amostras dos pacientes.

Aos colaboradores do **SAME**, por nos ajudarem com a logística de busca em prontuários e coleta de todas as informações necessárias.

A **Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)** por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela Bolsa de Mestrado e a **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)**, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.

A **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)** e ao **Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, seus Docentes e Técnicos pelos valiosos ensinamentos e pela oportunidade de qualificação profissional.

*“Todo aquele que se dedica ao estudo da ciência chega a convencer-se de que nas leis do Universo se manifesta um Espírito sumamente superior ao do homem, e perante o qual nós, com os nossos poderes limitados, devemos humilhar-nos.”*

***Albert Einstein***

## **DECLARAÇÃO DE AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), através das resoluções nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 (Programa Pró-Estado), por financiar indiretamente esta pesquisa.

## RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer infantil de maior incidência no mundo, sendo caracterizado pela proliferação clonal exacerbada de linfoblastos e acúmulo de clones leucêmicos na medula óssea. Sua etiologia ainda é pouco elucidada, no entanto, alguns fatores imunogenéticos estão associados com seu desenvolvimento, dentre estes, a produção deficiente de interleucina-10 (IL-10), relacionada à presença de mutações genéticas. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência das variantes de nucleotídeos simples (SNVs) no gene *IL10* (*rs1800871*, *rs1808796* e *rs3021094*) em pacientes pediátricos com LLA, além de descrever a relação dos SNVs com manifestações clínicas, laboratoriais e concentrações séricas de IL-10. Foi realizado um estudo do tipo caso-controle com 102 pacientes com LLA e 177 indivíduos saudáveis. As amostras de DNA foram genotipadas por PCR em Tempo Real (qPCR). As concentrações de IL-10 na medula óssea e no sangue periférico foram quantificadas por citometria de fluxo (CBA). Os dados clínicos e demográficos demonstraram que o subtipo LLA B é o mais frequente entre os pacientes com LLA e a mediana de idade foi de 7 anos. O gênero masculino apresentou maior frequência geral para ambos os grupos e 52% dos pacientes com LLA apresentaram algum tipo de comorbidade. Aproximadamente 52% dos pacientes com LLA recaíram e 34% foram à óbito ao decorrer do tratamento. O genótipo *IL10 G/T rs3021094* ([OR: 0,16; IC 95%: 0,07–0,37, p= 0,003]) foi associado à proteção contra recaída e óbito em pacientes com LLA. Já os *SNVs rs1800871* e *rs1800896* do gene *IL10* foram associados à proteção contra óbito, contudo o *SNV rs1800896* demonstrou ser indicador de risco para recaída em pacientes com LLA. Contudo, não foi observada associação entre as variantes e concentração da citocina IL-10. Em conclusão, nosso estudo demonstrou que os alelos mutados *G>T (rs3021094)* e *T>C (rs1800896)* apresentaram alta frequência em pacientes com LLA, o que sugere que essas variantes podem servir de marcadores de prognóstico. Entretanto, estudos futuros devem ser realizados para melhor elucidar o papel desses *SNVs* na LLA.

**Palavras-chave:** Leucemia; polimorfismos; SNV; IL-10, prognóstico.

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer in the world, characterized by exacerbated clonal proliferation of lymphoblasts and accumulation of leukemic clones in the bone marrow. Its etiology is still poorly understood, however, some immunogenetic factors are associated with its development, including the deficient production of interleukin-10 (IL-10) related to the presence of genetic mutations. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the influence of single nucleotide variants (SNVs) in the IL10 gene (rs1800871, rs1808796 and rs3021094) in pediatric patients with ALL, in addition to describing the relationship of SNVs with clinical and laboratory manifestations and serum concentrations of IL-10. A case-control study was carried out with 102 patients with ALL and 177 healthy individuals. The DNA samples were genotyped by Real-Time PCR (qPCR). IL-10 concentrations in bone marrow and peripheral blood were quantified by flow cytometry (CBA). Clinical and demographic data demonstrated that the ALL B subtype is the most common among patients with ALL and the median age was 7 years. Males had a higher overall frequency for both groups and 52% of patients with ALL had some type of comorbidity. Approximately 52% of patients with ALL relapsed and 34% died during treatment. The IL10 G/T rs3021094 genotype ([OR: 0.16; 95% CI: 0.07–0.37,  $p= 0.003$ ]) was associated with protection against relapse and death in patients with ALL. The SNVs rs1800871 and rs1800896 of the IL10 gene were also associated with protection against death, however the SNV rs1800896 was shown to be an indicator of risk for relapse in patients with ALL. However, no association was observed between the variants and concentration of the cytokine IL-10. In conclusion, our study demonstrated that the mutated alleles G>T (rs3021094) and T>C (rs1800896) were highly frequent in patients with ALL, which suggests that these variants may serve as prognostic markers. However, future studies must be carried out to better elucidate the role of these SNVs in ALL.

**Keywords:** Leukemia; polymorphisms; SNV; IL-10, prognosis.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação da leucemia linfoblástica aguda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).....	24
<b>Tabela 2.</b> Classificação morfológica de leucemia linfoide aguda de acordo com o grupo <i>French-American-British</i> (FAB) .....	25
<b>Tabela 3.</b> Variantes de <i>IL10</i> em estudo associadas a doenças em humanos.....	37
<b>Tabela 4.</b> Características clínicas e demográficas de pacientes com leucemia linfoblástica aguda e controles selecionados.....	53
<b>Tabela 5.</b> Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de <i>single nucleotide variant</i> (SNVs) em estudo com leucemia linfoblástica aguda. ....	55
<b>Tabela 6.</b> Frequência dos alelos e genótipos de <i>single nucleotide variant</i> (SNVs) no gene <i>IL10</i> em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e em indivíduos controles. ....	54
<b>Tabela 7.</b> Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de <i>single nucleotide variant</i> (SNVs) em estudo com recaída.....	56
<b>Tabela 8.</b> Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de <i>single nucleotide variant</i> (SNVs) em estudo com óbito em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. ....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Taxa de incidência mundial de leucemia para ambos os sexos (0-19 anos).....	20
<b>Figura 2.</b> Esquema da hipótese de infecção tardia de Mel Greaves .....	22
<b>Figura 3.</b> Células sanguíneas de um indivíduo saudável e de um indivíduo com leucemia. .....	26
<b>Figura 4.</b> Morfologia celular da Leucemia linfoblástica aguda.....	27
<b>Figura 5.</b> Diagrama da Hematopoiese. ....	30
<b>Figura 6.</b> Mapa do gene <i>IL10</i> no cromossomo 1q32.1 .....	35
<b>Figura 7.</b> Fluxograma das etapas de obtenção e processamento de amostras utilizadas no estudo.....	40
<b>Figura 8.</b> Etapas da genotipagem de amostras.....	41
<b>Figura 9.</b> Etapas da quantificação de moléculas por Cytometric Bead Array (CBA). ....	42
<b>Figura 10.</b> Níveis circulantes de citocina entre os genótipos do SNV <i>IL10</i> em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

APC	Antigen Presenting Cells (Célula Apresentadora de Antígeno)
AP	Proteína Ativadora
BFM	Grupo Alemão <i>Berlim-Frankfurt- Munique</i>
CAAE	Certificado de Apresentação e Apreciação Ética
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Classificação Internacional de Doenças
c-MAF	Fator fibrossarcoma-musculo-aponeurótico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mensurável
EHW	Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i>
FAB	Classificação <i>French-American-British</i> (Francesa- Americana-Britânica)
GBTLI	Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância
HEMOAM	Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IC	Intervalo de confiança
IFN- $\gamma$	Interferon-gama
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
ILSG	<i>International Lymphoma Study Group</i> (Grupo Internacional de Estudo de Linfoma)
IRF	Fator de regulação de Interferon
Kb	Quilobase
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica

mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
NF-KB	Fator nuclear kappa B
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
qPCR	<i>Real-Time Quantitative</i> (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
PRR	Receptores de Reconhecimento Padrão
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
r.p.m	Rotações por minuto
SAME	Setor de Atendimento Médico e Estatístico
SNC	Sistema Nervoso Central
SNV	<i>Single- nucleotide variant</i> (Variante de nucleotídeo único)
STAT	Proteínas Transdutoras de Sinal Ativadoras de Transcrição
uL	Microlitro
$\chi^2$	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 LEUCEMIAS .....	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.3 ETIOLOGIA.....	21
2.4 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	22
2.5 CLASSIFICAÇÃO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	23
2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	25
2.7 DIAGNÓSTICO.....	27
2.8 TRATAMENTO.....	28
2.9 FISIOPATOGENIA DA LEUCEMIA.....	30
2.10 RESPOSTA IMUNE DA LEUCEMIA.....	31
2.11 IMUNORREGULAÇÃO .....	32
2.12 INTERLEUCINA-10 .....	34
2.13 O PAPEL DA IL-10 NA LEUCEMIA.....	35
2.14 <i>SINGLE-NUCLEOTIDE VARIANTS</i> DE IL-10 .....	36
3. OBJETIVOS .....	37
3.1. OBJETIVO GERAL .....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. ASPECTOS ÉTICOS .....	38
4.2. MODELO DE ESTUDO .....	38
4.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	38
4.4. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	39
4.5. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	39
4.6. COLETA DE DADOS.....	39
4.7. GENOTIPAGEM.....	40
4.8. QUANTIFICAÇÃO DE IL-10 .....	41

4.9.	ANÁLISE DE DADOS .....	42
5.	RESULTADOS .....	43
5.1.	CAPÍTULO I – PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO.....	43
5.2.	CAPÍTULO II – DADOS OBTIDOS NO ESTUDO .....	53
5.2.1.	<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES</b> 53	
5.2.2.	<b>ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA .....</b>	54
5.2.3.	<b>ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM RECAÍDA .....</b>	56
5.2.4.	<b>ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM ÓBITO.....</b>	57
5.2.5.	<b>ASSOCIAÇÃO DOS SNVs <i>IL10</i> A/G <i>rs1800871</i>, T/C <i>rs1800896</i>, G/T <i>rs3021094</i> COM A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-10 .....</b>	58
6.	DISCUSSÃO.....	59
7.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	62
8.	CONCLUSÃO.....	63
	REFERÊNCIAS .....	63
	ANEXO .....	79

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma doença heterogênea, caracterizada pela proliferação exacerbada de glóbulos brancos na medula óssea, e pode acometer o sangue periférico (1). A LLA é a neoplasia hematopoiética que mais acomete crianças e adolescentes, correspondendo a 75% dos casos e alcançando a 10<sup>a</sup> posição entre os tipos de câncer de maior incidência no mundo (2). Sua etiologia ainda não está bem elucidada, todavia, fatores como a exposição a radiações ionizantes, síndromes congênitas (síndrome de Down, neurofibromatose e anemia de Fanconi), em conjunto explicam menos de 10% dos casos (3). Entre outros fatores que podem contribuir para o desenvolvimento e progressão da doença estão estilo de vida e histórico familiar (4).

Devido a produção aumentada de progenitores linfoides disfuncionais, a produção das outras linhagens celulares é comprometida levando aos sinais clínicos iniciais mais comuns como anemia, neutropenia e trombocitopenia, caracterizando a tríade leucêmica (5). O diagnóstico da LLA é fundamental para a classificação da doença e é essencial para as decisões terapêuticas (6). A idade ao diagnóstico é um fator importante para a resposta ao tratamento e melhor sobrevida (7). Dentre os principais exames utilizados para o diagnóstico de LLA estão o mielograma e a imunofenotipagem por citometria de fluxo. O hemograma também pode ser utilizado como um exame primário ou complementar. Além disso, exames citogenéticos têm contribuído de maneira significativa para a compreensão da biologia molecular da LLA (8).

Os esquemas terapêuticos diferem de acordo com o perfil do paciente e estratificação do grupo de risco. A principal fase do tratamento da LLA é denominada indução à remissão e consiste na obtenção do estado de remissão completa do paciente, com os valores de blastos <5% e com >25% de células normais na medula óssea (9). Contudo, 1/5 dos pacientes que alcançam a remissão recaem devido a presença de células residuais não detectadas por exames convencionais, sendo necessário o monitoramento de doença residual mensurável (DRM) para a avaliação do prognóstico. Além disso, diversos estudos utilizam a DRM para determinar a melhor abordagem terapêutica pós-indução (10).

Os mecanismos imunológicos envolvidos no surgimento e progressão da doença em pacientes com LLA ainda estão sendo investigados, contudo um desequilíbrio imunológico está associado ao desenvolvimento da neoplasia. Estudos apontam para uma

relação entre a resposta imune frente a infecções e o desenvolvimento da LLA. Dentre as hipóteses, destaca-se a de Mel Greaves, que sugere um modelo baseado no tempo de exposição e na estimulação dos mecanismos imunológicos da criança, onde, uma mutação genética produzida no útero, originaria um clone pré-leucêmico e a partir da baixa estimulação do sistema imunológico ao nascer frente a infecções seguida de uma segunda infecção tardia, culminaria em um estado de estresse nesse sistema imune despreparado, e assim aumentando as chances de desenvolvimento do processo neoplásico (2,11,12).

Dentre as citocinas imunossupressoras, a mais importante na regulação e modulação de respostas imunológicas é a IL-10, citocina chave do perfil gerado pelos Linfócitos T regulatórios (Tregs), que possuem funções imunoestimulantes e imunossupressoras capazes de inibir a ação dos linfócitos, evitando respostas hiperativas em infecções patogênicas (13). Concentrações séricas elevadas de IL-10 foram relatadas em muitas doenças malignas e a sua influência na patogênese da LLA tem sido alvo de diversas pesquisas, visto que pesquisas recentes sugerem que *Single-Nucleotide Variant* (SNVs) na região promotora do gene *IL10* podem estar associados com a suscetibilidade à leucemia (14). Assim, faz-se necessário uma avaliação mais precisa sobre o papel da IL-10 no contexto da LLA, a fim de descrever o perfil clínico-hematológico dos pacientes pediátricos com LLA, bem como investigar a associação de SNVs no gene *IL10* com o desfecho clínico.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 LEUCEMIAS**

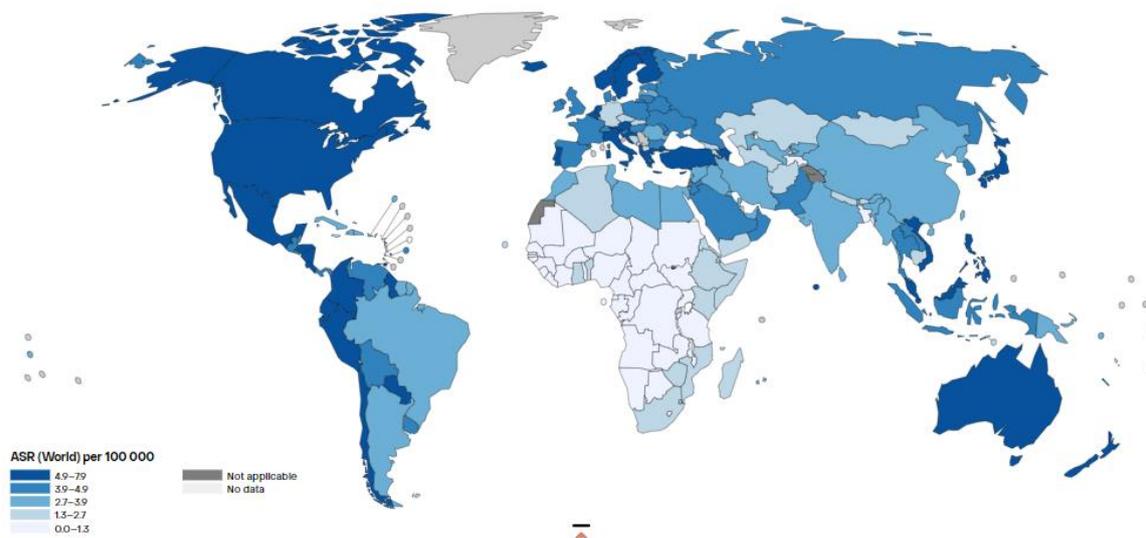
As leucemias são um grupo heterogêneo de neoplasias do sangue, sendo caracterizadas pela proliferação anormal de clones leucêmicos, resultante do comprometimento funcional da célula tronco hematopoiética (15). As leucemias diferem entre si de acordo com suas características clínicas, morfológicas, imunofenotípicas e genético-moleculares, podendo ser classificadas de acordo com a linhagem acometida em mieloide (quando afeta leucócitos, plaquetas e hemácias) ou linfoide (quando acomete os linfócitos T ou B); e tempo de evolução/proliferação em aguda ou crônica. Desta forma temos como os principais tipos: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (16).

As células imaturas, denominadas blastos, constituem cerca de 1% a 5% do compartimento medular em um indivíduo normal. Nas leucemias agudas, há proliferação rápida de blastos que não conseguem realizar suas funções normais. Essas células se desenvolvem de modo exacerbado e são liberadas na corrente sanguínea ainda em sua forma disfuncional (15). Em contraste, nas leucemias crônicas há uma progressão mais lenta de células maduras disfuncionais, ocorrendo em sua maioria em indivíduos adultos (15).

### **2.2 EPIDEMIOLOGIA**

As leucemias ocupam o décimo lugar entre as causas de morte por câncer, sendo a LLA o câncer pediátrico mais incidente, representando 80% dos casos em crianças de 2 a 5 anos de idade e 20% em indivíduos adultos (17,18). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os países industrializados apresentam as maiores taxas de LLA (Figura 1) devido a maior exposição a pesticidas, agentes químicos e radiação ionizante (17,19).

**Figura 1.** Taxa de incidência mundial de leucemia para ambos os sexos (0-19 anos).



Fonte: Globocan (2020).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a leucemia foi o 13º tipo de câncer mais frequente em 2017, representando 1,7% do total de novos casos. Com relação à mortalidade, a taxa de óbitos por leucemia no Brasil, representa 3,1% do total de óbitos por câncer no mesmo ano, sendo o 8º tipo de câncer com maior mortalidade de acordo com o DATASUS (2019) (20). Para o triênio 2023-2025 são estimados aproximadamente 11.540 novos casos de leucemia em cada ano (21).

De acordo com o Registro de Câncer de Base Populacional (RCBP), a região Norte apresenta as maiores taxas de incidência do país, sendo responsável por 39% dos casos (2,22). Além disso, segundo estimativas para o ano de 2023 das taxas de incidência de câncer, o número esperado de casos novos de leucemia é de 4,53 por 100 mil habitantes em homens e 3,64 por 100 mil habitantes em mulheres (23,24). Um estudo realizado por Silva- Júnior et al. (2019), demonstrou que além da capital Manaus, os municípios do interior do Amazonas, Tefé e Maués, apresentaram alta frequência de casos de LLA (11 e 10 casos, respectivamente) (25).

O estudo demonstrou ainda que a maioria dos pacientes com LLA (de ambos os sexos) residia em Manaus, levantando a hipótese de que os maiores recursos financeiros da capital quando comparados aos municípios do interior do Amazonas, em conjunto com a falta de serviços de hemovigilância em regiões mais isoladas e a dificuldade de acessos intermunicipais permitem um melhor diagnóstico de pacientes na capital, bem como

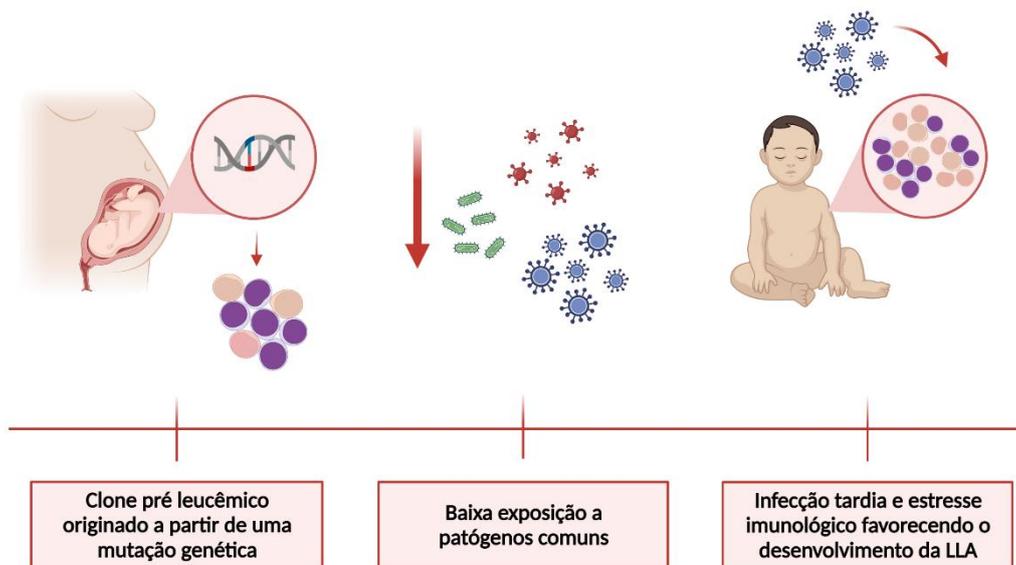
melhor notificação. Contudo, os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer tendem a aumentar as taxas de incidência, devido à industrialização e maior exposição ao tabaco e poluição ambiental (25).

### 2.3 ETIOLOGIA

A etiologia da LLA permanece desconhecida, contudo, a literatura descreve como uma doença multifatorial em que fatores ambientais e genéticos desempenham papéis significativos no seu desenvolvimento (11). De acordo com estudos realizados, dentre os fatores de risco mais comuns para o desenvolvimento da leucemia estão o histórico familiar, síndromes congênitas e anormalidades genéticas, fatores associados ao estilo de vida, como o tabagismo, exposições químicas, como pesticidas e derivados, e radiação (terapêutica, ocupacional e relacionada à guerras) (4). Além disso, no Japão, altas doses de radiação ionizante em sobreviventes das bombas atômicas de Hiroshima e ????

Dentre as hipóteses sobre as causas da LLA, a de Mel Greaves é considerada a mais aceita na comunidade científica (Figura 2). Greaves sugere uma hipótese de “infecção tardia” baseada no tempo de exposição e na estimulação de mecanismos imunológicos da criança, estabelecido por duas etapas críticas ou “*two-hits*”, em que no primeiro hit, uma mutação “*in utero*” origina um clone pré-leucêmico e no segundo hit, uma mutação pós-natal, a partir de uma baixa estimulação do sistema imunológico na primeira infância promove o desenvolvimento da LLA (11). Nesse cenário, a ausência de exposição infecciosa microbiana no sistema imune durante o período neonatal ou na infância impactam nas vias de sinalização inflamatória, uma vez que os metabólitos das bactérias comensais promovem células T reguladoras (11).

**Figura 2.** Esquema da hipótese de infecção tardia de Mel Greaves



**Fonte:** Adaptado de Greaves et. Al. 2018.

Além disso, evidências sugerem que crianças com uma função imune desregulada ao nascimento possuem maior risco de desenvolver LLA, devido a menor concentração de interleucina-10 (IL-10), uma citocina fundamental para a prevenção de respostas imunes hiperativas a infecções (26). Esses achados sugerem que o nível de citocinas neonatais influenciam no desenvolvimento imunológico pós-natal, uma vez que o estresse biológico da infecção pós-natal em conjunto com uma resposta imune desregulada aumentam as chances do surgimento de um clone pré-leucêmico e conferem uma maior oportunidade para a ocorrência de uma segunda infecção necessária para o desenvolvimento da LLA (26).

## 2.4 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é caracterizada pela proliferação e o acúmulo de precursores linfoides originados de células B ou T na medula óssea, no sangue periférico e em locais extramedulares (2). Embora afete todas as faixas etárias, a LLA apresenta maior incidência em crianças entre 2 e 3 anos de idade, sendo quatro vezes mais frequente que a leucemia mieloide aguda (27). A idade ao diagnóstico afeta significativamente a sobrevivência global, considerando que as taxas de cura para pacientes pediátricos são superiores a 80% quando comparadas aos pacientes adultos em que a taxa

de cura é estimada em 20% a 40% (28,29). Estudos recentes demonstram que indivíduos adultos apresentam maior resistência à quimioterapia e são mais predispostos à recidiva da doença após a obtenção inicial da remissão completa (29).

Na última década, foram feitos diversos avanços significativos para a compreensão da patogênese da doença, desde o refinamento de grupos de prognósticos ao desenvolvimento de novas terapias que visam subconjuntos específicos de LLA (29). Além disso, diversas alterações genéticas específicas têm sido associadas ao seu desenvolvimento e/ou possuem influência no prognóstico dos pacientes (5,30).

## **2.5 CLASSIFICAÇÃO DA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

A classificação da doença baseada em evidências é imprescindível para o monitoramento da incidência global, investigação dos aspectos da causa e tratamento da doença (31). A classificação das neoplasias linfoides estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) fornece uma referência mundial, com uma abordagem multidisciplinar para o diagnóstico (Tabela 1), baseada na classificação desenvolvida pelo *International Lymphoma Study Group (ILSG)* em meados de 1990 (32).

As definições estabelecidas foram adotadas para uso de médicos, patologistas e cientistas e adicionadas aos códigos da Classificação Internacional de Doenças (CID) servindo como referência global para o monitoramento em organizações nacionais e internacionais de políticas de saúde (33,34). A LLA é dividida em dois grandes grupos de acordo com a linhagem celular: leucemia linfoblástica aguda de precursor B (LLA-B) e leucemia linfoblástica aguda de precursor T (LLA-T), inserindo o perfil citogenético dos blastos leucêmicos e anormalidades genéticas recorrentes (2,22).

**Tabela 1.** Classificação da leucemia linfoblástica aguda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS).

<b>Classificação da OMS para neoplasias precursoras de células B</b>
<b>Leucemias linfoblásticas de células B</b>
Leucemia linfoblástica aguda B não especificada em outras partes (NOS)
Leucemia linfoblástica aguda B com anormalidades genéticas recorrentes
Leucemia linfoblástica aguda B com hiperdiploidia elevada
Leucemia linfoblástica aguda B com hipodiploidia
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>iAMP21</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>BCR::fusão ABL1</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>BCR::Características semelhantes a ABL1</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com rearranjo <i>KMT2A</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>ETV6::fusão RUNX1</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>ETV6::Características semelhantes a RUNX1</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>TCF3::fusão PBX1</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com <i>IGH::fusão de IL3</i>
Leucemia linfoblástica aguda B com fusão <i>TCF3::HLF</i>
<b>Leucemia linfoblástica aguda T</b>
Leucemia linfoblástica aguda célula T precursora precoce (“early T-cell precursor”)
Leucemia Linfoblástica Aguda de Células Natural Killer

**Fonte:** Organização Mundial da Saúde (2022)

Além disso, a última atualização da OMS em 2022 conferiu a LLA novas entidades e subtipos à lista de anormalidades genéticas recorrentes (34). As neoplasias hematológicas de precursor B, em sua maioria, são classificadas de acordo com alterações de ploidia, como hipodiploidia (perda do número de cromossomos) e hiperdiploidia (aumento do número de cromossomos) (34,35). Para esses grupos, a nomenclatura é focada nos eventos moleculares e não nas alterações citogenéticas, permitindo a aplicação de diversas técnicas para a detecção (35).

Outras atualizações como a adição da rara fusão *TCF3::HLF* refletem a inclusão de novas descobertas genéticas e refinamentos nas definições de entidades fundamentadas em características de expressão genética (36,37). Além dos critérios da OMS, o grupo

*French-American-British* (FAB) classifica leucemias linfoides em três categorias (L1, L2, L3), onde são considerados vários parâmetros morfológicos como relação núcleo-citoplasmática, presença e número de núcleos, regularidade da membrana nuclear e tamanho da célula conforme a Tabela 2 (8).

**Tabela 2.** Classificação morfológica de leucemia linfóide aguda de acordo com o grupo *French-American-British* (FAB)

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

**Fonte:** Adaptado de Farias, 2004.

## 2.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

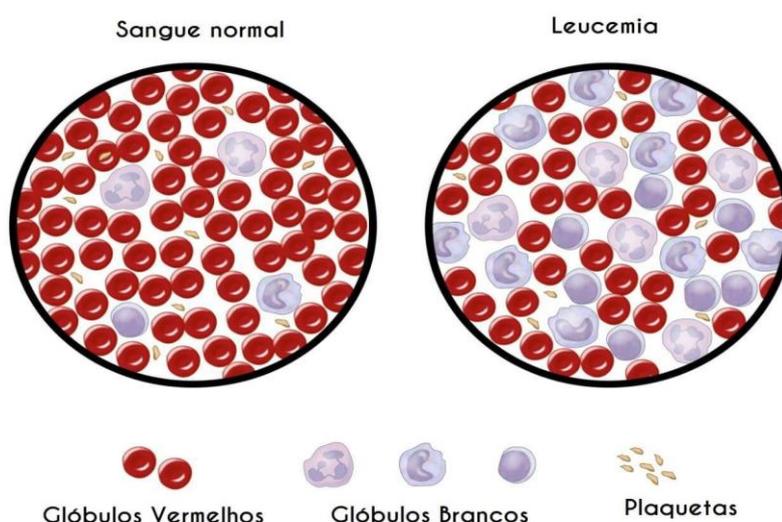
A complexidade e o espectro das neoplasias hematológicas ressaltam a relevância da correlação clínico-patológica com a disponibilidade de estudos auxiliares a respeito da LLA (38). As manifestações clínicas da LLA estão associadas ao aumento de células leucêmicas que predominam na medula óssea e interrompem a hematopoiese normal (30). Os blastos presentes na medula óssea, ocupam de 20-30% do total de células nucleadas, podendo chegar a 80-100% de ocupação o que pode ocasionar insuficiência da medula

óssea e comprometimento imunológico. Uma vez na corrente sanguínea, essas células podem infiltrar órgãos, principalmente linfonodos, baço, timo, fígado, gengiva, órbita ocular, sistema nervoso central (SNC), testículos e pele (2).

A infiltração de clones malignos no timo é observada como uma massa mediastal anterior, sendo responsável por 10% da LLA recém-diagnosticada, principalmente leucemia linfoblástica aguda de células T (39). O aumento do testículo é observado em cerca de 2% dos pacientes e se apresenta como uma massa unilateral e indolor (40,41). Além disso, o comprometimento do SNC pode se manifestar como sintomas de aumento da pressão intracraniana, incluindo dor de cabeça, rigidez na nuca, vômitos e convulsões (42–44).

Como consequência da produção aumentada de progenitores linfóides imaturos, pode ser observado comprometimento na produção das outras linhagens celulares como as hemácias, leucócitos e plaquetas (Figura 3) ocasionando os sintomas iniciais mais comuns da LLA, como anemia, infecções (geralmente associada à neutropenia) e hemorragias. Dentre as anormalidades laboratoriais, pode-se encontrar ainda concentrações elevadas de ácido úrico e lactose desidrogenase, associados à carga e ao grau de lise tumoral (5). Além disso, sintomas mais específicos como linfadenopatia, hepatomegalia e esplenomegalia estão presentes em mais de 60% dos pacientes (45).

**Figura 3.** Células sanguíneas de um indivíduo saudável e de um indivíduo com leucemia.



**Fonte:** Abrale (2020)

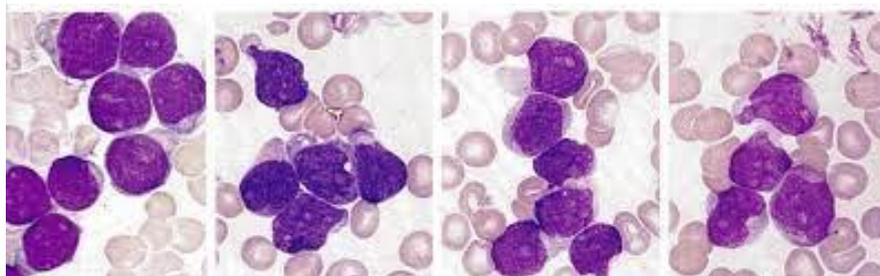
Entre as crianças, dores nas extremidades e articulações podem ser os únicos sintomas de apresentação da doença. A dor óssea é um sintoma clínico que representa o comprometimento leucêmico do periósteo ou de todo o osso, e/ou uma infiltração na articulação por células leucêmicas (46). Já os pacientes adultos geralmente apresentam doença extranodal e os sintomas podem incluir dor abdominal, náuseas, vômito ou sangramento gastrointestinal. A apresentação clínica da LLA é inespecífica e pode incluir fadiga ou letargia, febre, sudorese noturna, perda de peso e dispneia. Os pacientes podem apresentar ainda sintomas cardíacos e neurológicos (47,48).

## 2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da LLA é essencial para a classificação da doença, além de desempenhar um papel fundamental nas decisões terapêuticas (6). A abordagem inicial do diagnóstico é realizada com base no quadro clínico do paciente, em conjunto com a análise morfológica, citoquímica e imunofenotípica do sangue periférico e do compartimento medular, além da avaliação citogenética para a observação de possíveis alterações cromossômicas do paciente (19,45).

Dentre os exames realizados, o hemograma é o principal exame de rotina para a suspeita do diagnóstico. Através do hemograma é possível identificar os principais achados laboratoriais da doença, contudo o nível de blastos pode estar abaixo do esperado em pacientes leucopênicos. Desta forma, a confirmação do diagnóstico é obtida através do mielograma que consiste na realização de uma punção medular para a análise da morfologia e produção das células do sangue pela medula óssea (Figura 4) (8).

**Figura 4.** Morfologia celular da Leucemia linfoblástica aguda.



**Fonte:** Abrale (2020)

A medula óssea apresenta-se hiper celular, com substituição dos elementos medulares normais por células leucêmicas, com precursores mieloides e eritróides de aspecto normal diminuídos ou ausentes (8). É necessário determinar a porcentagem de blastos presentes no compartimento medular. Um diagnóstico de LLA requer que pelo menos 20% das células na medula óssea sejam blastos (8). Em circunstâncias normais, essas células não são mais do que 5% das células da medula óssea (49).

Além disso, a imunofenotipagem possibilita a identificação da linhagem celular (T ou B) e os diferentes estágios de maturação da célula, elevando o percentual de casos corretamente classificados para 99% (8). Em alguns casos, exames de imagem como ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e ecocardiograma também podem ser solicitados, bem como a punção lombar para análise do líquido cefalorraquidiano (líquor) (50).

## **2.8 TRATAMENTO**

Durante as últimas décadas obteve-se um progresso significativo no desenvolvimento de terapias curativas para neoplasias pediátricas (51). No que diz respeito a LLA as taxas de sobrevivência aumentaram de 60% para aproximadamente 90% nos últimos 5 anos (52). Dentre as crianças com LLA, aproximadamente 98% alcançam a remissão. Estima-se que aproximadamente 85% dos pacientes com idade de 1 a 18 anos recém-diagnosticados e tratados nos esquemas atuais sejam livres de eventos a longo prazo (52). Contudo, uma avaliação mais precisa do risco de recaída em pacientes é importante para garantir que o tratamento intensivo seja limitado aos casos de alto risco, de modo que os casos de baixo risco não sejam expostos a toxicidades indevidas (53).

Os esquemas terapêuticos variam de acordo com o centro de tratamento, contudo os protocolos de tratamento da LLA têm como etapas a indução de remissão que consiste na introdução de fármacos para eliminar a maior quantidade de blastos possíveis, fazendo com que o compartimento medular apresente menos de 5% dessas células e que o sangue periférico atinja os valores normais de leucócitos, hemácias e plaquetas (54). Em seguida, tem-se a fase de consolidação da remissão, que busca erradicar as células leucêmicas residuais através da associação de diversos quimioterápicos. Por fim, a fase de manutenção, em que o tratamento ocorre de maneira mais branda e contínua por meses, a fim de prevenir o acontecimento da recaída (54).

Um dos protocolos mais utilizados é o desenvolvido pelo grupo europeu *Berlin-Frankfurt-Munich* (BFM) que inclui quatro fases: indução da remissão, consolidação, manutenção e profilaxia do sistema nervoso central (55). O protocolo BFM utiliza uma abordagem chamada terapia de reindução durante a fase de consolidação, que consiste na utilização das mesmas drogas administradas durante a fase de indução. Posteriormente é realizada a terapia de manutenção, cujo objetivo é a eliminação das células leucêmicas residuais. Nessa fase, especificamente, a quimioterapia é menos intensiva e a profilaxia do SNC é iniciada durante a fase de indução, incluindo quimioterapia e radioterapia (56).

No Brasil, o primeiro protocolo para o tratamento da LLA foi desenvolvido na década de 80 pelo Grupo Cooperativo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoblástica Aguda na Infância (GBTLI) (57,58). A partir daí, diversos estudos para o aperfeiçoamento do protocolo foram realizados em 82, 85, 93 e 99, e atualmente encontra-se na sexta versão (GBTLI-2009) cujo conceito é baseado nos estudos GBTLI LLA-93 e LLA-99 (10). Esses protocolos adotaram como critério de risco, dados clínico-laboratoriais ao diagnóstico e resposta precoce à terapia de indução, adaptando a intensidade da quimioterapia de acordo com o grupo de risco (10).

A quimioterapia promove a destruição das células neoplásicas através de mecanismos inerentes ao ciclo celular. Dentre os principais fármacos estão: agentes alquilantes, que formam ligações covalentes com o DNA, inibindo a replicação, os antimetabólitos que bloqueiam vias metabólicas envolvidas na síntese de DNA, antibióticos citotóxicos que evitam a divisão celular e derivados de plantas que afetam especificamente a formação do fuso mitótico. Na LLA, os medicamentos mais utilizados são: dexametasona, prednisona, metotrexato, vincristina, daunorubicina, citarabina, L-asparaginase/PEG-L-asparaginase, 6-mercaptopurina, ciclofosfamida e nelarabine (59).

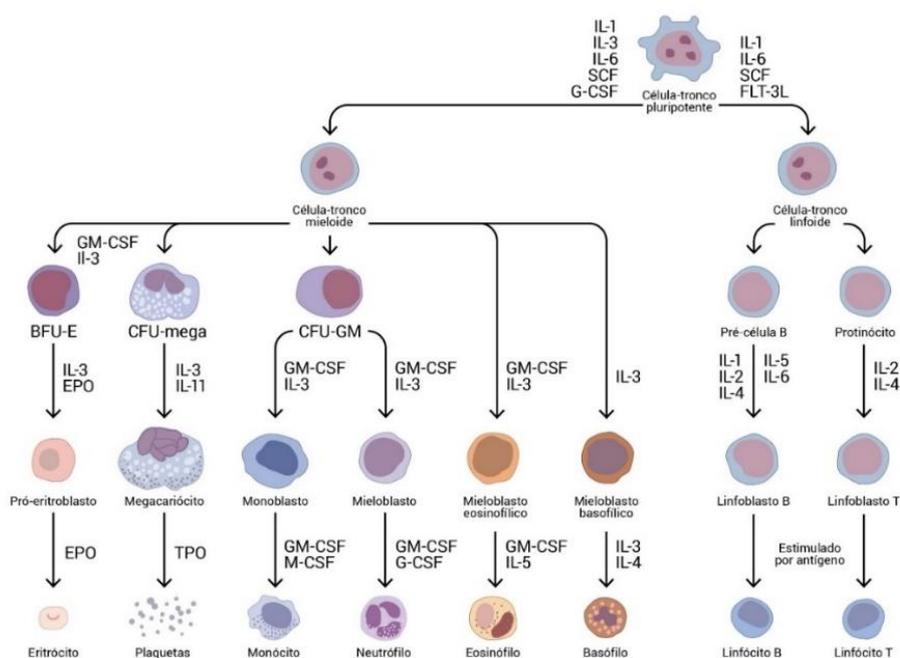
Dentre os fatores que influenciam na resposta ao tratamento estão: idade ao diagnóstico (recém-nascidos possuem um risco mais alto de falha ao tratamento), sexo, raça e etnia, contagem de leucócitos ao diagnóstico, envolvimento do sistema nervoso central ao diagnóstico e peso no diagnóstico e durante o tratamento. (52). Além disso, a implantação da Doença Residual Mensurável (DRM) também demonstrou um impacto importante no prognóstico dos pacientes. A DRM refere-se a presença de células residuais na medula óssea e, raramente, na circulação sanguínea periférica, após o início da terapia de indução a remissão, dando origem à recaída da doença (10).

A detecção de DRM é imprescindível para a definição dos perfis de risco para pacientes e para prever o resultado e selecionar as melhores estratégias de tratamento adicionais na probabilidade de recidiva (60). As células residuais podem ser classificadas como remanescentes da LLA tratada ou como LLA secundária transformada, os dois tipos celulares diferem entre si em decorrência dos padrões únicos de rearranjos e variações genéticas presentes (61,62).

## 2.9 FISIOPATOGENIA DA LEUCEMIA

Todas as células sanguíneas são originadas a partir de um precursor celular comum e indiferenciado, em um processo denominado hematopoiese. Esse processo consiste na formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue, sendo esses precursores conhecidos como células tronco e possuem a capacidade de divisão, autorrenovação e diferenciação celular (Figura 5). Toda a hematopoiese é regulada por fatores de transcrição e fatores de crescimento. Na leucemia, as células tronco sofrem mutações no rearranjo de DNA, originando clones malignos (63).

**Figura 5.** Diagrama da Hematopoiese.



**Fonte:** Adaptado de Orkin & Zon, 2008.

O organismo humano está exposto a diversos fatores carcinogênicos. Embora a predisposição individual tenha um papel decisivo na resposta final da oncogênese, não é possível definir o quanto ela influencia na relação entre a dose e o tempo de exposição ao carcinógeno com a resposta individual à exposição (64). As células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal da população celular, contudo, esse fenômeno pode condicionar uma maior instabilidade genômica favorecendo então os processos iniciais da carcinogênese (64).

Estudos moleculares revelam mutações genéticas capazes de promover a ativação de vias de sobrevivência celular. Diversos tumores expressam genes cujos produtos podem interferir nas cascatas regulatórias que controlam o crescimento, diferenciação e sobrevivência de precursores de células sanguíneas normais, facilitando a transformação e manutenção do fenótipo maligno. Além disso, a expressão ou ativação de genes específicos tem sido reconhecida como o mecanismo recorrente mais frequente para a patogênese da LLA (65).

Evidências sugerem ainda que a inflamação é um fator importante na progressão do câncer, incluindo iniciação, crescimento, evasão e metástase, contribuindo para uma maior instabilidade genética e angiogênese. Além disso, pode suprir o microambiente tumoral com moléculas bioativas, alterar as taxas de renovação de células estromais e polarizar as capacidades imunossupressoras das células imunes, proporcionando um microambiente suscetível à transformação maligna (66).

## **2.10 RESPOSTA IMUNE DA LEUCEMIA**

O sistema imunológico consiste em uma rede complexa de células e moléculas responsáveis pelo reconhecimento de determinadas estruturas moleculares e pelo desenvolvimento de uma resposta efetora, induzindo a destruição e inativação de microrganismos e/ou danos. A desregulação desse sistema, ou um déficit na resposta antimicrobiana ‘natural’ resultam em uma rede imunológica não modulada, contribuindo para o desenvolvimento e/ou agravamento de doenças não infecciosas, como a leucemia (67).

O primeiro mecanismo de defesa do hospedeiro humano é a imunidade inata, caracterizada pela ação de receptores específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos relacionados. Os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) são

capazes de reconhecer diversos tipos de microrganismos a partir de seus padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Esses receptores estão presentes na membrana plasmática e no citoplasma e são responsáveis por promover ações pró-inflamatórias e antimicrobianas (68).

Desta forma, o sistema imune pode contribuir para o desenvolvimento tumoral, uma vez que diversos tipos de câncer estão associados aos efeitos carcinogênicos dos estados inflamatórios induzidos por infecções (68). Além disso, os mecanismos moleculares e bioquímicos presentes durante uma resposta a infecção podem resultar em uma potente resposta inflamatória, promovendo a liberação de citocinas capazes de suprimir a hematopoiese e/ou induzir a apoptose, concedendo maiores vantagens para a sobrevivência e/ou proliferação de clones pré-leucêmicos (69).

## 2.11 IMUNORREGULAÇÃO

A letalidade dos tumores malignos se dá em decorrência do crescimento acelerado e do comprometimento funcional dos tecidos normais. O fenótipo neoplásico é resultado de uma falha na regulação da proliferação celular, combinada com a resistência à apoptose e a habilidade de promover metástase. Um fator importante para o desenvolvimento da LLA é o comprometimento da vigilância imunológica, caracterizada pela capacidade do sistema imune em reconhecer e destruir células transformadas em tumores (69,70).

Os *checkpoints* imunológicos desempenham funções fundamentais na regulação da homeostase imunológica, regulando os sinais de estimulação e inibição que medeiam a resposta imune de células T. Em condições fisiológicas normais, esses *checkpoints* imunes regulam a auto tolerância protegendo os tecidos contra danos e restringindo as respostas do sistema imunológico às infecções patogênicas (71). O equilíbrio dessa resposta é regulado pela ação de diversas moléculas inibitórias, porém, algumas células cancerosas conseguem “driblar” essa vigilância através de mecanismos de escape (70).

Em contraste com os tumores sólidos, as células leucêmicas expressam vários receptores de *checkpoint*, além disso, há uma expressão frequente de ligantes PD-L1 e PD-L2 em várias células hematopoiéticas. Dessa forma, o bloqueio do *checkpoint* imunológico pode influenciar na ocorrência de neoplasias hematológicas devido à alta

carga tumoral e maior proliferação celular na leucemia aguda, visto que o tumor compromete a resposta imune do hospedeiro (71).

Outro fator importante para o desenvolvimento da LLA é a remodelação do microambiente hematopoiético por células malignas e o recrutamento de mediadores para apoiar a leucemogênese, sobrevivência celular e quimiorresistência (64). Dentre os mediadores imunológicos, diversas quimiocinas e citocinas desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão do câncer (64). As quimiocinas regulam a infiltração de diferentes subconjuntos de células imunes em tumores, de tal modo que essas moléculas afetam a imunidade tumoral e influenciam os resultados terapêuticos dos pacientes, podendo afetar a regulação da angiogênese tumoral (72). Além disso, a superexpressão do receptor de quimiocinas CXCR4 em células leucêmicas está associada ao envolvimento de órgãos extramedulares e pior evolução dos pacientes (73).

As citocinas são responsáveis por mediar as principais interações entre células imunes e não imunes no microambiente tumoral. Além disso, induzem diretamente a sinalização de células não imunes e sustentam a homeostase tecidual. Contudo, após um evento oncogênico, essa sinalização pode se tornar um mecanismo patológico de crescimento tumoral, disseminação metastática e progressão do câncer (74). Estudos em modelos murinos, apontaram que a ausência de IFN- $\gamma$  resulta em maior número de células iniciadoras de leucemia no início da vida (75).

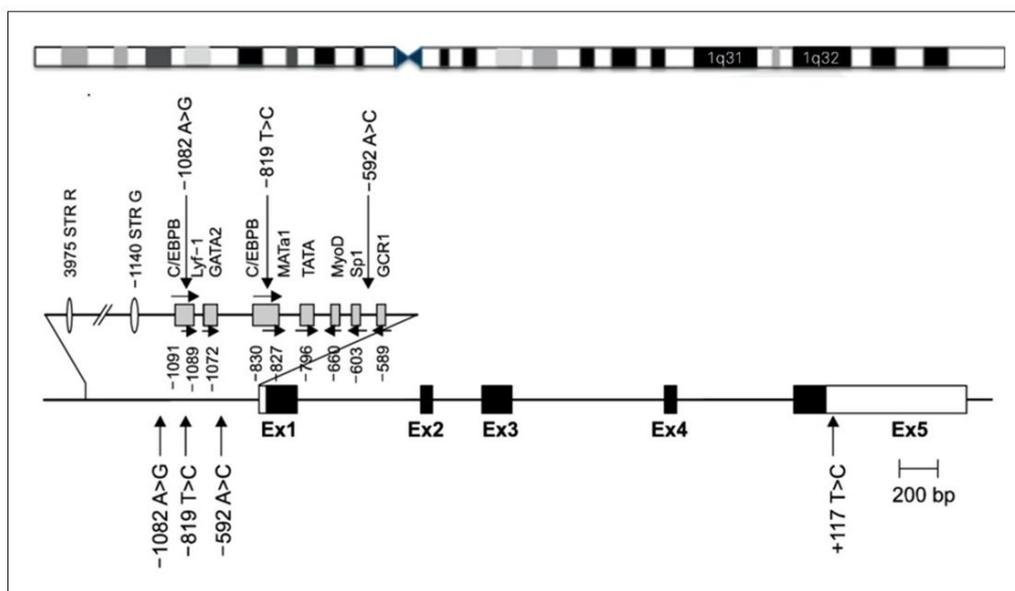
Outros achados demonstram que o quantitativo elevado de células T regulatórias (Treg) estão associadas a um estado imunossupressor e progressão tumoral em pacientes pediátricos com LLA (76,77). Além disso, Salem et al. relataram também que o número dessas células reduziram gradualmente após o início da terapia de indução (78). Nesse contexto, pesquisas recentes têm focado no papel dessa célula no desenvolvimento e progressão do câncer, uma vez que produz a Interleucina-10, responsável pela regulação e controle do processo inflamatório. Além disso, concentrações elevadas de IL-10 no momento do diagnóstico do câncer indicaram uma diminuição da resposta citotóxica específica, promovendo quimiorresistência e resistência à apoptose, favorecendo a sobrevivência de clones leucêmicos (79–82).

## 2.12 INTERLEUCINA-10

As interleucinas atuam como substâncias vitais, modulando a imunidade e desempenhando funções de diferenciação, regulação e proliferação celular. A interleucina-10 (IL-10) é uma importante molécula reguladora produzida por diversas células imunes, incluindo células dendríticas, neutrófilos, monócitos, *natural killers* (NK) e diferentes subconjuntos de células T e B (14). É um membro da família de citocinas heterodiméricas, composta por dois monômeros ligados de forma não covalente e atua como um regulador de *feedback* negativo, uma vez que o mecanismo de ação dessa citocina se dá por meio de um complexo receptor transmembrana capaz de regular funções imunes, como por exemplo, a redução da produção de mediadores inflamatórios e a inibição da apresentação de antígenos por monócitos e células dendríticas (68,83).

A IL-10 inibe a produção de interleucina-12 (IL-12), citocina responsável por induzir a secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), suprimindo importantes reações imunes inatas e adaptativas mediadas por células contra microrganismos intracelulares. Além disso, a IL-10 também pode inibir a expressão de coestimuladores e moléculas de HLA-II em células dendríticas e monócitos, inibindo então a ativação de células T e limitando as respostas imunes mediadas por células (68).

A expressão de IL-10 é cuidadosamente regulada a fim de evitar malignidades relacionadas ao seu excesso ou deficiência. Mecanismos regulatórios como a ativação de vias de sinalização específicas, expressão de fatores de transcrição e regulação pós-transcricional garantem a produção equilibrada de IL-10 (84). O gene *IL10* está localizado no cromossomo humano 1q32.1, apresentando 4,8 quilobases (kb) de tamanho e contém 5 éxons (Figura 6). A transcrição de *IL10* é regulada por diversas proteínas que possuem afinidade a diferentes sítios de ligação existentes no promotor do gene, como NF-kB, fatores de regulação de interferon (IRF), proteína ativadora (AP), fator de especificidade (Sp), proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclico (CREB), proteína de ligação ao elemento/acentuador CCATT (C/EBP) e fator fibrossarcoma c-musculo-aponeurótico (c-MAF) (22).

**Figura 6.** Mapa do gene *IL10* no cromossomo 1q32.1

**Fonte:** Adaptado de Farmasi et al. 2017

Devido ao seu papel imunossupressor, estudos sugerem que concentrações elevadas de IL-10 estão associados ao câncer, uma vez que a sua expressão exacerbada pode conceder maiores vantagens para a evasão imunológica do tumor (84). Um estudo realizado em modelo animal demonstrou que a expressão elevada de IL-10 resultou em uma falha no controle de tumor (85). Além disso, a presença de IL-10 foi relacionada ao mau prognóstico em pacientes com diferentes tipos de câncer (86).

Contraditoriamente, um estudo realizado por Chang et al. sugere que crianças que possuem uma resposta imunológica anormal devido a reduções nas concentrações de IL-10 ao nascer são mais propensas a desenvolver malignidades como LLA. Neste estudo, as crianças com diagnósticos confirmados de leucemia tiveram significativamente mais episódios infecciosos. Considerando que IL-10 é um regulador essencial para modular a intensidade e duração de respostas imunológicas às infecções, sua redução pode conferir maiores vantagens de crescimento para um clone pré-leucêmico (26).

### 2.13 O PAPEL DA IL-10 NA LEUCEMIA

As citocinas e seus genes influenciam na incidência e prognóstico de diversas doenças malignas, infecciosas e autoimunes (87). A IL-10 desempenha um papel importante na imunidade tumoral e diversos estudos têm focado na influência da IL-10

no contexto da leucemia (88). Concentrações elevadas de IL-10 foram correlacionadas com doença agressiva em pacientes com leucemia linfocítica crônica, uma vez que pacientes com concentrações plasmáticas elevadas de IL-10 demonstraram ter pior sobrevida em 3 anos quando comparados àqueles com concentrações mais baixas (89).

Pacientes com LLC desenvolvem progressivamente um estado imunossupressor devido às concentrações elevadas de interleucina-10 (90). Outros estudos demonstram que há uma superexpressão do receptor de IL-10 na maioria das células na leucemia mieloide aguda, o que desempenha um papel importante na promoção de *stemness* de células leucêmicas (91). Além disso, em um estudo de Zhang et al. (2021), concentrações séricas de IL-10 foram usadas com indicadores para prever a progressão clínica da doença em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (92).

A patogênese da LLA pediátrica pode estar associada a quebras de DNA visto que a deficiência de interleucina-10 prejudica a linfopoese e aumenta o dano ao DNA de células B em associação com outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 e IL-12. Crianças que produzem baixas concentrações de IL-10 ao nascer apresentam um risco 25 vezes maior de desenvolver LLA. Além disso, um estudo realizado com um modelo de camundongo IL10<sup>-/-</sup> pré-leucêmico demonstrou que concentrações baixas de IL-10 resultaram na aceleração do desenvolvimento de malignidades linfoides com o aumento da frequência de mutações (C>G>C>T) (93).

#### **2.14 SINGLE-NUCLEOTIDE VARIANTS DE IL-10**

Estudos de sequenciamento genômico revelam uma mistura complexa e heterogênea de mutações associadas ao câncer. *Single-Nucleotide Variant* (SNV) é uma variação de um único nucleotídeo na sequência de DNA, sendo uma das principais causas para o aumento da suscetibilidade a várias doenças e podendo ocasionar consequências funcionais importantes na tumorigênese (94). Diversos estudos associam a ocorrência da LLA a SNVs de vários genes, dentre eles o *TPA*, *TPMT*, *NUDT15*, *IL6* e *IL10* (95).

No contexto neoplásico, estudos recentes têm focado no papel de SNVs do gene *IL10* com muitos tipos de câncer e outras doenças (Tabela 3), uma vez que SNVs nas regiões reguladoras e codificadoras de genes podem alterar o nível de expressão, função dos genes ou dos produtos codificados. Desta forma, os SNVs no gene *IL10* estão associados com o aumento ou diminuição do risco de desenvolvimento da leucemia (88).

Além disso, em termos de sobrevida, pacientes com LLA com o genótipo *IL10* AA (*rs1800896*) apresentaram menor sobrevida quando comparados com o genótipo *IL10* GG (*rs1800896*) que apresenta uma maior sobrevida (88,96).

Do ponto de vista molecular, SNVs nos genes *IL10* podem determinar diferenças na produção da IL-10 no que diz respeito à sua sinalização a jusante e comportamentos celulares, contribuindo para maiores suscetibilidades individuais de LLA em crianças e adultos (27). Em um estudo clínico realizado por Hafiz et al. observou-se a partir da análise genotípica que a região promotora do gene *IL10* -1082 teve maior frequência do alelo heterozigoto (*G>A*) em pacientes com LLA quando comparada com o alelo homozigoto (*A>A*) e (*G>G*) (97). Além disso, pesquisadores de Taiwan concluíram que os genótipos de *IL10* T819C e A592C são considerados biomarcadores para o diagnóstico de LLA (14).

**Tabela 3.** Variantes de *IL10* em estudo associadas a doenças em humanos.

Variante	Achados	Ref.
<i>IL10</i> - A>G <i>rs1800896</i>	Suscetibilidade a câncer gástrico, de mama e linfoma não-hodgkin.	(88,98–100)
<i>IL10</i> - T>C <i>rs1800871</i>	Suscetibilidade aos lúpus eritematoso sistêmico, linfoma não-hodgkin e adenoma hipofisário.	(101–103)
<i>IL10</i> - G>T <i>rs3021094</i>	Risco de morte e menor sobrevida global de pacientes com câncer colorretal e maior suscetibilidade a osteoporose.	(104,105)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a influência de *Single-Nucleotide Variant* (SNVs) no gene *IL10* (*rs1800871*, *rs1800896* e *rs3021094*) no prognóstico clínico de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda (LLA);

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever o perfil clínico-hematológico dos pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda;
- Estimar a frequência de *Single-Nucleotide Variant* (SNVs) no gene *IL10* (*rs1800871*, *rs1808796* e *rs3021094*) em pacientes com LLA;

- Realizar a quantificação das concentrações de IL-10 na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LLA ao D0;
- Investigar a associação de *Single-Nucleotide Variant (SNVs)* no gene *IL10* (*rs1800871*, *rs1808796* e *rs3021094*) com recaída, comorbidades e óbito.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado “*Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica*” coordenado pelo Dr. Allyson Guimarães da Costa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) sob o seguinte número do parecer: 4.982.395 e data de parecer: 17/09/2021 (Anexo 01).

### 4.2. MODELO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo caso-controle a fim de avaliar a influência dos polimorfismos nos genes *IL10 A>G (rs1800871)*, *T>C (rs1800896)* e *G>T (rs3021094)* no prognóstico clínico de pacientes com LLA.

### 4.3. POPULAÇÃO DE ESTUDO

O grupo caso foi composto por amostras de DNA e Plasma (derivadas de medula óssea e sangue periférico) de 102 pacientes diagnosticados com LLA de acordo com os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), provenientes do Biorrepositório de Células e Moléculas de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda (BCM-LLA) da Fundação HEMOAM coletadas no período de 2010 a 2023 (106).

O grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis, consistindo em 177 amostras retrospectivas do BCM-LLA de candidatos à doação de sangue de ambos os sexos, coletados no período de janeiro a dezembro de 2015 e concordaram em participar da pesquisa.

#### **4.4. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE**

Os critérios de inclusão utilizados para o grupo caso, foram: pacientes com LLA, admitidos no serviço de Hematologia Pediátrica da Fundação HEMOAM, <18 anos, de ambos os gêneros, sem recusa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e sem recusa do termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE). Para o grupo controle foram definidos como critérios de inclusão: idade superior a 18 anos, sem alterações no hemograma, sem recusa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e sem recusa do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido. Como critérios de exclusão, para ambos os grupos, foram utilizados os parâmetros: material biológico insuficiente, coagulado ou com baixa concentração de DNA (<5 ng/μL).

#### **4.5. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS**

Para a realização do estudo, foram utilizadas amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP), de pacientes com LLA obtidas através de punção aspirativa da medula óssea e através de punção venosa, respectivamente (procedimentos de rotina para estes pacientes). As coletas ocorreram no 'D0' da terapia de indução da remissão (dia do diagnóstico). Foram coletados cerca de 2mL a 4mL de MO e 5mL de SP em tubos com sistema a vácuo contendo anticoagulante EDTA pela equipe médica da Fundação HEMOAM. As amostras do grupo controle foram obtidas através de punção venosa durante a doação de sangue.

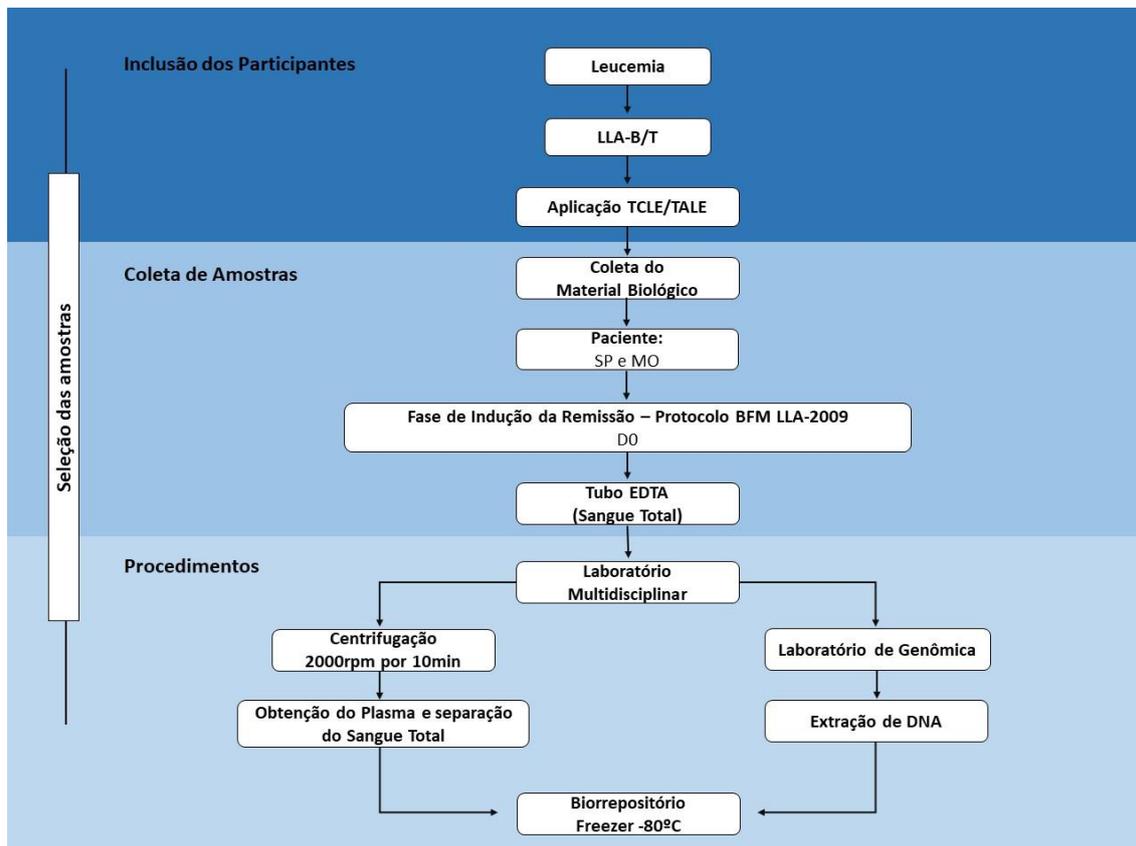
As amostras foram centrifugadas a 2000rpm por 10min. Em seguida, o Plasma Pobre em Plaquetas (PPP) foi coletado e transferido para criotubos de 2mL identificados com o código do projeto maior e armazenados em freezer -80°C. Posteriormente o concentrado celular foi ressuspendido em solução fisiológica e encaminhado ao laboratório de genômica para a realização da extração do material genético, em seguida, as amostras de DNA foram transferidas para tubos identificados com o código do projeto maior e armazenadas no biorrepositório, em freezer -80°C (Figura 7).

#### **4.6. COLETA DE DADOS**

Os dados foram coletados através de prontuários da Fundação HEMOAM oriundos do Setor de Atendimento Médico e Estatístico (SAME), sistema *iDoctor* e setor

de estatística, sendo eles: dados sociodemográficos (idade, gênero, raça, procedência), laboratoriais (hemograma e imunofenótipo) e clínicos (recaída, comorbidades e óbito).

**Figura 7.** Fluxograma das etapas de obtenção e processamento de amostras utilizadas no estudo.

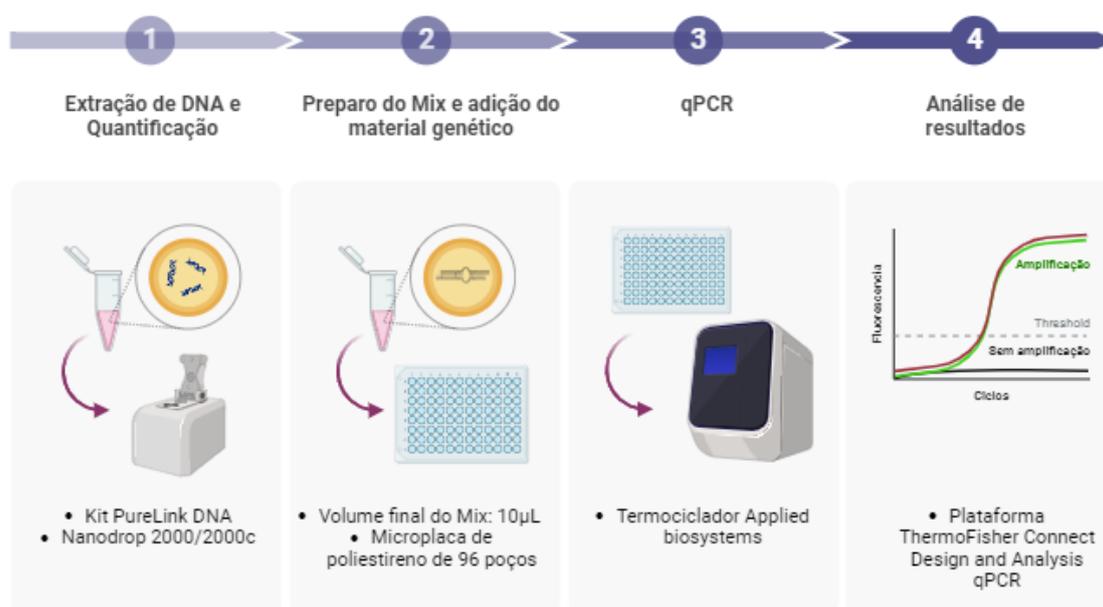


#### 4.7. GENOTIPAGEM

A genotipagem de variantes de *IL10 A/G (rs1800871)*, *T/C (rs1800896)* e *G/T (rs3021094)* ocorreu através da técnica de *Real-Time Quantitative PCR (qPCR)* em equipamento *StepOnePlus Real-Time PCR System* utilizando sondas fluorescentes de hidrólise TaqMan alelo-específicas que permitem a discriminação dos *SNVs* estudados (Figura 8). As reações de *qPCR* foram realizadas em microplacas de poliestireno com 96 poços contendo em cada poço 1,75µL de H<sub>2</sub>O MiliQ, 5,0µL de Master Mix e 0,25 µL de ensaio TaqMan® contendo 36µM de primer e 8µM de sonda e 3µL (100 ng/µL) de DNA genômico com volume final de 10µL. A amplificação das sequências de interesse e para discriminação alélica sob a seguinte condição: 60°C por 30 segundos, 95°C por 10

minutos, 40 ciclos à 92°C por 15 segundos, 40 ciclos à 60°C por 90 segundos e 60°C por 30 segundos. Para cada reação foi incluído um controle negativo contendo todos os reagentes descritos anteriormente, com exceção do DNA, a fim de garantir ausência de contaminação. A interpretação dos resultados foi realizada com o *ThermoFisher Connect Design and Analysis qPCR*, a partir da curva de amplificação gerada, foi permitido a identificação dos genótipos. Os genótipos foram classificados em homozigoto para o alelo normal, homozigoto para o alelo polimórfico ou heterozigoto.

**Figura 8.** Etapas da genotipagem de amostras.



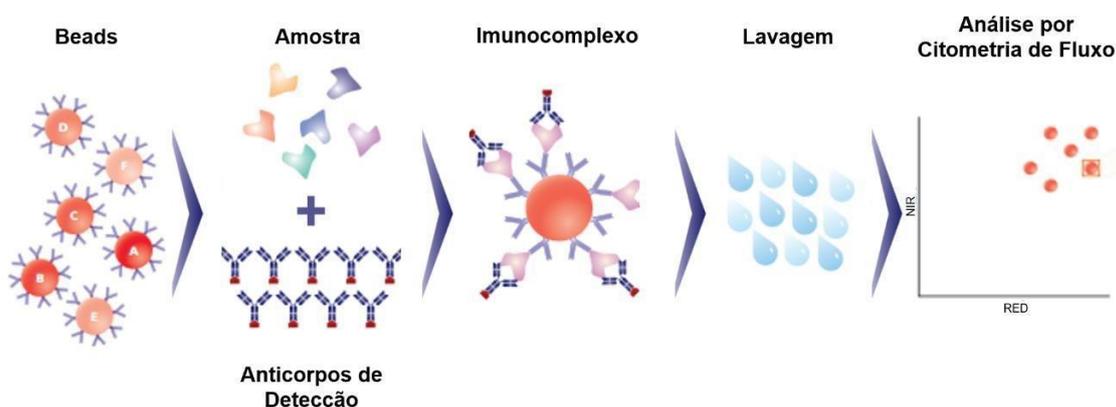
#### 4.8. QUANTIFICAÇÃO DE IL-10

A concentração sérica de IL-10, foi determinada utilizando o ensaio com microesferas por citometria de fluxo (*Cytometric Bead Array - CBA*). Esta técnica possibilita a quantificação de moléculas solúveis através do uso de microesferas sintéticas recobertas por anticorpos específicos para a captura das moléculas escolhidas. Adiciona-se a amostra do paciente e anticorpos de detecção, marcados com fluorocromo ficoeritrina (PE). As citocinas ligam-se aos anticorpos de captura presente nas microesferas correspondentes, e essa interação é então detectada pelo anticorpo marcado, formando um imunocomplexo. Realizam-se etapas de lavagem para a retirada de componentes

diversos que não se ligaram, e a sua posterior análise é feita através do Citômetro de Fluxo (Figura 9).

Foram utilizados os kits *BD™ Human Chemokine (Code N° 552990, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA)*, e *BD™ Human Th1, Th2, Th17 Cytokine (Code n° 560484, BDR Biosciences, San Diego, CA, USA)*, seguindo orientações descritas pelo fabricante. Para a aquisição das amostras, foi usado o Citômetro de Fluxo FACS Canto II (*BD® Biosciences, San Jose, CA, EUA*) fornecido pela Fundação HEMOAM, em conjunto com o software *FCAP-Array™ (v3.01)* para calcular as concentrações da citocina (pg/mL).

**Figura 9.** Etapas da quantificação de moléculas por *Cytometric Bead Array (CBA)*.



#### 4.9. ANÁLISE DE DADOS

O equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW) foi determinado pela comparação das frequências observadas e esperadas dos genótipos e alelos estudados através do site <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>. A análise estatística dos dados obtidos na genotipagem foi realizada utilizando o software *R* versão 4.3.2, pacote *SNPassoc*. A comparação entre os grupos foi realizada com teste exato de *Fisher*, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Um modelo de análise de regressão logística uni e multivariada foi utilizado para investigar a associação dos genótipos com recaída, comorbidades e óbito. Para os modelos multivariados, as covariáveis incluídas foram idade no momento do diagnóstico, sexo e raça. Além disso, O software *GraphPad Prism* v.8 (San Diego, CA, EUA), foi utilizado para análises comparativas de citocinas

circulantes entre os genótipos dos *SNVs* estudados. O teste aplicado, para esta última análise, foi o *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste *Dunn's*. Para todas as análises, diferenças significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ .

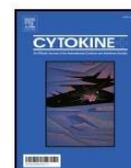
## **5. RESULTADOS**

### **5.1. CAPÍTULO I – PUBLICAÇÃO DE ARTIGO DE REVISÃO**

**Título:** A dual-role for Il-10: from leukemogenesis to the tumor progression in Acute Lymphoblastic Leukemia

**Revista:** Citokine, 171: 156371 (Fator de Impacto: 3.926).

**DOI:** 10.1016/j.cyto.2023.156371



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

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

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil

<sup>b</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou - Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil

<sup>e</sup> Escola de Enfermagem de Manaus, UFAM, Manaus, Brazil

### 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- $\beta$ , 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 $\beta$ , Interleukin-1 beta; IL-1 $\alpha$ , 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](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com), [allyson@ufam.edu.br](mailto:allyson@ufam.edu.br) (A.G. Costa).

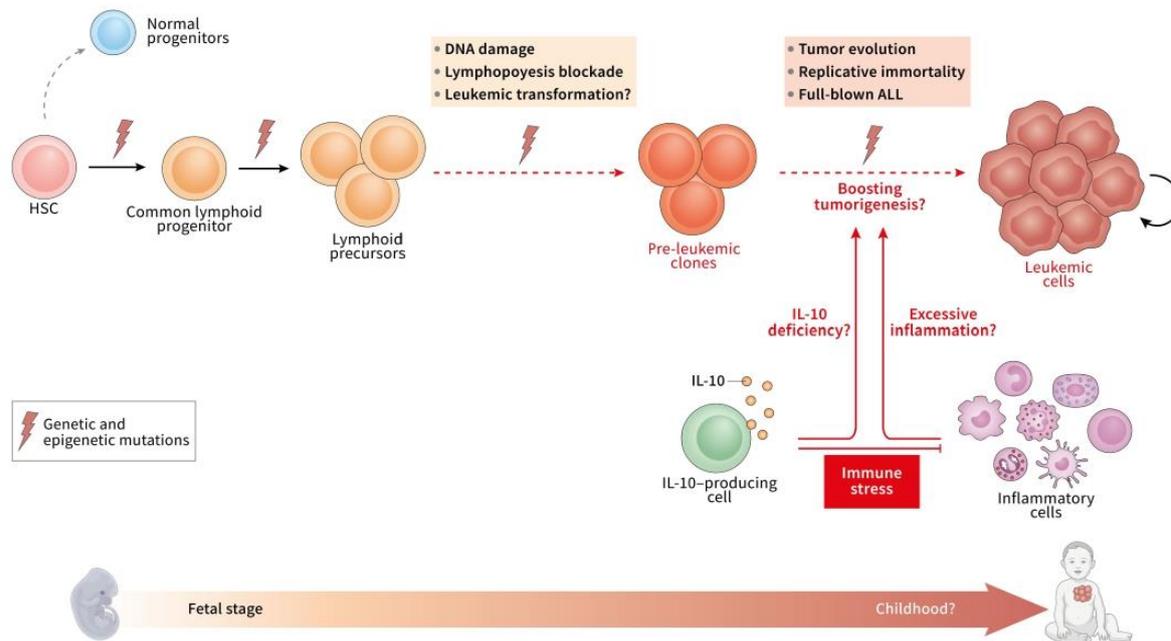
<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

<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.



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

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

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

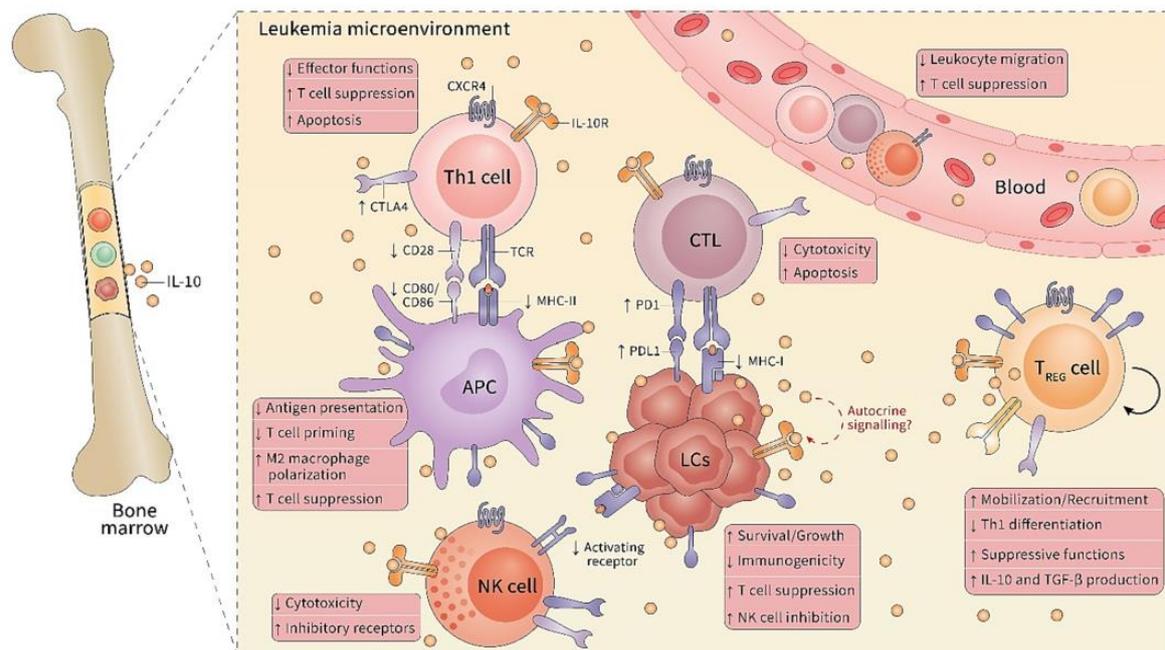
## 2. Biology of interleukin-10

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

microenvironment [23,24].

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

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



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

### 3. The role of IL-10 in leukemogenesis

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

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

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

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

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

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

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

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

#### 4. The role of IL-10 in leukemia

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

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

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

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

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

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

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

#### 5. IL-10 and its clinical applications

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

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

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

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

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

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

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

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

## 6. Conclusions and perspectives

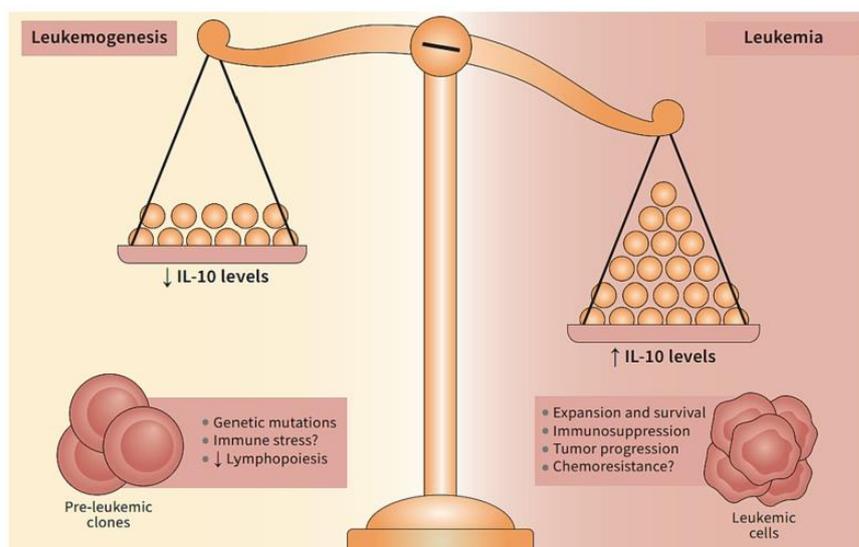
To our knowledge, few works have investigated the dual role of IL-10 in ALL and its impact on the evolution of the disease and, especially, on its development from the first stimulus. Patients who develop ALL have a deficit in the production of IL-10 at birth, with increased levels of this molecule on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

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

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

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

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



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

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

#### Author contributions

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

#### Funding

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

#### Declaration of Competing Interest

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

#### Data availability

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

#### Acknowledgments

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

#### References

- Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM, Botteman MF, Pashos CL. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. [Internet]. 2005 Mar; 14(1):53–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2354.2005.00513.x>.
- Pui C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2006 Jan 12;354(2):166–178. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra052603>.
- Imai K. Acute lymphoblastic leukemia: pathophysiology and current therapy. *Rinsho. Ketsueki*. [Internet]. 2017 [cited 2023 Mar 30];58(5):460–470. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28592761/>.
- Raaijmakers MHGP. Niche contributions to oncogenesis: emerging concepts and implications for the hematopoietic system. *Haematologica* [Internet]. 2011 Jul 1; 96(7):1041–1048. Available from: <http://www.haematologica.org/cgi/doi/10.3324/haematol.2010.028035>.
- Berit B, Tysnes RB. Cancer initiation and progression: Involvement of stem cells and the microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* [Internet]. 2007 Jun;1775(2):283–297. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X07000029>.
- Fröbel J, Landspersky T, Percin G, Schreck C, Rahmig S, Ori A, et al. The Hematopoietic Bone Marrow Niche Ecosystem. *Front. Cell Dev. Biol.* [Internet]. 2021 Jul 22;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.705410/full>.
- Look AT. Oncogenic Transcription Factors in the Human Acute Leukemias. *Science (80-)*. [Internet]. 1997 Nov 7;278(5340):1059–1064. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.278.5340.1059>.
- Chang JS, Zhou M, Buefler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL. Profound Deficit of IL10 at Birth in Children Who Develop Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2022 Jun 16];20(8):1736–1740. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21653647/>.
- Jiménez-Morales S, Aranda-Urbe IS, Pérez-Amado CJ, Ramírez-Bello J, Hidalgo-Miranda A. Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front. Immunol.* [Internet]. 2021 Nov 18 [cited 2023 Jan 7];12:4787. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.737340/full>.
- Soegaard SH, Rostgaard K, Skogstrand K, Wiemels JL, Schmiegelow K, Hjalgrim H. Neonatal Inflammatory Markers Are Associated with Childhood B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* [Internet]. 2018 Sep 15 [cited 2023 Mar 30];78(18):5458–5463. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3065595/>.
- K. Bhattacharya, S. Chandra, C. Mandal, Critical stoichiometric ratio of CD4 + CD25 + FoxP3 + regulatory T cells and CD4 + CD25 – responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia, *Immunology* [Internet] 142 (1) (2014 May) 124–139, <https://doi.org/10.1111/imm.12237>.
- F. Magalhães-Gama, M.W.A. Kerr, N.D. de Araújo, H.N.S. Ibiapina, J.C.F. Neves, F.S.A. Hanna, et al., Imbalance of chemokines and cytokines in the bone marrow microenvironment of children with B-cell acute lymphoblastic leukemia, *J. Oncol.* [Internet] 22 (2021) (2021 Jul) 1–9. <https://www.hindawi.com/journals/2021/5530650/>.
- Shuxu Du, Yongrui Jia, Hong Tang, Yangling Sun, Wanshui Wu, Liming Sun JD. Immune regulation of hydrogen sulfide in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chin. Med. J. (Engl)*. [Internet]. 2014;127(21):3695–3699. Available from: <https://mednexus.org/doi/10.3760/cma.j.issn.0366-6999.201313106>.
- Q. Dai, G. Zhang, Y. Wang, L. Ye, R. Shi, L. Peng, et al., Cytokine network imbalance in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia at diagnosis, *Cytokine* 169 (2023 Sep), 156267.
- Liu P, Song J, Su H, Li L, Lu N, Yang R, et al. IL-10 Gene Polymorphisms and Susceptibility to Systemic Lupus Erythematosus: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2013 Jul 23;8(7):e69547. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069547>.
- M. Saraiva, A. O'Garra, The regulation of IL-10 production by immune cells, *Nat. Rev. Immunol.* [Internet] 10 (3) (2010 Mar 15) 170–181. <http://www.nature.com/articles/nri2711>.
- E.A. El-maadawy, M.F. Elshal, R.M. Bakry, M.M. Moussa, S.H. El-Naby, R. M. Talaat, Regulation of CD4+CD25+FOXP3+ cells in pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): Implication of cytokines and miRNAs, *Mol. Immunol.* 1 (124) (2020 Aug) 1–8.
- W. Ouyang, A. O'Garra, IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation, *Immunology* [Internet] 50 (4) (2019 Apr) 871–891. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761319301372>.
- Saraiva M, Saraiva M, Vieira P, Vieira P, Vieira P, O'Garra A, et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 [Internet]. *J. Exp. Med.* 2020 Jan 6 [cited 2023 Mar 18];217(1). Available from: <https://rupress.org/jem/article/217/1/e20190418/132577/Biology-and-therapeutic-potential-of-interleukin>.
- R. Sabat, G. Grütz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk, et al., Biology of interleukin-10, *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet] 21 (5) (2010 Oct) 331–344. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610110000651>.
- Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* [Internet]. 2015 Oct 28 [cited 2023 Mar 18];367(2):103–107. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383515004516>.
- Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 Elicits IFN- $\gamma$  Dependent Tumor Immune Surveillance. *Cancer Cell* [Internet]. 2011 Dec 13 [cited 2023 Mar 18];20(6):781–796. Available from: <http://www.cell.com/article/S1535610811004090/fulltext>.
- Oft M. IL-10: Master Switch from Tumor-Promoting Inflammation to Antitumor Immunity. *Cancer Immunol. Res.* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2023 Mar 18];2(3):194–199. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerimmunolres/article/2/3/194/467083/IL-10-Master-Switch-from-Tumor-Promoting>.
- RALLIS KS, CORRIGAN AE, DADAH H, GEORGE AM, KESHWARA SM, SIDERIS M, et al. Cytokine-based Cancer Immunotherapy: Challenges and Opportunities for IL-10. *Anticancer Res.* [Internet]. 2021 Jul;41(7):3247–3252. Available from: <http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticancer.15110>.

- [25] R. Sabat, IL-10 family of cytokines, *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet] 21 (5) (2010 Oct) 315–324. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610110000791>.
- [26] Lo WJ, Chang WS, Hsu HF, Ji HX, Hsiao CL, Tsai CW, et al. Significant Association of Interleukin-10 Polymorphisms with Childhood Leukemia Susceptibility in Taiwan. *In Vivo.* 2016;30(3):265–269.
- [27] C.H. Hiroki, M.K. Amarante, D.L. Petenuci, A.Y. Sakaguchi, F.C. Trigo, M.A. E. Watanabe, et al., IL-10 gene polymorphism and influence of chemotherapy on cytokine plasma levels in childhood acute lymphoblastic leukemia patients IL-10 polymorphism and plasma levels in leukemia patients, *Blood Cells Mol. Dis.* 55 (2) (2015 Aug 1) 168–172.
- [28] R.-T. Liu, X.-X. Wang, J.-R. Sun, N. Gao, W.-Z. Yu, Correlations of IL-6 and IL-10 gene polymorphisms with childhood acute lymphoblastic leukemia, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* [Internet] 24 (15) (2020 Aug) 8048–8056. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32767331>.
- [29] Abdalhabib EK, Alzahrani B, Saboor M, Hamza A, Elfaki EM, Alanazi F, et al. IL-10 rs1800896 Polymorphism: A Risk Factor for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmacogenomics Pers. Med.* [Internet]. 2022 Sep;Volume 15:809–815. Available from: <https://www.dovepress.com/il-10-rs1800896-polymorphism-a-risk-factor-for-adult-acute-lymphoblast-peer-reviewed-fulltext-article-PGPM>.
- [30] Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2023 Mar 29];16 (8):1437–1442. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12145682/>.
- [31] Bernard O. Mécanismes de la leucéogénèse. *Bull. Cancer* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2023 Mar 29];97(11):1381–1388. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000745511530758X>.
- [32] Nemkov T, D'Alessandro A, Reisz JA. Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment [Internet]. *Cancer Rep.* 2019 Apr 7;2(2):e1139. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cnr.21139>.
- [33] C. Tomasetti, L. Li, B. Vogelstein, Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention, *Science* (80-) [Internet] 355 (6331) (2017 Mar 24) 1330–1334. <https://doi.org/10.1126/science.aaf9011>.
- [34] Dander E, Palmi C, D'Amico G, Cazzaniga G. The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2023 Jun 5];22(9). Available from: <https://pmc/articles/PMC8122951/>.
- [35] Duarte D, Hawkins ED, Lo Celso C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood* [Internet]. 2018 Apr 5 [cited 2023 Jun 5];131 (14):1507–1511. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/131/14/1507/36671/The-interplay-of-leukemia-cells-and-the-bone>.
- [36] M.T. Witkowski, I. Dolgalev, N.A. Evensen, C. Ma, T. Chambers, K.G. Roberts, et al., Extensive remodeling of the immune microenvironment in B cell acute lymphoblastic leukemia, *Cancer Cell* [Internet] 37 (6) (2020 Jun) 867–882.e12. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610820302142>.
- [37] H. Cheng, G. Sun, T. Cheng, Hematopoiesis and microenvironment in hematological malignancies. *Cell Regen.* [Internet] 7 (1) (2018 Sep) 22–26. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2045976918300099>.
- [38] Kim JA, Shim JS, Lee GY, Yim HW, Kim TM, Kim M, et al. Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res.* [Internet]. 2015 Jun 1 [cited 2023 Jun 5];75(11):2222–2231. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/75/11/2222/603942/Microenvironmental-Remodeling-as-a-Parameter-and>.
- [39] M. Greaves, A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia, *Nat. Rev. Cancer* [Internet] 18 (8) (2018 Aug 21) 471–484. <http://www.nature.com/articles/s41568-018-0015-6>.
- [40] Lee JW, Cho B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Korean J. Pediatr.* [Internet]. 2017;60(5):129. Available from: <http://www.e-cep.org/journal/view.php?doi=10.3345/kjp.2017.60.5.129>.
- [41] Höpken UE, Rehm A. Targeting the Tumor Microenvironment of Leukemia and Lymphoma. *Trends in Cancer* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2020 Jun 27];5(6): 351–364. Available from: <http://www.cell.com/article/S2405803319300755/fulltext>.
- [42] K.W. Moore, M.R. de Waal, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor, *Annu. Rev. Immunol.* [Internet] 19 (1) (2001 Apr) 683–765. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>.
- [43] B.A. Fitch, M. Zhou, J. Situ, S. Surianarayanan, M.Q. Reeves, M.L. Hermiston, et al., Decreased IL-10 accelerates B-cell leukemia/lymphoma in a mouse model of pediatric lymphoid leukemia, *Blood Adv.* 6 (3) (2022) 854–865.
- [44] L. Zhu, T. Shi, C. Zhong, Y. Wang, M. Chang, X. Liu, IL-10 and IL-10 receptor mutations in very early onset inflammatory bowel disease, *Gastroenterol. Res.* [Internet] 10 (2) (2017) 65–69. <http://www.gastrores.org/index.php/Gastrores/article/view/740>.
- [45] N. Chen, Y. Xu, J. Mou, Q. Rao, H. Xing, Z. Tian, et al., Targeting of IL-10R on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells, *Blood Cancer J.* 11 (8) (2021 Aug) 1–11.
- [46] WU H, LI P, SHAO N, MA J, JI M, SUN X, et al. Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF- $\beta$  in acute myeloid leukemia. *Oncol. Lett.* [Internet]. 2012 May 1 [cited 2023 Mar 18];3(5):1119–1123. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.614/abstract>.
- [47] B. Sanchez-Correa, J.M. Bergua, C. Campos, I. Gayoso, M.J. Arcos, H. Bañas, et al., Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: Survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels, *Cytokine* [Internet] 61 (3) (2013 Mar) 885–891. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043466613000021>.
- [48] Sun Y xin, Kong H li, Liu C fang, Yu S, Tian T, Ma D xin, et al. The imbalanced profile and clinical significance of T helper associated cytokines in bone marrow microenvironment of the patients with acute myeloid leukemia. *Hum. Immunol.* [Internet]. 2014 Feb [cited 2023 Mar 18];75(2):113–118. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24269703/>.
- [49] Kitabayashi A, Hirokawa M, Miura AB. The role of interleukin-10 (IL-10) in chronic B-lymphocytic leukemia: IL-10 prevents leukemic cells from apoptotic cell death. *Int. J. Hematol.* [Internet]. 1995 [cited 2023 Mar 18];62(2):99–106. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8590779/>.
- [50] Alhakeem SS, McKenna MK, Gachuki BW, Rangnekar VR, Byrd JC, Muthusamy N, et al. The role of IL-10 in B-cell chronic lymphocytic leukemia cell survival. *J. Immunol.* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2021 Dec 9];196(1\_Supplement):211.17–211.17. Available from: [https://journals.aai.org/jimmunol/article/196/1\\_Supplement/211.17/57937/The-role-of-IL-10-in-B-cell-chronic-lymphocytic](https://journals.aai.org/jimmunol/article/196/1_Supplement/211.17/57937/The-role-of-IL-10-in-B-cell-chronic-lymphocytic).
- [51] Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic Lymphocytic Leukemia-Derived IL-10 Suppresses Antitumor Immunity. *J. Immunol.* [Internet]. 2018 Jun 15 [cited 2023 Mar 18];200(12):4180–4189. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30655426/>.
- [52] Rivas JR, Liu Y, Alhakeem SS, Eckenrode JM, Marti F, Collard JP, et al. Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021 Nov 17 [cited 2023 Mar 18];35(11):3188–3200. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01217-1>.
- [53] DiLillo DJ, Weinberg JB, Yoshizaki A, Horikawa M, Bryant JM, Iwata Y, et al. Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia* [Internet]. 2013 Jan 13 [cited 2022 Dec 13];27(1):170–182. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012165>.
- [54] Fluckiger AC, Garrone P, Durand I, Galizzi JP, Banchereau J. Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *J. Exp. Med.* [Internet]. 1993 Nov 1 [cited 2023 Mar 18];178(5): 1473–1481. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/178/5/1473/1104278/1473.pdf>.
- [55] Binder S, Luciano M, Horejs-Hoek J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev.* [Internet]. 2018 Oct 4:8–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610118300984>.
- [56] Xu Y, Mou J, Wang Y, Zhou W, Rao Q, Xing H, et al. Regulatory T cells promote the stemness of leukemia stem cells through IL10 cytokine-related signaling pathway. *Leukemia* [Internet]. 2022 Feb 11 [cited 2023 Mar 18];36(2):403–415. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34381181/>.
- [57] Larmonier N, Marron M, Zeng Y, Cantrell J, Romanoski A, Sepassi M, et al. Tumor-derived CD4+CD25+ regulatory T cell suppression of dendritic cell function involves TGF- $\beta$  and IL-10. *Cancer Immunol. Immunother.* [Internet]. 2006 Nov 6 [cited 2023 Mar 18];56(11):48–59. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00262-006-0160-8>.
- [58] Toniolo PA, Liu S, Yeh JE, Ye DQ, Barbuti JAM, Frank DA. Deregulation of SOCS5 suppresses dendritic cell function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Jul 19 [cited 2023 Mar 18];7(29):46301–46314. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27317770/>.
- [59] Roessner PM, Llaó Cid L, Lupar E, Roeder T, Bordas M, Schifflers C, et al. EOMES and IL-10 regulate antitumor activity of T regulatory type 1 CD4+ T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2023 Mar 18];35(8):2311–2324. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34324479/>.
- [60] Westermann F, Kube D, Haier B, Bohlen H, Engert A, Zuehlendorf M, et al. Interleukin 10 inhibits cytokine production of human AML cells. *Ann. Oncol.* [Internet]. 1996 Apr 1 [cited 2023 Mar 18];7(4):397–404. Available from: <http://www.annalsofoncology.org/article/S0923753419605909/fulltext>.
- [61] Rutz S, Ouyang W. Regulation of interleukin-10 expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* [Internet]. 2016 Nov;941(II):89–116. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27475283>.
- [62] O. Bruserud, IL-4, IL-10 and IL-13 in acute myelogenous leukemia, *Cytokines, Cell. Mol. Ther.* [Internet] 4 (3) (1998 Sep) 187–198. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825844>.
- [63] Fluckiger AC, Durand I, Banchereau J. Interleukin 10 induces apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *J. Exp. Med.* [Internet]. 1994 Jan 1 [cited 2023 Mar 18];179(1):91–99. Available from: <http://rupress.org/jem/article-pdf/179/1/91/1395598/91.pdf>.
- [64] Tao M, Li B, Nayini J, Sivaraman S, Song S, Larson A, et al. In Vivo Effects of IL-4, IL-10, and Amifostine on Cytokine Production in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Leuk. Lymphoma* [Internet]. 2001 Jan [cited 2023 Mar 18];41(1–2):161–168. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428190109057966>.
- [65] Asano Y, Shibata S, Kobayashi S, Okamura S, Niho Y. Interleukin-10 inhibits the autocrine growth of leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* [Internet]. 1997 Dec 1 [cited 2023 Mar 18];66(4): 445–450. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9479871>.
- [66] Mahmood EF, Ahmed AA. Evaluation of interleukin-35 and interleukin-10 in adult acute myeloid leukemia patients before and after induction chemotherapy. *Iraqi J. Hematol.* [Internet]. 2020 [cited 2022 Jun 27];9(2):82. Available from: <https://www.ijhonline.org/article.asp?issn=2072-8069;year=2020;volume=9;issue=2;spage=82;epage=86;aulast=Mahmood>.
- [67] Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wunsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to

- vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod. Pathol.* [Internet]. 2011 Jun [cited 2023 Sep 5];24(6):801–809. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317876/>.
- [68] V. Carlini, D.M. Noonan, E. Abdalalem, D. Goletti, C. Sansone, L. Calabrone, et al., The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions, *Front. Immunol.* 8 (14) (2023 Jun) 1161067.
- [69] Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J. Leukoc. Biol.* [Internet]. 2005 Oct 4 [cited 2023 Sep 5];78(5):1043–1051. Available from: <https://dx.doi.org/10.1189/jlb.0705358>.
- [70] Kuek V, Hughes AM, Kotecha RS, Cheung LC. Therapeutic Targeting of the Leukaemia Microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* [Internet]. 2021 Jun 26;22(13):6888. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6888>.
- [71] F. Chiarini, A. Lonetti, C. Evangelisti, F. Buontempo, E. Orsini, C. Evangelisti, et al., Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* [Internet] 1863 (3) (2016 Mar) 449–463. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167489915002931>.
- [72] Inagaki A, Ishida T, Ishii T, Komatsu H, Iida S, Ding J, et al. Clinical significance of serum Th1-, Th2- and regulatory T cells-associated cytokines in adult T-cell leukemia/lymphoma: High interleukin-5 and -10 levels are significant unfavorable prognostic factors. *Int. J. Cancer* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2023 Mar 19];118(12):3054–3061. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16425276/>.
- [73] K. Drabko, A. Bojarska-Junak, J.R. Kowalczyk, Serum concentration of IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  in children with acute lymphoblastic leukemia - Possible role of oxidative stress, *Cent. J. Immunol.* 33 (3) (2008) 146–149.
- [74] E. Bien, A. Balcerska, E. Adamkiewicz-Drozynska, M. Rapala, M. Krawczyk, J. Stepinski, Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin's lymphomas and acute lymphoblastic leukemias, *Clin. Biochem.* 42 (10–11) (2009 Jul) 1144–1157.
- [75] Zhang K, Li X, Huang R, Chen C, Hu W. IL-10 as an indicator for predicting clinical progression in acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin. Lab.* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 9];67(10):2261–2267. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34655194/>.
- [76] M.W.A. Kerr, F. Magalhães-Gama, H.N.S. Ibiapina, F.S.A. Hanna, L.A. Xabregas, E.B. Alves, et al., Bone marrow soluble immunological mediators as clinical prognosis biomarkers in B-cell acute lymphoblastic leukemia patients undergoing induction therapy, *Front. Oncol.* 27 (11) (2021 Sep) 3631.
- [77] K.C. Conlon, M.D. Miljkovic, T.A. Waldmann, Cytokines in the treatment of cancer, *J. Interf. Cytokine Res.* [Internet] 39 (1) (2019 Jan) 6–21. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>.
- [78] Lee S, Margolin K. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cancers* (Basel). [Internet]. 2011 Oct 13;3(4):3856–3893. Available from: <http://www.mdpi.com/2072-6694/3/4/3856>.
- [79] A. Naing, J.R. Infante, K.P. Papadopoulos, I.H. Chan, C. Shen, N.P. Ratti, et al., Pegylated IL-10 (Pegilodecakin) induces systemic immune activation, CD8+ T cell invigoration and polyclonal T cell expansion in cancer patients, *Cancer Cell* [Internet] 34 (5) (2018 Nov) 775–791.e3. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610818304732>.
- [80] R.M. Berman, T. Suzuki, H. Tahara, P.D. Robbins, S.K. Narula, M.T. Lotze, Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice, *J. Immunol.* [Internet] 157 (1) (1996 Jul 1) 231–238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8683120>.
- [81] F.N. Lauw, D. Pajkrt, C.E. Hack, M. Kurimoto, S.J.H. van Deventer, T. van der Poll, Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia, *J. Immunol.* [Internet] 165 (5) (2000 Sep 1) 2783–2789. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/165/5/2783/33202/Proinflammatory-Effects-of-IL-10-During-Human>.
- [82] Garon EB, Wong DJ, Schneider JG, Aljumaily R, Korn WM, Patel MR, et al. Responses and durability of clinical benefit in non-small cell lung cancer treated with pegilodecakin in combination with anti-PD-1 inhibitors. *Ann. Oncol.* [Internet]. 2018 Oct;29:viii407. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419496014>.
- [83] Naing A, Papadopoulos KP, Autio KA, Ott PA, Patel MR, Wong DJ, et al. Safety, Antitumor Activity, and Immune Activation of Pegylated Recombinant Human Interleukin-10 (AM0010) in Patients With Advanced Solid Tumors. *J. Clin. Oncol.* [Internet]. 2016 Oct 10 [cited 2023 Jun 14];34(29):3562. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2705657013/>.
- [84] A. Naing, D.J. Wong, J.R. Infante, W.M. Korn, R. Aljumaily, K.P. Papadopoulos, et al., Pegilodecakin combined with pembrolizumab or nivolumab for patients with advanced solid tumours (IVY): a multicentre, multicohort, open-label, phase 1b trial, *Lancet Oncol.* [Internet] 20 (11) (2019 Nov) 1544–1555. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473024519305145>.
- [85] Gorby C, Sotolongo Bellón J, Wilmes S, Warda W, Pohler E, Pyfe PK, et al. Engineered IL-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses. *Sci. Signal.* [Internet]. 2020 Sep 15;13(649). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.aab0653>.
- [86] B.R. Lee, B.E. Kwon, E.H. Hong, A. Shim, J.H. Song, H.M. Kim, et al., Interleukin-10 attenuates tumour growth by inhibiting interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signalling in myeloid-derived suppressor cells, *Cancer Lett.* 381 (1) (2016 Oct 10) 156–164.
- [87] Shen L, Li J, Liu Q, Song W, Zhang X, Tiruthani K, et al. Local Blockade of Interleukin 10 and C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 with Nano-Delivery Promotes Antitumor Response in Murine Cancers. *ACS Nano* [Internet]. 2018 [cited 2023 Jun 14];12(10):9830–9841. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsnano.8b00967>.
- [88] Dennis KL, Blatner NR, Gounari F, Khazaie K. Current status of IL-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr. Opin. Oncol.* [Internet]. 2013 Nov [cited 2023 Jun 14];25(6):637. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24322764/>.
- [89] Wu S, Geßner R, Von Stackelberg A, Kirchner R, Henze G, Seeger K. Cytokine/cytokine receptor gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlation of expression and clinical outcome at first disease recurrence. *Cancer* [Internet]. 2005 Mar 1 [cited 2023 Mar 19];103(5):1054–1063. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.20869>.
- [90] PÉREZ-FIGUEROA E, SÁNCHEZ-CUAXOSPA M, MARTÍNEZ-SOTO KA, SÁNCHEZ-ZAUCO N, MEDINA-SANSON A, JIMÉNEZ-HERNÁNDEZ E, et al. Strong inflammatory response and Th1-polarization profile in children with acute lymphoblastic leukemia without apparent infection. *Oncol. Rep.* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2023 Mar 19];35(5):2699–2706. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2016.4657/abstract>.
- [91] H. Ariffin, M.S. Azanan, S.S. Abd Hafzir, L. Oh, K.H. Lau, T. Thirunavakarasu, et al., Young adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia show evidence of chronic inflammation and cellular aging, *Cancer* 123 (21) (2017 Nov 1) 4207–4214.
- [92] Latoch E, Konończuk K, Konstanynowicz-Nowicka K, Muszyńska-Roslan K, Sztolczen K, Chabowski A, et al. Asymptomatic Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Demonstrate a Biological Profile of Inflamm-Aging Early in Life. *Cancers* (Basel). [Internet]. 2022 May 20 [cited 2023 Mar 19];14(10):2522. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/10/2522/html>.
- [93] Mohammed FM, Fahd MA, Jassin NA. Levels of Interleukin-10 in Iraqi Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia after Chemotherapy. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.* [Internet]. 2020 Apr 25 [cited 2023 Mar 19];14(2):1251–1256. Available from: <https://medicopublication.com/index.php/ijfnt/article/view/3078>.
- [94] Zhao S, Wu D, Wu P, Wang Z, Huang J. Serum IL-10 Predicts Worse Outcome in Cancer Patients: A Meta-Analysis. *PLoS One* [Internet]. 2015 Oct 6;10(10):e0139598. Available from: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0139598>.
- [95] Načinović-Duletić A, Stifter S, Dvornik S, Skunca Z, Jonjić N. Correlation of serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels with clinicopathological features and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Int. J. Lab. Hematol.* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2023 Jun 14];30(3):230–239. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1751-553X.2007.00951.x>.
- [96] F. De Vita, M. Orditura, G. Galizia, C. Romano, A. Roscigno, E. Lieto, et al., Serum interleukin-10 levels as a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients, *Chest* 117 (2) (2000 Feb 1) 365–373.
- [97] G. Galizia, M. Orditura, C. Romano, E. Lieto, P. Castellano, L. Pelosio, et al., Prognostic significance of circulating IL-10 and IL-6 serum levels in colon cancer patients undergoing surgery, *Clin. Immunol.* 102 (2) (2002 Feb 1) 169–178.
- [98] Viviani S, Notti P, Bonfante V, Verderio P, Valagussa P, Bonadonna G. Elevated pretreatment serum levels of IL-10 are associated with a poor prognosis in Hodgkin's disease, the milan cancer institute experience. *Med. Oncol.* [Internet]. 2000 [cited 2023 Jun 14];17(1):59–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02826218>.
- [99] L. Xu, A. Kitani, W. Strober, Molecular mechanisms regulating TGF- $\beta$ -induced Foxp3 expression, *Mucosal. Immunol.* [Internet] 3 (3) (2010 May) 230–238. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193301292014799>.
- [100] T.A. Moo-Young, J.W. Larson, B.A. Belt, M.C. Tan, W.G. Hawkins, T.J. Eberlein, et al., Tumor-derived TGF- $\beta$  mediates conversion of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells in a murine model of pancreas cancer, *J. Immunother.* 32 (1) (2009 Jan) 12–21.
- [101] L.W. Collison, V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomin, C. Guy, J. Bankoti, et al., IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population, Available from: *Nat. Immunol.* [Internet] 11 (12) (2010 Dec 17) 1093–1101 <https://www.nature.com/articles/ni.1952>.
- [102] L.W. Collison, G.M. Delgoffe, C.S. Guy, K.M. Vignali, V. Chaturvedi, D. Fairweather, et al., The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional, *Nat. Immunol.* 13 (3) (2012 Mar) 290–299.
- [103] A. Taylor, J. Verhagen, K. Blaser, M. Akdis, C.A. Akdis, Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells, *Immunology* [Internet] 117 (4) (2006 Apr) 433–442. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2006.02321.x>.
- [104] A.G. Jarnicki, J. Lysaght, S. Todryk, K.H.G. Mills, Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF- $\beta$ -producing T cells infiltrating the growing tumor: Influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells, *J. Immunol.* 177 (2) (2006 Jul) 896–904.
- [105] Mirlekar B. Tumor promoting roles of IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, and IL-35: Its implications in cancer immunotherapy. *SAGE Open Med.* [Internet]. 2022 Jan 25 [cited 2022 Jun 27];10:205031212110690. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35096390>.
- [106] H. Solati, M. Zareinejad, A. Ghavami, Z. Ghasemi, Z. Amirghofran, IL-35 and IL-18 serum levels in children with acute lymphoblastic leukemia: the relationship with prognostic factors, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* [Internet]. 42 (4) (2020 May) 281–286. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000001667>.
- [107] Q. Tao, Y. Pan, Y. Wang, H. Wang, S. Xiong, Q. Li, et al., Regulatory T cells-derived IL-35 promotes the growth of adult acute myeloid leukemia blasts, *Int. J.*

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

## 5.2. CAPÍTULO II – DADOS OBTIDOS NO ESTUDO

### 5.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES

A mediana de idade entre os indivíduos do grupo controle e pacientes com LLA foi de 36 (IQR 24-51) e 7 anos (IQR 4-13), respectivamente. O subtipo B demonstrou ser o mais frequente na população estudada. O gênero masculino foi predominante para ambos os grupos do estudo (67% e 51%). Os dados demográficos e laboratoriais estão descritos na Tabela 4. Dentre os indivíduos com LLA, 52% apresentaram algum tipo de comorbidade como doenças infecciosas (42%) (ex. Citomegalovírus, toxoplasmose, doenças parasitárias, dentre outros), e outras comorbidades (58%) (ex. adenomegalia e linfoma de Burkitt). Aproximadamente 52% dos pacientes com LLA recaíram durante o tratamento e 34% foram à óbito ao decorrer do tratamento. Além disso, a mediana de hemoglobina foi de 8,7 g/dL, hematócrito 25,8 g/dL, leucócitos 4,585/mm<sup>3</sup> e plaquetas 54,000/mm<sup>3</sup>.

**Tabela 4.** Características clínicas e demográficas de pacientes com leucemia linfoblástica aguda e controles selecionados.

Variáveis	Grupo Controle n=177	Pacientes com LLA n=102
<b>Idade</b> (anos, mediana [IQR]) <sup>a</sup>	36 [24-51]	7 [4-13]
<b>Gênero</b>		
Masculino, n (%)	119 (67%)	52 (51%)
Feminino, n (%)	58 (33%)	50 (49%)
<b>Comorbidades</b>		
Sim, n (%)	-	53 (52%)
Doenças Infecciosas, n (%)	-	22 (42%)
Outras, n (%)	-	31 (58%)
Não, n (%)	-	49 (48%)
<b>Imunofenótipo</b>		
LLA-B, n (%)	-	89 (87%)
LLA-T, n (%)	-	13 (13%)
<b>Grupo de Risco</b>		
Baixo	-	21 (20%)
Intermediário	-	10 (10%)
Alto	-	71 (70%)
<b>Recaída</b>		
Sim, n (%)	-	53 (52%)
Não, n (%)	-	49 (48%)
<b>Óbito</b>		
Sim, n (%)	-	35 (34%)
Não, n (%)	-	67 (66%)
<b>Hemoglobina</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	8,7 [7,5-9,5]
<b>Hematócrito</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	25,8 [22,8-28,7]
<b>Leucócitos</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	4.585 [2.693-31.650]
<b>Plaquetas</b> (g/dL, mediana [IQR])	-	54.000 [23.000-466.000]

Abreviações: g/dL, Grama por decilitro; IQR, Intervalo Interquartil. Valores de referência: Hemoglobina: 12 – 18 g/dL; Hematócrito: 42-52% Leucócitos: 5.2 – 12.4 x10<sup>9</sup>/μL; Plaquetas: 130 – 400 x10<sup>9</sup>/μL.

### 5.2.2. ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

As variantes mais frequentes na população estudada foram *rs3021094* e *rs1800896* (Tabela 5), com frequência do menor alelo (MAF), variando entre 74% e 54% entre os pacientes com LLA. Entre os *SNVs* estudados, pode-se observar que o genótipo *IL10 G/T rs3021094* (modelo sobredominante [OR: 6,13; IC 95%: 3,43 – 10,94,  $p=0,005$ ]) parece ser um fator de risco para o desenvolvimento de LLA na população em estudo, bem como o genótipo *IL10 A/G rs1800871* (modelo dominante [OR: 1,47; IC 95%: 0,88– 2,44,  $p=0,05$ ]). Entretanto, o genótipo *IL10 T/C rs1800896* (modelo codominante [OR: 0,01; IC 95%: 0,01 – 0,02,  $p=0,002$ ]), demonstrou ser indicador de proteção para LLA, conforme demonstrado na Tabela 6.

**Tabela 5.** Frequência dos alelos e genótipos de *single nucleotide variant (SNVs)* no gene *IL10* em pacientes com leucemia linfoblástica aguda e indivíduos controles.

Genótipos	Grupo Controle n=177 (%)	Pacientes com LLA n=102 (%)	OR (CI 95%)	Valor de <i>p</i>
<b><i>IL10 G&gt;T rs3021094</i></b>				
G	34 (10%)	56 (26%)	0.28 (1.18 – 0.45)	<b>0.001</b>
T	320 (90%)	148 (74%)		
<b><i>IL10 A&gt;G rs1800871</i></b>				
A	128 (36%)	83 (41%)	0.82 (0.57 – 1.18)	0.318
G	226 (64%)	121 (59%)		
<b><i>IL10 T&gt;C rs1800896</i></b>				
T	278 (79%)	93 (46%)	4.36 (2.99 – 6.34)	<b>0.001</b>
C	76 (21%)	111 (54%)		

Abreviações: OR, *Odds Ratio*; CI, Intervalo de confiança de 95%; Valor de  $p$ : <0,05.

**Tabela 5.** Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de *single nucleotide variant (SNVs)* em estudo com leucemia linfoblástica aguda e em indivíduos controles.

Modeos Genéticos	Grupo Controle n=177 (%)	Pacientes com LLA n=102 (%)	OR (CI 95%)	Valor de p	AIC
<b><i>IL10 G&gt;T rs3021094</i></b>					
Codominante					
TT	148 (84%)	49 (48%)			
GT	24 (14%)	50 (49%)	6.29 (3.51 – 11.29)	<b>0.003</b>	330.8
GG	5 (3%)	3 (3%)	1.81 (0.42 – 7.86)		
Dominante					
TT	148 (84%)	49 (48%)			
GT-GG	29 (16%)	53 (52%)	5.52 (3.17 – 9.63)	<b>0.001</b>	331.6
Recessivo					
TT-GT	172 (97%)	99 (97%)			
GG	5 (3%)	3 (3%)	1.04 (0.24 – 4.46)	0.318	370.4
Sobredominante					
TT-GG	153 (86%)	52 (51%)			
GT	24 (14%)	50 (49%)	6.13 (3.43 – 10.94)	<b>0.005</b>	329.4
Log-Aditivo					
0,1,2	177 (63%)	102 (37%)	3.72 (2.26 – 6.14)	<b>0.001</b>	340.8
<b><i>IL10 A&gt;G rs1800871</i></b>					
Codominante					
GG	75 (42%)	34 (33%)			
AG	76 (43%)	53 (52%)	1.54 (0.90 – 2.63)	0.095	369.9
AA	26 (15%)	15 (15%)	1.27 (0.60 – 2.70)		
Dominante					
GG	75 (42%)	34 (33%)			
AG-AA	102 (58%)	68 (67%)	1.47 (0.88 – 2.44)	<b>0.050</b>	368.1
Recessivo					
GG-AG	151 (85%)	87 (85%)			
AA	26 (15%)	15 (15%)	1.00 (0.50 – 1.99)	0.332	370.4
Sobredominante					
GG-AA	101 (57%)	49 (48%)			
AG	76 (43%)	53 (52%)	1.44 (0.88 – 2.34)	<b>0.050</b>	368.2
Log-Aditivo					
0,1,2	177 (63%)	102 (37%)	1.21 (0.85 – 1.72)	0.097	369.3
<b><i>IL10 T&gt;C rs1800896</i></b>					
Codominante					
TT	112 (63%)	0 (0%)			
TC	54 (31%)	99 (97%)	0.01 (0.01 – 0.02)	<b>0.002</b>	219.2
CC	11 (6%)	3 (3%)	0.01 (0.01 – 0.13)		
Dominante					
TT	112 (63%)	0 (0%)			
TC-CC	65 (37%)	102 (100%)	0.01 (0.01 – 0.02)	<b>0.006</b>	227.2
Recessivo					
TT-TC	166 (94%)	99 (97%)			
CC	11 (6%)	3 (3%)	0.46 (0.12 – 1.68)	0.069	368.8
Sobredominante					
TT-CC	123 (70%)	3 (3%)			
TC	54 (30%)	99 (97%)	75.17 (22.81 – 247.65)	<b>0.001</b>	231.0
Log-Aditivo					
0,1,2	177 (63%)	102 (37%)	11.05 (5.69 – 21.47)	<b>0.002</b>	290.6

Abreviações: OR, *Odds Ratio*; CI, Intervalo de confiança de 95%; AIC, Valor do critério de informação de Akaike. Valor de p:<0,05.

### 5.2.3. ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM RECAÍDA

Na Tabela 7, observamos a associação dos *SNVs* estudados com o risco de recaída. O genótipo *IL10 G/T rs3021094* parece ser um indicador de proteção contra recaída (modelo sobredominante [OR: 0,16; IC 95%: 0,07–0,37,  $p=0,003$ ]). Já o genótipo *IL10 T/C rs1800896* foi associado com o risco de recaída em pacientes com LLA (modelo codominante [OR: 2,21; IC 95%: 0,19–25,2,  $p=0,012$ ]). Contudo, não foi observado associação no genótipo *IL10 T/C rs1800871*.

**Tabela 6.** Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de *single nucleotide variant* (*SNVs*) em estudo com recaída.

Genetic models	Recaída		OR (CI 95%)	Valor de <i>p</i>	AIC
	Não n=49 (%)	Sim n=53 (%)			
<b><i>IL10 G&gt;T rs3021094</i></b>					
Codominante					
TT	13 (27%)	36 (68%)			
GT	35 (71%)	15 (28%)	0.15 (0.06 – 0.37)	<b>0.001</b>	127.6
GG	1 (2%)	2 (4%)	0.72 (0.06 – 8.65)		
Dominante					
TT	13 (26%)	36 (68%)			
GT-GG	36 (74%)	17 (32%)	0.17 (0.07 – 0.40)	<b>0.007</b>	127.2
Recessivo					
TT-GT	48 (98%)	51 (96%)			
GG	1 (2%)	2 (4%)	1.88 (0.17 – 21.44)	0.200	145.0
Sobredominante					
TT-GG	14 (29%)	38 (72%)			
GT	35 (71%)	15 (28%)	0.16 (0.07 – 0.37)	<b>0.003</b>	125.7
Log-Aditivo					
0,1,2	49 (48%)	53 (52%)	0.24 (0.11 – 0.54)	<b>0.007</b>	131.6
<b><i>IL10 A&gt;G rs1800871</i></b>					
Codominante					
GG	18 (37%)	16 (30%)			
AG	26 (53%)	27 (51%)	1.17 (0.49 – 2.77)	0.144	145.6
AA	5 (10%)	10 (19%)	2.25 (0.63 – 7.99)		
Dominante					
GG	18 (37%)	16 (30%)			
AG-AA	31 (63%)	37 (70%)	1.34 (0.59–3.07)	0.161	144.8
Recessivo					
GG-AG	44 (90%)	43 (81%)			
AA	5 (10%)	10 (19%)	2.05 (0.65 – 6.48)	0.070	143.7
Sobredominante					
GG-AA	23 (47%)	26 (49%)			
AG	26 (53%)	27 (51%)	0.92 (0.42 – 2.00)	0.276	145.2
Log-Aditivo					
0,1,2	49 (48%)	53 (52%)	1.41 (0.78–2.55)	0.083	143.9
<b><i>IL10 T&gt;C rs1800896</i></b>					
Codominante					
CC	2 (4%)	1 (2%)			
TC	47(96%)	52 (98%)	2.21 (0.19 – 25.2)	<b>0.012</b>	128.6
Log-Aditivo					
0,1,2	49 (48%)	53 (52%)	2.21 (0.19 – 25.2)	<b>0.012</b>	128.6

Abreviações: OR, *Odds Ratio*; CI, Intervalo de confiança de 95%; AIC, Valor do critério de informação de Akaike. Valor de  $p < 0,05$ .

### 5.2.4. ASSOCIAÇÃO DOS GENÓTIPOS E ALELOS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO COM ÓBITO

No estudo correspondente ao risco de óbito descrito na Tabela 8, é possível observar que o genótipo *IL10 G/T rs3021094* (modelo dominante [OR: 0,48; IC 95%: 0,21–1,10, p= 0,026]), bem como *IL10 T/C rs1800871* (modelo sobredominante [OR: 0,48; IC 95%: 0,21–1,10, p= 0,026]) e *IL10 T/C rs1800896* (modelo codominante OR: 0,01; IC 95%: 0,01–0,58, p= 0,012) demonstraram ser indicadores de proteção ao óbito em pacientes com LLA.

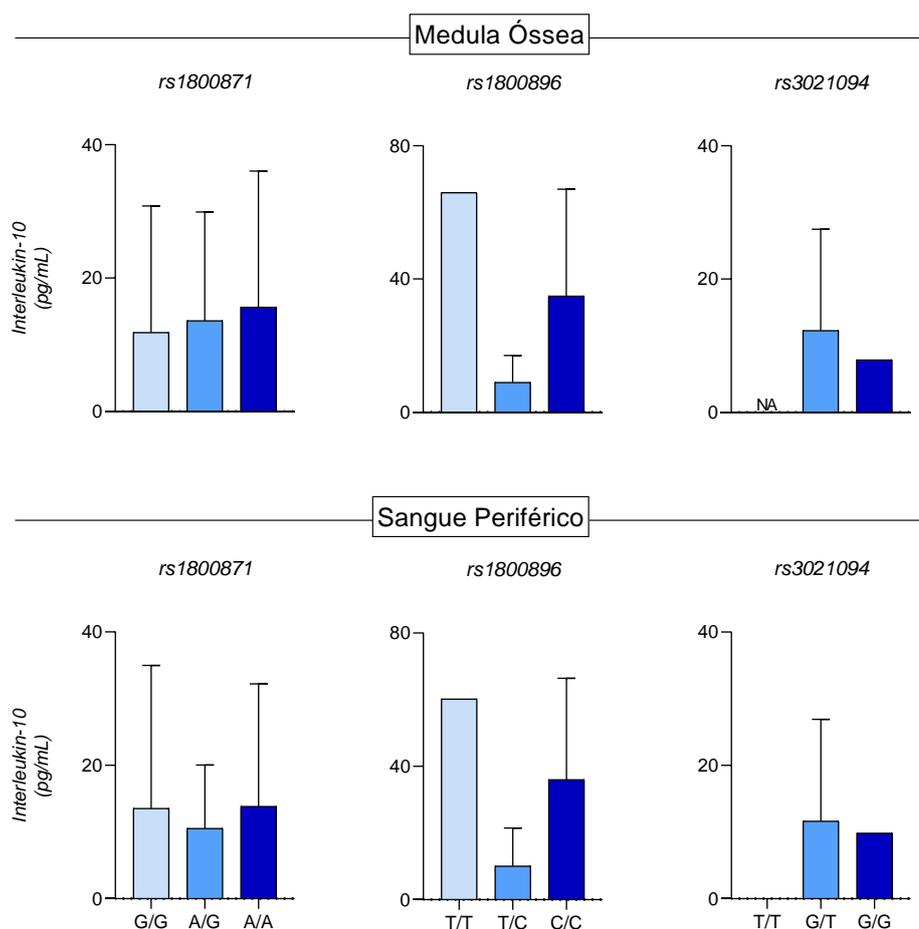
**Tabela 7.** Análise multivariada ajustada por sexo e idade para associação de *single nucleotide variant* (SNVs) em estudo com óbito em pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

Modelo Genético	Óbito		OR (CI 95%)	Valor de p	AIC
	Não n=67 (%)	Sim n=35 (%)			
<b><i>IL10 G&gt;T rs3021094</i></b>					
Codominante					
TT	28 (42%)	21 (60%)			
GT	37 (55%)	13 (37%)	0.47 (0.20 – 1.09)	0.069	134.0
GG	2 (3%)	1 (3%)	0.67 (0.06 – 7.85)		
Dominante					
TT	28 (42%)	21 (60%)			
GT-GG	39 (58%)	14 (40%)	0.48 (0.21 – 1.10)	<b>0.026</b>	132.1
Recessivo					
TT-GT	65 (97%)	34 (97%)			
GG	3 (3%)	1 (3%)	0.96 (0.08 – 10.92)	0.323	135.2
Sobredominante					
TT-GG	30 (45%)	22 (63%)			
GT	37 (55%)	13 (37%)	0.48 (0.21 – 1.11)	<b>0.027</b>	132.2
Log-Aditivo					
0,1,2	67 (66%)	35 (34%)	0.54 (0.25 – 1.16)	0.036	132.6
<b><i>IL10 A&gt;G rs1800871</i></b>					
Codominante					
GG	20 (30%)	14 (40%)			
AG	39 (58%)	14 (40%)	0.51 (0.21 – 1.28)	0.067	134.0
AA	8 (12%)	7 (20%)	1.25 (0.37 – 4.25)		
Dominante					
GG	20 (30%)	14 (40%)			
AG-AA	47 (70%)	21 (60%)	0.64 (0.27–1.50)	0.103	134.1
Recessivo					
GG-AG	59 (82%)	28 (80%)			
AA	8 (12%)	7 (20%)	1.84 (0.61 – 5.59)	0.094	134.0
Sobredominante					
GG-AA	28 (42%)	21 (60%)			
AG	39 (58%)	14 (40%)	0.48 (0.21 – 1.10)	<b>0.026</b>	132.1
Log-Aditivo					
0,1,2	67 (66%)	35 (34%)	0.95 (0.52–1.76)	0.293	135.2
<b><i>IL10 T&gt;C rs1800896</i></b>					
Codominante					
CC	0	3 (9%)			
TC	67(100%)	32 (91%)	0.01 (0.01 – 0.58)	<b>0.012</b>	128.6
log-Aditivo					
0,1,2	67 (66%)	35 (34%)	0.01 (0.01 – 0.58)	<b>0.012</b>	128.6

### 5.2.5. ASSOCIAÇÃO DOS SNVs *IL10* A/G *rs1800871*, T/C *rs1800896*, G/T *rs3021094* COM A PRODUÇÃO DA CITOCINA IL-10

As concentrações de IL-10 na leucemia linfoblástica aguda entre os genótipos estudados estão descritos na Figura 10. É possível observar um discreto aumento de IL-10 no genótipo mutado *rs1800871* (A/A) na medula óssea e no sangue periférico, quando comparado aos indivíduos homocigoto (G/G) e heterocigoto (A/G). Contudo, não há uma diferença significativa que apresente uma relação com a LLA. Além disso, os genótipos A/G *rs1800871* e T/C *rs1800896* também não apresentaram alterações significativas que possibilitem associação com a doença.

**Figura 10.** Concentrações circulantes de citocina entre os genótipos do SNV IL10 em pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda.



Concentrações de citocina circulante (IL-10) entre os genótipos categorizados em subgrupos denominados: tipo selvagem (■), heterocigoto (■) e mutante homocigoto (■) em 42 pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda. Os dados são expressos em pg/mL para citocinas. NA= Não aplicável.

## 6. DISCUSSÃO

A LLA é uma doença onco-hematológica multifatorial, de evolução rápida, clínica e biologicamente heterogênea que se caracteriza pela hiper proliferação de progenitores linfoides imaturos e o acúmulo de clones malignos na medula óssea, com liberação no sangue periférico e em tecidos extramedulares (107). Embora o mecanismo fisiopatogênico exato seja desconhecido, a predisposição genética, a presença de variantes de nucleotídeo único e um microambiente medular alterado demonstraram fortes associações com o desenvolvimento da doença. Estudos recentes têm focado no papel de *SNVs* que afetam a expressão de genes específicos que estão associados à sobrevivência celular e ao surgimento e progressão da LLA (83).

A IL-10 é uma citocina reguladora chave para suprimir respostas imunes e bloquear as funções e a síntese de diversas citocinas. É produzida por uma ampla variedade de células, incluindo as células T auxiliares (células Th2), células T CD8, células NK e células dendríticas. A IL-10 também é produzida por células tumorais, o que foi correlacionado com a sua capacidade de causar imunossupressão (108). Além do seu papel na regulação imunológica, a IL-10 apresenta dois efeitos durante o desenvolvimento tumoral, isto é, a promoção do câncer e a inibição do câncer (109)

As concentrações plasmáticas de IL-10, associadas à presença de *SNVs* no gene *IL10* têm sido alvo de diversos estudos com o objetivo de esclarecer o seu papel no câncer e em outras doenças, uma vez que *SNVs* nas regiões reguladoras e codificadoras de genes podem alterar o nível de expressão, função dos genes ou dos produtos codificados (88). Nesse sentido, a avaliação desses *SNVs* pode contribuir para o estabelecimento de novos parâmetros para o acompanhamento de pacientes com LLA, auxiliando em abordagens terapêuticas mais precisas.

Em nosso estudo, ao avaliar o perfil clínico e demográfico da população estudada, nossos achados demonstraram que o subtipo LLA-B é o mais frequente e a mediana de idade entre os pacientes foi de 7 anos, o que corrobora com outros estudos que descrevem os mesmos dados como o padrão epidemiológico mais comum (110–112). O gênero masculino apresentou maior frequência, semelhante ao que foi descrito por Alves et al. e Bonilha et al. em estudos com pacientes do Amazonas e Rio de Janeiro, respectivamente (113,114). Dentre os indivíduos com LLA, 52% apresentaram algum tipo de comorbidade o que pode influenciar para um pior prognóstico devido a complicações associadas a diferentes patógenos (112,115). Além disso, aproximadamente 52% dos pacientes com

LLA recaíram e 34% foram à óbito ao decorrer do tratamento. Esses achados estão de acordo com outros estudos que relataram taxas de recaída de até 58,5% (116).

No que diz respeito ao perfil genético desses indivíduos, nosso estudo demonstrou que os *SNVs* *rs3021094*, *rs1800871* podem estar associados ao risco de desenvolvimento de LLA. Já o *SNV* *rs1800896* do *gene* *IL10* demonstrou um efeito protetor contra a doença. Os *SNVs* *rs1800871* e *rs1800896* estão localizados na proximidade do local de transcrição no promotor do *gene* *IL10*, o que revela o potencial regulatório dessas variantes, uma vez que essa região é altamente polimórfica e apresenta dois “microsatélites” (IL-10R e IL-10G) que influenciam na transcrição do gene e afetam a produção da molécula (117).

O nível de ativação transcricional de um gene depende da ligação de fatores regulatórios às sequências de reconhecimento específicas no promotor (118). A presença de *SNVs* nos locais de ligação do fator de transcrição podem levar a alterações nos mecanismos regulatórios normais do gene, contribuindo para o desenvolvimento do câncer (119). O *SNV* *rs1800871* foi estudado em uma ampla gama de populações em todo o mundo, como coreana, indiana, tunisiana e chinesa e foi apontado como preditor de risco de câncer cervical em quatro modelos genéticos, com exceção do modelo recessivo (119).

Em um estudo realizado com uma população iraniana, o *rs1800871* foi descrito como fator de risco à suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico (101). Outros achados, apontam que *rs1800871* pode conferir maior risco para o desenvolvimento de Linfoma não-Hodkin, câncer de mama e adenoma hipofisário (102,103,120). No presente estudo, o *SNV* *rs1800871* foi apontado como fator de risco para LLA estando também associado a melhor sobrevida entre os pacientes.

Um estudo envolvendo a população sudanesa demonstrou que o *SNV* *rs1800896* está associado a um risco aumentado de LLA em adultos (109). Já em um estudo com pacientes com LMA das regiões Central e Nordeste da Romênia não houve associação entre *IL10* *rs1800896* e o risco da doença (109). O *rs1800896* também foi associado a suscetibilidade a câncer gástrico, de mama e linfoma não-hodgkin (98–100). Em nosso estudo o alelo C mutado (*rs1800896* T/C) apresentou alta frequência em pacientes com LLA e demonstrou estar associado ao risco de desenvolvimento da doença. Nossos achados demonstram ainda que o *rs1800896* pode ser um marcador de melhor sobrevida

entre os pacientes com LLA, porém, também foi observada associação com risco de recaída.

O *SNV rs3021094* está localizado no primeiro íntron do gene *IL10* e parece alterar o sítio de ligação do fator de transcrição Sp3, importante regulador de uma variedade de genes, como inibidor de quinase dependente de ciclina (*p27*) que medeia a interrupção do ciclo celular (104,121). As regiões intrônicas foram inicialmente consideradas como não funcionais, contudo, evidências recentes defendem a funcionalidade do íntron (122). Em um estudo realizado com camundongos transgênicos, foi demonstrado que os íntrons aumentam a eficiência transcricional (122).

Variantes em regiões intrônicas foram documentadas em diversas doenças. Por exemplo, mutações de codificação e de sítio de splice no gene *MPZ* foram descritos como causa de uma neuropatia periférica desmielinizante chamada de doença de Charcot-Marie-Tooth tipo 1 (123). A proteína *MPZ* é necessária para a mielinização adequada. O primeiro íntron do *MPZ* contém locais de ligação para os fatores de transcrição *SOX10* e *EGR2*, que estão envolvidos na regulação da expressão de *MPZ*. A variante c.126-1086T>A promove uma alteração em um nucleotídeo no sítio de ligação *SOX10* diminuindo sua atividade potenciadora (123).

Em um estudo realizado com pacientes com câncer colorretal no Taiwan, o *SNV rs3021094 IL10* foi associado ao maior risco de morte e menor sobrevida global (104). Além disso, esse *SNV* também foi descrito como fator de risco para suscetibilidade a osteoporose na população Han do noroeste da China (105). Em nosso estudo, o alelo T mutado (*rs3021094 G>T*) apresentou alta frequência em pacientes com LLA e parece ser um fator de risco para o desenvolvimento da doença. Contudo, nossos dados também apontam para um efeito protetor em casos de óbito e recaída entre os pacientes com LLA.

Estes dados destacam o papel paradoxal da IL-10 na LLA demonstrando que, ao mesmo tempo em que a ocorrência destes *SNVs* aumenta as chances do desenvolvimento de um processo neoplásico, também confere proteção contra óbito e recaída indicando dois comportamentos distintos, conforme descrito na literatura. Alterações nas concentrações de IL-10 têm efeito deletério (83). Em baixas concentrações, a molécula promove respostas imunes hiperativas caracterizadas por inflamação excessiva que determina a leucemogênese. Por outro lado, o aumento de IL-10 leva à progressão tumoral (83).

A IL-10 inibe um amplo espectro de funções celulares, incluindo a expressão de receptores coestimulatórios como CD80 e CD86 e a atuação de NF- $\kappa$ B, importante fator de transcrição envolvido na produção de citocinas pró inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 e IL-1 $\beta$  (124). No contexto da leucemia, os estudos demonstram que a IL-10 pode promover a sobrevivência das células leucêmicas ao mesmo tempo que diminui as respostas antitumorais no microambiente da leucemia (83). Tal processo é amplamente mediado pela sinalização autócrina de IL-10R que regula negativamente moléculas coestimuladoras e reduz a capacidade das células apresentadoras de antígeno (APC) de estimular as células T (125).

Diversos fatores podem estar ligados à expressão irregular de IL-10, afetando a homeostase imunológica e aumentando o risco de câncer (14,126). Nesse contexto, variantes em regiões reguladoras do gene *IL10* promovem um aumento da expressão da molécula, o que tem sido significativamente associado com a suscetibilidade e patogênese da doença (95,126). Além disso, as concentrações de IL-10, associadas à presença de variantes de nucleotídeo no gene *IL10* também podem influenciar a resposta ao tratamento em pacientes com LLA, tendo impacto direto no prognóstico destes.

Em nosso estudo, não houve associação entre as mutações estudadas e as concentrações de IL-10, devido a quantidade de amostras utilizadas para a dosagem de citocinas. Contudo, muitos achados demonstram níveis elevados de IL-10 ao diagnóstico, que diminuíram após o início da terapia de indução a remissão, sugerindo que esses níveis refletem a carga leucêmica dos pacientes, e estão aparentemente relacionados a um pior prognóstico clínico da doença (82,92,127–129). Além disso, pacientes com doença residual mensurável positiva apresentaram níveis mais altos de IL-10 no compartimento medular ao contrário dos pacientes com DRM negativa que ao final da terapia exibiram níveis mais baixos da citocina (130).

## **7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS**

Apesar da associação de *SNVs* com LLA e dados clínicos, a principal limitação do estudo foi o *N* amostral, tendo em vista que outros estudos envolvendo *SNVs* realizam análises com *n* amostral maior. Além disso, o número de amostras para a dosagem de citocinas foi menor que o número de amostras de DNA, o que acabou comprometendo as análises de relação entre os *SNVs* e a produção de citocinas. Dessa forma, faz-se

necessário estudos mais abrangentes com um N amostral maior a fim de demonstrar o efeito funcional desses polimorfismos na produção de IL-10 em pacientes com LLA e sua influência no prognóstico.

## 8. CONCLUSÃO

A interleucina-10 é uma molécula do perfil T-regulatório capaz de inibir importantes reações imunes mediadas por células contra microrganismos intracelulares e contribuem para o desenvolvimento neoplásico. A presença de variantes de nucleotídeo único em regiões reguladoras do gene pode alterar sua expressão e determinar diferenças na produção da IL-10, contribuindo para o desenvolvimento de LLA e afetando o prognóstico clínico de pacientes.

Em conclusão, nosso estudo demonstrou que: (i) Os *SNVs* *rs3021094* e *rs1800871* do gene *IL10* podem estar associados ao maior risco de desenvolvimento de LLA, enquanto o *SNV* *rs1800896* pode ser um marcador de proteção contra a doença, (ii) O *SNV* *rs3021094* foi associado à proteção contra recaída e óbito em pacientes com LLA, os *SNVs* *rs1800871* e *rs1800896* do gene *IL10* também foram associados à proteção contra óbito, contudo o *SNV* *rs1800896* demonstrou ser indicador de risco para recaída em pacientes com LLA, (ii) os alelos mutados *G>T* (*rs3021094*) e *T>C* (*rs1800896*) apresentaram alta frequência em pacientes com LLA, (iii) nossos achados sugerem que estas variantes podem servir de marcadores de prognóstico em pacientes com LLA, contudo, estudos futuros devem ser realizados para melhor elucidar o papel desses *SNVs* na produção de IL-10 e o seu impacto no prognóstico de pacientes com LLA, uma vez que não foi possível correlacionar os *SNVs* estudados com as concentrações de citocina.

## REFERÊNCIAS

1. Bhat A, Shah R, Bhat GR, Verma S, Sharma V, Sharma I, et al. Association of ARID5B and IKZF1 Variants with Leukemia from Northern India. *Genet Test Mol Biomarkers* [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Oct 1];23(3):176–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30810385/>
2. Silva FA. Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em crianças brasileiras e implicação de infecções na sua patogênese. *Inca*. 2009;1–123.
3. Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem Biol*

- Interact. 2012;196(3):59–67.
4. Baeker Bispo JA, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020;10(6).
  5. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Aug 1;23(4):655–74.
  6. Haferlach T, Bacher U, Kern W, Schnittger S, Haferlach C. Diagnostic pathways in acute leukemias: A proposal for a multimodal approach. *Ann Hematol*. 2007;86(5):311–27.
  7. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Sep 26];121(15):2517–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.29383>
  8. Farias MG, Castro SM de. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *J Bras Patol e Med Lab* [Internet]. 2004 Apr [cited 2022 Sep 28];40(2):91–8. Available from: <http://www.scielo.br/j/jbpml/a/hqbmPwpLN5tLzxRX3kdnSpg/?lang=pt>
  9. Rocha JMC, Xavier SG, de Lima Souza ME, Assumpção JG, Murao M, de Oliveira BM. Current Strategies for the Detection of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2016 [cited 2022 Oct 2];8(1). Available from: </pmc/articles/PMC4848021/>
  10. Brandalise SR, Pinheiros VR, Lee MLM. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda na infância. *Soc Bras Oncol Pediátrica*. 2009;
  11. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(8):471–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6>
  12. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukemia Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2016;6736(March 2013):2–14.
  13. Smith KC, Bateman AC, Fussell HM, Howell WM. Cytokine gene polymorphisms and breast cancer susceptibility and prognosis. *Eur J Immunogenet*. 2004;31(4):167–73.
  14. Lo WJ, Chang WS, Hsu HF, Ji HX, Hsiao CL, Tsai CW, et al. Significant Association of Interleukin-10 Polymorphisms with Childhood Leukemia Susceptibility in Taiwan. *In Vivo*. 2016;30(3):265–9.

15. Lightfoot T, Smith A, Roman E. Leukemia. *Int Encycl Public Heal* [Internet]. 2022 May 4 [cited 2022 Sep 26];410–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>
16. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Exp Hematol Oncol*. 2014;3(1):1–14.
17. Azevedo-Silva F, De Camargo B, Pombo-de-Oliveira MS. Implications of infectious diseases and the adrenal hypothesis for the etiology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Brazilian J Med Biol Res*. 2010;43(3):226–9.
18. Leucemia AB de. Abrale. Tipos de Leucemia. p. <https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/?gclid=>.
19. Juárez-Avendaño G, Méndez-Ramírez N, Luna-Silva NC, Cruz-Hernández VA, Gómez-Almaguer D, Pelayo R, et al. Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2021;78(3):159–70.
20. Observatório de Oncologia » Tendências da mortalidade por leucemia no Brasil [Internet]. [cited 2022 Sep 29]. Available from: [https://observatoriodeoncologia.com.br/mortalidade\\_leucemias/](https://observatoriodeoncologia.com.br/mortalidade_leucemias/)
21. Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol*. 2007;18(SUPPL. 1).
22. Farmasi J, Dan S. The role of immunological soluble factors, genetic polymorphisms and microRNAs on childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. 2017;14(1):55–64.
23. 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*. 2016;33(2):83–93.
24. INCA. Região Norte - estimativa dos casos novos — Instituto Nacional de Câncer - INCA [Internet]. Ministério da Saúde. 2023 [cited 2024 Jan 8]. Available from: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/regiao/norte>
25. Silva AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(8):1–16.
26. Chang JS, Zhou M, Buffler PA, Chokkalingam AP, Metayer C, Wiemels JL.

- Profound deficit of IL10 at birth in children who develop childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(8):1736–40.
27. Rashed R, Shafik R, Shafik N, Shafik H. Associations of interleukin-10 gene polymorphisms with acute myeloid leukemia in human (Egypt). *J Cancer Res Ther.* 2018;14(5):1083–8.
  28. Pastorczak A, Domka K, Fidyk K, Poprzeczko M, Firczuk M. Mechanisms of Immune Evasion in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Sep 27];13(7). Available from: [/pmc/articles/PMC8037152/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3918152/)
  29. Jabbour E, O'Brien S, Konopleva M, Kantarjian H. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2022 Sep 27];121(15):2517–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cncr.29383>
  30. Navarrete-Meneses M del P, Pérez-Vera P. Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2017 Jul 1;74(4):243–64.
  31. Jaffe ES, Harris NL, Stein H VJ. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues - WHO Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 3. 2001 [cited 2024 Jan 25];351. Available from: [https://books.google.com/books/about/Pathology\\_and\\_Genetics\\_of\\_Tumours\\_of\\_Hae.html?hl=pt-BR&id=XSKqcy7TUZUC](https://books.google.com/books/about/Pathology_and_Genetics_of_Tumours_of_Hae.html?hl=pt-BR&id=XSKqcy7TUZUC)
  32. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JKC, Cleary ML, et al. A Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms: A Proposal From the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994 Sep 1;84(5):1361–92.
  33. 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* [Internet]. 2011 May 5 [cited 2022 Sep 28];117(19):5019. Available from: [/pmc/articles/PMC3109529/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/)
  34. 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* [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2024 Jan 25];36(7):1720. Available from: [/pmc/articles/PMC9214472/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35111111/)

35. Thol F. ALL is not the same in the era of genetics. *Blood* [Internet]. 2021 Sep 16 [cited 2024 Jan 25];138(11):915–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34529020/>
36. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz HJ, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Aug 27 [cited 2024 Jan 25];47(9):1020. Available from: </pmc/articles/PMC4603357/>
37. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Haugom L, Tierens A, Ulvmoen A, et al. A novel TCF3-HLF fusion transcript in acute lymphoblastic leukemia with a t(17;19)(q22;p13). *Cancer Genet* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2024 Jan 25];205(12):669–72. Available from: <http://www.cancerjournal.org/article/S2210776212002542/fulltext>
38. Chong SL, Asnawi AWA, Leong TS, Tan JT, Law KB, Hon SL, et al. Impact of timely BCR-ABL1 monitoring before allogeneic stem cell transplantation among patients with BCR-ABL1-positive B-acute lymphoblastic leukemia. *Blood Res* [Internet]. 2021 Sep 9 [cited 2022 Sep 27];56(3):175. Available from: </pmc/articles/PMC8478615/>
39. Tansel<sup>1</sup> T, Onursal<sup>1</sup> E, Dayıoğlu<sup>1</sup> E, Başaran<sup>1</sup> M, Sungur<sup>2</sup> Z, Çamcı<sup>2</sup> E, et al. Childhood mediastinal masses in infants and children. *Turk J Pediatr*. 2006;48:8–12.
40. Hijjiya N, Liu W, Sandlund IT, Jeha S, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Overt testicular disease at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: lack of therapeutic role of local irradiation. *Leuk* 2005 198 [Internet]. 2005 Jun 23 [cited 2024 Jan 25];19(8):1399–403. Available from: <https://www.nature.com/articles/2403843>
41. Pui C-H, Evans WE. Acute Lymphoblastic Leukemia. Wood AJJ, editor. <https://doi.org/10.1056/NEJM199808273390907> [Internet]. 1998 Aug 27 [cited 2024 Jan 25];339(9):605–15. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199808273390907>
42. Bleyer WA. Central Nervous System Leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 1988 Aug 1;35(4):789–814.
43. Kraigher-Krainer E, Lackner H, Sovinz P, Schwinger W, Benesch M, Urban C. Numb chin syndrome as initial manifestation in a child with acute lymphoblastic

- leukemia. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2024 Jan 25];51(3):426–8. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pbc.21627>
44. Ingram LC, Fairclough DL, Furman WL, Sandlund JT, Kun LE, Rivera GK, et al. Cranial Nerve Palsy in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Non-Hodgkin's Lymphoma. 1991 [cited 2024 Jan 25]; Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>
  45. Seth R, Singh A. *Leukemias in Children*. 2015;
  46. Ikeuti PS, Borim LNB, Luporini RL. Dor óssea e sua relação na apresentação inicial da leucemia linfóide aguda. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2006 [cited 2022 Sep 29];28(1):45–8. Available from:  
<http://www.scielo.br/j/rbhh/a/dJTXXnxgGFD5ZhW9qQKzFQL/?lang=pt>
  47. Landau H, Lamanna N. *Clinical Manifestations and Treatment of Newly Diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults*. 2006;
  48. Alvarnas JC, Brown PA, Aoun P, Ballen KK, Barta SK, Borate U, et al. Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2015: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN J Natl Compr Cancer Netw*. 2015;13(10):1240–79.
  49. ABRALE. Como diagnosticar Leucemia Linfóide Aguda [Internet]. *Revista online ABRALE*. 2020 [cited 2022 Sep 29]. p.  
<https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lla/dia>. Available from:  
<https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lla/diagnostico/>
  50. Leucemia AB de. *Abrale. Diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda*. p.  
<https://www.abrale.org.br/doencas/leucemia/lla/dia>.
  51. Board PPTE. Late Effects of Treatment for Childhood Cancer (PDQ®). *PDQ Cancer Inf Summ* [Internet]. 2004 Apr 23 [cited 2022 Sep 29]; Available from:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65832/>
  52. Board PPTE. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®). *PDQ Cancer Inf Summ* [Internet]. 2022 Apr 6 [cited 2022 Sep 29]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>
  53. Pui C-H, Mullighan CG, Evans WE, Relling M V. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* [Internet]. 2012 Aug 9 [cited 2022 Sep 29];120(6):1165–74. Available from:  
<https://ashpublications.org/blood/article/120/6/1165/30512/Pediatric-acute-lymphoblastic-leukemia-where-are>

54. Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grümayer R, Röttgers S, Steiner M, König M, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: The Austrian and German Acute Lymphoblastic Leukemia Berlin-Frankfurt-Münster (ALL-BFM) trials. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 21;26(18):3046–50.
55. Laks D, Longhi F, Bernardes Wagner M, Ramos Garcia PC. Avaliação da sobrevida de crianças com leucemia linfocítica aguda tratadas com o protocolo Berlim-Frankfurt-Munique. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2003 [cited 2022 Oct 4];79(2):149–58. Available from: <http://www.scielo.br/j/jped/a/zhRPZFsTHRYxv3bnwzm9cRp/?lang=pt>
56. Myriam Campbell et. a. ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. 2009. 178 p.
57. Pereira Leite E, Tereza Cartaxo Muniz M, da Cunha Andrade Cirne de Azevedo A, Ribeiro Souto F, Cristina Lopes Maia Â, Marilda da Fonseca Gondim C, et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda Prognostic factors in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2007;7(4):413–21.
58. Elman I, Silva MEMP e. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda: Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos. *Rev Bras Cancerol* [Internet]. 2007 Sep 28 [cited 2022 Sep 19];53(3):297–303. Available from: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1796>
59. Da Costa Salina TD, Ferreira YA, Alves EB, Ferreira CM, De Paula EV, Mira MT, et al. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 16 [cited 2022 Oct 2];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27526794/>
60. Kruse A, Abdel-Azim N, Kim HN, Ruan Y, Phan V, Ogana H, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2024 Jan 25];21(3). Available from: </pmc/articles/PMC7037356/>
61. Szczepański T, Willemse MJ, Kamps WA, Van Wering ER, Langerak AW, Van Dongen JJM. Molecular discrimination between relapsed and secondary acute

- lymphoblastic leukemia: Proposal for an easy strategy. *Med Pediatr Oncol* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2024 Jan 25];36(3):352–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mpo.1085>
62. Rosenberg AS, Brunson A, Paulus JK, Tuscano J, Wun T, Keegan THM, et al. Secondary acute lymphoblastic leukemia is a distinct clinical entity with prognostic significance. *Blood Cancer J* [Internet]. 2017 [cited 2024 Jan 25];7(9):e605. Available from: </pmc/articles/PMC5709750/>
  63. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Easton J, et al. NIH Public Access leukaemia. *Nature*. 2012;481(7380):157–63.
  64. Mengual JS. Capítulo 2: El derecho a la Lib Relig en las Relac iglesia-estado. 2020;37–58.
  65. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* (80- ). 1997;278(5340):1059–64.
  66. Zhu H, Cao X. NLR members in inflammation-associated carcinogenesis. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(5):403–5.
  67. Greaves M. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur PMC Funders Gr Author Manuscr*. 2020;18(8):471–84.
  68. Sousa AES. *Imunologia. Rev Ciência Elem*. 2020;8(3).
  69. Kantono M, Guo B. Inflammasomes and cancer: The dynamic role of the inflammasome in tumor development. *Front Immunol*. 2017;8(SEP):1–9.
  70. Jesus MC. *Imunologia do Câncer*. 2002 [Internet]. 2002; Available from: <http://repositorio.uniceub.br/bitstream/123456789/2487/2/9915020.pdf>
  71. KALKHORAN, Sara; BENOWITZ, Neal L .; RIGOTTI NA. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Rev del Col Am Cardiol*. 2018;72(23):2964–79.
  72. Nagarsheth N, Wicha MS, Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 2017 179 [Internet]. 2017 May 30 [cited 2022 Sep 30];17(9):559–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/nri.2017.49>
  73. Pastorczyk A, Domka K, Fidyk K, Poprzeczko M, Firczuk M. Mechanisms of Immune Evasion in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Apr 1 [cited 2022 Sep 30];13(7). Available from: </pmc/articles/PMC8037152/>
  74. Briukhovetska D, Dörr J, Endres S, Libby P, Dinarello CA, Kobold S.

- Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer* 2021 218 [Internet]. 2021 Jun 3 [cited 2022 Sep 30];21(8):481–99. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41568-021-00363-z>
75. Fidanza M, Seif AE, Jo S, Kariminia A, Rolf N, Sly LM, et al. IFN- $\gamma$  directly inhibits murine B-cell precursor leukemia-initiating cell proliferation early in life. *Eur J Immunol* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2024 Feb 18];47(5):892–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201646806>
76. Zahran AM, Shibl A, Rayan A, Mohamed MAEH, Osman AMM, Saad K, et al. Increase in polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells and regulatory T-cells in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Reports* 2021 111 [Internet]. 2021 Jul 22 [cited 2024 Feb 18];11(1):1–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-94469-x>
77. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, Md Noor S, Osman R, Abdul-Jalil M, et al. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukemia patients. *Hematology* [Internet]. 2015 Oct 1 [cited 2024 Feb 18];20(9):523–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26119924/>
78. Salem ML, El-Shanshory MR, Abdou SH, Attia MS, Sobhy SM, Zidan MF, et al. Chemotherapy alters the increased numbers of myeloid-derived suppressor and regulatory T cells in children with acute lymphoblastic leukemia. *Immunopharmacol Immunotoxicol* [Internet]. 2018 Mar 4 [cited 2024 Feb 18];40(2):158–67. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08923973.2018.1424897>
79. Dai Q, Zhang G, Wang Y, Ye L, Shi R, Peng L, et al. Cytokine network imbalance in children with B-cell acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Cytokine*. 2023 Sep 1;169:156267.
80. Du SX, Jia YR, Tang H, Sun YL, Wu WS, Sun LM, et al. Immune regulation of hydrogen sulfide in children with acute lymphoblastic leukemia. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(21):3695–9.
81. Bhattacharya K, Chandra S, Mandal C. Critical stoichiometric ratio of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells and CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> responder T cells influence immunosuppression in patients with B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Immunology* [Internet]. 2014 May 1 [cited 2024 Feb 18];142(1):124–39. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/imm.12237>
82. Magalhães-Gama F, Kerr MWA, De Araújo ND, Ibiapina HNS, Neves JCF,

- Hanna FSA, et al. Imbalance of Chemokines and Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment of Children with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Oncol*. 2021;2021.
83. Silva FS, Barros-Lima A, Souza-Barros M, Crespo-Neto JA, Santos VGR, Pereira DS, et al. A dual-role for IL-10: From leukemogenesis to the tumor progression in acute lymphoblastic leukemia. *Cytokine*. 2023 Nov 1;171:156371.
  84. Saraiva M, Saraiva M, Vieira P, Vieira P, Vieira P, O'Garra A, et al. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*. 2020;217(1):1–19.
  85. Hagenbaugh A, Sharma S, Dubinett SM, Wei SHY, Aranda R, Cheroutre H, et al. Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. *J Exp Med*. 1997;185(12):2101–10.
  86. Mannino MH, Zhu Z, Xiao H, Bai Q, Wakefield MR, Fang Y. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett [Internet]*. 2015;367(2):103–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.07.009>
  87. Winkler B, Taschik J, Haubitz I, Eyrich M, Schlegel PG, Wiegering V. TGF $\beta$  and IL10 have an impact on risk group and prognosis in childhood ALL. *Pediatr Blood Cancer [Internet]*. 2015 Jan 1 [cited 2022 Oct 1];62(1):72–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263239/>
  88. Studies O. The single nucleotide polymorphisms of interleukin-10 are associated with the risk of leukaemia. 10:1–10.
  89. Rivas JR, Liu Y, Alhakeem SS, Eckenrode JM, Marti F, Collard JP, et al. Interleukin-10 suppression enhances T-cell antitumor immunity and responses to checkpoint blockade in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia [Internet]*. 2021 Nov 1 [cited 2022 Oct 1];35(11):3188. Available from: </pmc/articles/PMC8446094/>
  90. Alhakeem SS, McKenna MK, Oben KZ, Noothi SK, Rivas JR, Hildebrandt GC, et al. Chronic lymphocytic leukemia derived interleukin-10 suppresses anti-tumor immunity. *J Immunol [Internet]*. 2018 Jun 6 [cited 2022 Oct 1];200(12):4180. Available from: </pmc/articles/PMC6555426/>
  91. Chen N, Xu Y, Mou J, Rao Q, Xing H, Tian Z, et al. Targeting of IL-10R on acute myeloid leukemia blasts with chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Blood Cancer J [Internet]*. 2021 Aug 1 [cited 2022 Oct 1];11(8). Available from: </pmc/articles/PMC8364556/>
  92. Zhang K, Li X, Huang R, Chen C, Hu W. IL-10 as an Indicator for Predicting

- Clinical Progression in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. Clin Lab [Internet]. 2021 [cited 2022 Oct 1];67(10):2261–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34655194/>
93. Fitch BA, Zhou M, Situ J, Surianarayanan S, Reeves MQ, Hermiston ML, et al. Decreased IL-10 accelerates B-cell leukemia/lymphoma in a mouse model of pediatric lymphoid leukemia. Blood Adv [Internet]. 2022 Feb 2 [cited 2022 Oct 1];6(3):854. Available from: </pmc/articles/PMC8945291/>
  94. Sánchez-Rivera FJ, Diaz BJ, Kasthuber ER, Schmidt H, Katti A, Kennedy M, et al. Base editing sensor libraries for high-throughput engineering and functional analysis of cancer-associated single nucleotide variants. Nat Biotechnol [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2022 Oct 1];40(6):862. Available from: </pmc/articles/PMC9232935/>
  95. Liu RT, Wang XX, Sun JR, Gao N, Yu WZ. Correlations of IL-6 and IL-10 gene polymorphisms with childhood acute lymphoblastic leukemia. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2020;24(15):8048–56.
  96. Kim M, Kim J, Kim JR, Han E, Park J, Lim J, et al. FLT3 expression and IL10 promoter polymorphism in acute myeloid leukemia with RUNX1-RUNX1T1. Mol Biol Rep. 2015;42(2):451–6.
  97. Ghufran H, Riaz S, Mahmood N, Yaqoob M, Shahid S, Bhinder MA, et al. Polymorphism of Interleukin-10 ( IL-10 , -1082 G / A ) and Interleukin- 28B ( IL-28B , C / T ) in pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia ( ALL ). 2019;32(5):2357–61.
  98. Zhu ZY, Liu J Bin, Liu X, Qian LX. Association of interleukin 10 rs1800896 polymorphism with susceptibility to breast cancer: a meta-analysis. J Int Med Res. 2020;48(4).
  99. Dai Z-M, He A-L, Zhang W-G, Liu J, Cao X-M, Chen Y-X, et al. Association of the four common polymorphisms in interleukin-10 (rs1800890, rs1800896, rs1800871, and rs1800872) with non-Hodgkin's lymphoma risk: a meta-analysis. Int J Clin Exp Med [Internet]. 2014 [cited 2022 Oct 1];7(12):4720. Available from: </pmc/articles/PMC4307416/>
  100. NAMAZI A, FORAT-YAZDI M, JAFARI M, FARAHNAK S, NASIRI R, FOROUGHI E, et al. Association of Interleukin-10 -1082 a/G (Rs1800896) Polymorphism With Susceptibility To Gastric Cancer: Meta-Analysis of 6,101 Cases and 8,557 Controls. Arq Gastroenterol. 2018;55(1):33–40.

101. Mohammadi S, Saghaeian Jazi M, Zare Ebrahimabad M, Eghbalpour F, Abdolahi N, Tabarraei A, et al. Interleukin 10 gene promoter polymorphisms (rs1800896, rs1800871 and rs1800872) and haplotypes are associated with the activity of systemic lupus erythematosus and IL10 levels in an Iranian population. *Int J Immunogenet*. 2019;46(1):20–30.
102. Hong P, Feng WY, Fu LH, Jin J, Fu JP. Associations between genetic polymorphisms in interleukin-10 and hematological oncology: evidence from a meta-analysis. <https://doi.org/10.1080/1538404720191702404> [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2022 Oct 1];21(4):372–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15384047.2019.1702404>
103. Palivonaite M, Gedvilaite G, Glebauskiene B, Kriauciuniene L, Rovite V, Liutkeviciene R. IL-10 Gene Rs1800871, Rs1800872, and Rs1800896 Polymorphisms and IL-10 Serum Levels Association with Pituitary Adenoma. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2024 Feb 20];10(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36009467/>
104. Ting WC, Chen LM, Huang LC, Hour MJ, Lan YH, Lee HZ, et al. Impact of Interleukin-10 Gene Polymorphisms on Survival in Patients with Colorectal Cancer. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2013 Sep 1 [cited 2024 Jan 8];28(9):1302–6. Available from: <https://doi.org/10.3346/jkms.2013.28.9.1302>
105. Rong K, Lang Y, Zhou Y, Ni L, Wang L, Wang L, et al. Risk Genetic Variants ( IL-10) for Osteoporosis in Han Population from Northwest China. *J Inflamm Res* [Internet]. 2023 [cited 2024 Feb 20];16:1091–102. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36941985/>
106. 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*. 2016;127(20):2391–405.
107. Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez-Bello J. Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2017 Jan 1;74(1):13–26.
108. Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wunsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2024 Jul 16];24(6):801. Available from: </pmc/articles/PMC3106125/>

109. Abdalhabib EK, Alzahrani B, Saboor M, Hamza A, Elfaki EM, Alanazi F, et al. IL-10 rs1800896 Polymorphism: A Risk Factor for Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pharmgenomics Pers Med* [Internet]. 2022 [cited 2024 Jan 25];15:809–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36119849/>
110. Azevedo-Silva F, Reis R de S, de Oliveira Santos M, Luiz RR, Pombo-de-Oliveira MS. Evaluation of childhood acute leukemia incidence and underreporting in Brazil by capture-recapture methodology. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2024 Feb 18];33(6):403–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19833572/>
111. Barbosa SF da C, Costa CA da, Ferreira L de SC, Almeida D de S, Azevedo TC de B, Lemos JAR de, et al. Aspectos epidemiológicos dos casos de leucemia e linfomas em jovens e adultos atendidos em hospital de referência para câncer em Belém, Estado do Pará, Amazônia, Brasil. *Rev Pan-Amazônica Saúde* [Internet]. 2015 Sep [cited 2024 Feb 18];6(3):43–50. Available from: [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232015000300043&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232015000300043&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
112. Pombo-de-Oliveira MS, Cordoba JC, Alencar DM, Campos MM, Carriço K, Dobbin J, et al. Biological diversity variations of pediatric acute leukemia in Brazil: contribution of immunophenotypic profiles to epidemiological studies. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2005 Mar [cited 2024 Feb 18];27(1):21–6. Available from: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/WyhGkbXJBt6jJfLNMRqyXBS/?lang=en>
113. Alves FS, Xabregas LA, Kerr MWA, Souza GL, Pereira DS, Magalhães-Gama F, et al. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2024 Feb 18];11(1):9869. Available from: </pmc/articles/PMC8110953/>
114. Bonilha TA, Obadia DDA, Valveson AC, Land MGP. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in a single center in Brazil: A survival analysis study. *Cancer Rep* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2024 Feb 18];5(1). Available from: </pmc/articles/PMC8789616/>
115. Greaves M. Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2006 Mar [cited 2024 Feb 18];6(3):193–203. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16467884/>

116. Abdelmabood S, Fouda AE, Boujettif F, Mansour A. Desfechos do tratamento de crianças com leucemia linfoblástica aguda em um país em desenvolvimento de renda média: altas taxas de mortalidade, recidivas precoces e baixa sobrevida. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2020 Mar 2 [cited 2024 Feb 18];96(1):108–16. Available from: <https://www.scielo.br/j/jped/a/zfvDgJLFVrVqPM9Dy6BQwqh/?lang=pt>
117. Lauten M, Matthias T, Stanulla M, Beger C, Welte K, Schrappe M. Association of initial response to prednisone treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia and polymorphisms within the tumour necrosis factor and the interleukin-10 genes. *Leukemia* [Internet]. 2002 [cited 2023 Mar 28];16(8):1437–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12145682/>
118. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson I V. AN INVESTIGATION OF POLYMORPHISM IN THE INTERLEUKIN-10 GENE PROMOTER. *Eur J Immunogenet* [Internet]. 1997 Feb 1 [cited 2024 Jul 16];24(1):1–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2370.1997.tb00001.x>
119. Das AP, Saini S, Agarwal SM. A comprehensive meta-analysis of non-coding polymorphisms associated with precancerous lesions and cervical cancer. *Genomics*. 2022 May 1;114(3):110323.
120. Li M, Yue C, Zuo X, Jin G, Wang G, Guo H, et al. The effect of interleukin 10 polymorphisms on breast cancer susceptibility in Han women in Shaanxi Province. *PLoS One* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2024 Feb 20];15(5):e0232174. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0232174>
121. OPAS. DeCS [Internet]. Biblioteca Virtual em Saúde. 2016 [cited 2024 Jan 16]. Available from: [https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=51016&filter=ths\\_termall&q=Fator de Transcrição Sp3](https://decs.bvsalud.org/ths/resource/?id=51016&filter=ths_termall&q=Fator de Transcrição Sp3)
122. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2024 Jul 16];136(9):1093–111. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28497172/>
123. Antonellis A, Dennis MY, Burzynski G, Huynh J, Maduro V, Hodonsky CJ, et al. A Rare Myelin Protein Zero (MPZ) Variant Alters Enhancer Activity In Vitro

- and In Vivo. PLoS One [Internet]. 2010 [cited 2024 Jul 16];5(12):e14346. Available from:  
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0014346>
124. Im SH, Hueber A, Monticelli S, Kang KH, Rao A. Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells. J Biol Chem [Internet]. 2004 Nov 5 [cited 2024 Jan 16];279(45):46818–25. Available from:  
<http://www.jbc.org/article/S0021925820698982/fulltext>
  125. Gorby C, Bellón JS, Wilmes S, Warda W, Pohler E, Fyfe PK, et al. Engineered il-10 variants elicit potent immunomodulatory effects at low ligand doses. Sci Signal [Internet]. 2020 Sep 15 [cited 2024 Jul 4];13(649):653. Available from:  
<https://www.science.org/doi/10.1126/scisignal.abc0653>
  126. Hiroki CH, Amarante MK, Petenuci DL, Sakaguchi AY, Trigo FC, Watanabe MAE, et al. IL-10 gene polymorphism and influence of chemotherapy on cytokine plasma levels in childhood acute lymphoblastic leukemia patients IL-10 polymorphism and plasma levels in leukemia patients. Blood Cells, Mol Dis [Internet]. 2015;55(2):168–72. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmd.2015.06.004>
  127. Drabko K, Bojarska-Junak A, Kowalczyk JR. Serum concentration of IL-2, IL-4, IL-10 and TNF- $\alpha$  in children with acute lymphoblastic leukemia – possible role of oxidative stress. Cent Eur J of Immunology. 2008;33(3):146–9.
  128. Bien E, Balcerska A, Adamkiewicz-Drozynska E, Rapala M, Krawczyk M, Stepinski J. Pre-treatment serum levels of interleukin-10, interleukin-12 and their ratio predict response to therapy and probability of event-free and overall survival in childhood soft tissue sarcomas, Hodgkin’s lymphomas and acute lymphoblastic leukemias. Clin Biochem [Internet]. 2009 Jul [cited 2024 Feb 18];42(10–11):1144–57. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19376105/>
  129. Inagaki A, Ishida T, Ishii T, Komatsu H, Iida S, Ding J, et al. Clinical significance of serum Th1-, Th2- and regulatory T cells-associated cytokines in adult T-cell leukemia/lymphoma: High interleukin-5 and -10 levels are significant unfavorable prognostic factors. Int J Cancer [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2024 Feb 18];118(12):3054–61. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ijc.21688>
  130. Kerr MWA, Magalhães-Gama F, Ibiapina HNS, Hanna FSA, Xabregas LA,

Alves EB, et al. Bone Marrow Soluble Immunological Mediators as Clinical Prognosis Biomarkers in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Undergoing Induction Therapy. *Front Oncol.* 2021 Sep 27;11:3631.

## ANEXO

## ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP-HEMOAM

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



**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

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



Continuação do Parecer: 4.982.395

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1814155.pdf	30/08/2021 09:34:31		Aceito
Outros	Outros_Parecer_CEP_Amostras_Retrospectivas.pdf	30/08/2021 09:32:31	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Termo_De_Compromisso_Para_Utilizacao_de_Dados_E_Prontuarios.pdf	30/08/2021 09:29:44	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Garantia_de_Retorno_e_Benefícios aos Participante.pdf	30/08/2021 09:28:43	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Garantia_de_ressarcimento aos participantes.pdf	30/08/2021 09:28:12	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Declaracao_de_Sigilo_e_Patentes.pdf	30/08/2021 09:27:26	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Declaracao_de_Compromisso do Pesquisador.pdf	30/08/2021 09:26:56	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Outros	Outros_Carta_de_Anuencia_Amostras_LabHLA.pdf	30/08/2021 09:26:37	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_HEMOAM.pdf	30/08/2021 09:25:54	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LLA_Responsaveis.pdf	30/08/2021 09:24:13	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_LLA_Paciente.pdf	30/08/2021 09:24:06	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LLA_13_a_17anos.pdf	30/08/2021 09:23:55	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_LLA_06_a_12_anos.pdf	30/08/2021 09:23:46	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado_Brochura_do_Investigador_Biomarcadores.pdf	30/08/2021 09:14:33	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	30/08/2021 09:13:48	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_pesquisadores.pdf	30/08/2021 09:12:40	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_Instituicao_e_Infraestrutura_HEMOAM.pdf	30/08/2021 09:05:20	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Declaração de	Declaracao_de_Instituicao_e_Infraestr	30/08/2021	Allyson Guimarães da Costa	Aceito

**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

Instituição e Infraestrutura	utura_coparticipante_FIOCRUZ_Minas.pdf	09:05:04	da Costa	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	30/08/2021 08:57:08	Allyson Guimarães da Costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	30/08/2021 08:56:55	Allyson Guimarães da Costa	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

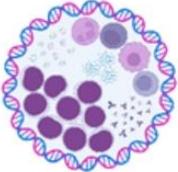
MANAUS, 17 de Setembro de 2021

---

**Assinado por:**  
**SONIA REJANE DE SENNA FRANTZ**  
**(Coordenador(a))**

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

## ANEXO II – Protocolo de Extração

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 BCM-LLA	<b>AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</b>	
	<b>EXTRAÇÃO DE DNA</b>	<b>Nº POP: 01</b>

### 1. OBJETIVO

Isolar o DNA a partir de células mononucleares do Sangue Periférico.

### 2. RESPONSABILIDADE PELA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO

Alunos de Mestrado, Doutorado e Alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM – LLA.

### 3. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

- 3.1. Definir o banho-maria ou bloco de aquecimento a 55°C.
- 3.2. Organizar os materiais em ordem e com as identificações necessárias.

### 4. PROCEDIMENTOS INICIAIS PARA A LISE DAS CÉLULAS

- 4.1. Adicionar 20 ul de Proteinase K a um tubo de microcentrifuga estéril (1,5 ml).
- 4.2. Transferir 200 ul de sangue total para o tubo contendo Proteinase K.
- 4.3. Adicionar 20 ul de RNase A à amostra.
- 4.4. Agitar em vórtex breve e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.
- 4.5. Adicionar 200 ul de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer e misture bem por vórtex para obter uma solução homogênea.
- 4.6. Incubar a 55°C por 10 minutos para promover a digestão de proteínas.
- 4.7. Adicionar 200 ul de etanol 96-100% ao lisado. Agitar bem por vórtex para produzir uma solução homogênea.

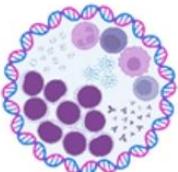
### 5. PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO

- 5.1. Remover da embalagem uma coluna PureLink™ Spin em um tubo de coleta e transfira o lisado (+/-640 ul) para coluna Spin.
- 5.2. Centrifugar a coluna a 10.000 x g (13.500 rpm) por 1 minuto em temperatura ambiente (24°C), em seguida descartar o líquido do tubo de coleta.
- 5.3. Centrifugar novamente a coluna a 10.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente (24°C). Descarte o tubo de coleta e coloque a coluna Spin em um novo tubo de coleta.

- 5.4. Adicionar 500 ul de Wash Buffer 1 preparado com etanol à coluna e centrifugue a 10.000 x g por 1 minuto em temperatura ambiente (24°C). Descartar o tubo de coleta e colocar a coluna giratória em um novo tubo de coleta.
- 5.5. Adicionar 500 ul de Wash Buffer 2 preparado com etanol à coluna.
- 5.6. Centrifugar a coluna à velocidade máxima durante 3 minutos à temperatura ambiente (24°C). Descartar o tubo coletor.
- 5.7. Coloque a coluna Spin em um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 ml.
- 5.8. Deixar em temperatura ambiente (24°C) por 2 minutos para evaporar o álcool residual e adicionar 30ul de PureLink™ Genomic Elution Buffer à coluna.
- 5.9. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto. Centrifugar a coluna à velocidade máxima durante 2 minutos à temperatura ambiente o tubo contém DNA genômico purificado. Remova e descarte a coluna.
- 5.10. Use o DNA para a aplicação posterior desejada ou armazene o DNA purificado a 4°C (curto prazo) ou - 20°C (longo prazo).

**Obs: Após centrifugar, quantificar a amostra utilizando o aparelho Nanodrop 2000/2000c.**

## ANEXO III – Protocolo de Genotipagem

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 BCM-LLA	<b>AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</b>	
	<b>GENOTIPAGEM TAQMAN</b>	<b>Nº POP: 02</b>

### 1. OBJETIVO

Determinar o genótipo de polimorfismos de base única (*SNPs*) em amostra de DNA genômico humano através de ensaio alelo específico comercial de tipo *Taqman* (*Applied Biosystems*) e PCR em tempo real.

### 2. RESPONSABILIDADE

2.1 Alunos de Mestrado e Doutorado (Biomédicos, Enfermeiros, Farmacêuticos-bioquímicos), e alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM-LLA.

### 3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

- 3.1. Antes de iniciar o procedimento, na antessala de paramentação do LABGEN 1, o executor deverá colocar os EPIs adequados como jaleco com gorro, máscara, estar usando **sapato fechado** adequado e ainda deverá envolver os sapatos em propé.
- 3.2. Limpar a área de trabalho com álcool a 70%.
- 3.3. Utilizar tubos de polipropileno (microtubos) de 1,5 mL que sofreram ação da U.V no fluxo laminar para o preparo do Mix.
- 3.4. Utilizar placa de 96 poços com lacre adesivo que sofreram ação da UV no fluxo laminar.

### 4. 1º ETAPA – PREPARO DO MIX

- 4.1. Retirar os reagentes necessários pela amplificação do frizer (-20°C) e colocar no gelo durante a manipulação;
- 4.2. No Fluxo Laminar previamente limpo – preparar a solução de reação em microtubo de 1.5mL estéril de acordo com as instruções. A solução deve ser preparada apenas para o número de amostras a ser amplificados, pois não pode ser armazenada;

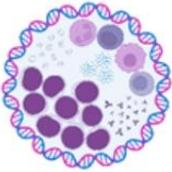
- 4.3. Pegar uma placa de 96 poços específica para genotipagem e colocar no suporte para placa ou sob um papel soalha para evitar que o fundo da placa arranhe;
- 4.4. Distribuir 8 µL/poço da solução de reação (Master Mix, Água DNA/RNase free, sonda específica) com pipeta p-10 (ponteira 1-10µL) ou p-20 (ponteira 2-200 µL) na placa de 96-poços adequada para o equipamento de amplificação a ser utilizado.  
**ATENÇÃO:** utilização de uma placa não adequada ao equipamento de PCR pode resultar na quebra do equipamento!

## 5. 2º ETAPA – ADIÇÃO DA AMOSTRA

- 5.1. Retirar as amostras de DNA genômico do freezer (-80°C) e centrifugar rapidamente (spin: segurar o botão SHORT por 12”).
- 5.2. Adicionar a amostra de DNA genômico – anteriormente centrifugado (Spin) - (segundo necessidade) a placa de reação.  
**ATENÇÃO:** verificar sempre a presença do volume antes de transferir o DNA!  
**Descartar SEMPRE as ponteiras a cada nova amostra a ser transferida!**
- 5.3. Cobrir a placa de reação com adesivo óptico para PCR em tempo real, sem tocar da parte adesiva.  
**ATENÇÃO:** utilização de um adesivo não óptico impossibilita a leitura do equipamento de PCR em tempo real! Verificar que não estejam presentes bolhas de ar entre o adesivo e a placa pois as bolhas podem interferir com a leitura do equipamento.
- 5.4. Centrifugar rapidamente (spin: segurar o botão SHORT por 12”) a placa de reação na centrifuga com o rotor apropriado para rodar placas e utilizar outra placa com o mesmo peso para balancear a centrífuga.  
**ATENÇÃO:** Ao retirar as luvas para utilizar a centrifuga lembre de não encostar no adesivo óptico da placa de reação! A placa deve ser manipulada apenas pelos lados.
- 5.5. Levar a placa de reação ao aparelho PCR em tempo real adequado.  
**ATENÇÃO:** eventualmente a placa pode ser armazenada no escuro (papel alumínio) a 4°C para amplificação entre 2-4 horas ou a -20 para amplificação no dia seguinte.
- 5.6. Limpar a área de trabalho e as pipetas com etanol 70%.
- 5.7. Deixar as pipetas no valor máximo para evitar sua descalibração.
- 5.8. Ao final do preparo das amostras, ligar a UV para a esterilização dos fluxos.

Reagentes	Quantidade para:	
	1 amostra	1 placa de 96 poços*
<b>Master Mix (20x)</b>	5,0 µL	480 µL
<b>H2O</b>	1,75 µL	168 µL
<b>SONDA</b>	0.25 µL	24 µL
<b>TOTAL</b>	7.0 µL	672 µL

## ANEXO IV – Protocolo de *Cytometric Bead Array* - CBA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 BCM-LLA	<b>AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</b>	
	<b>CYTOMETRIC BEAD ARRAY (CBA)</b>	<b>Nº POP: 03</b>

### 1. OBJETIVO

Quantificação de moléculas solúveis através do uso de microesferas sintéticas (BEADS) recobertas por anticorpos específicos para a captura das moléculas escolhidas.

### 2. RESPONSABILIDADE PELA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO

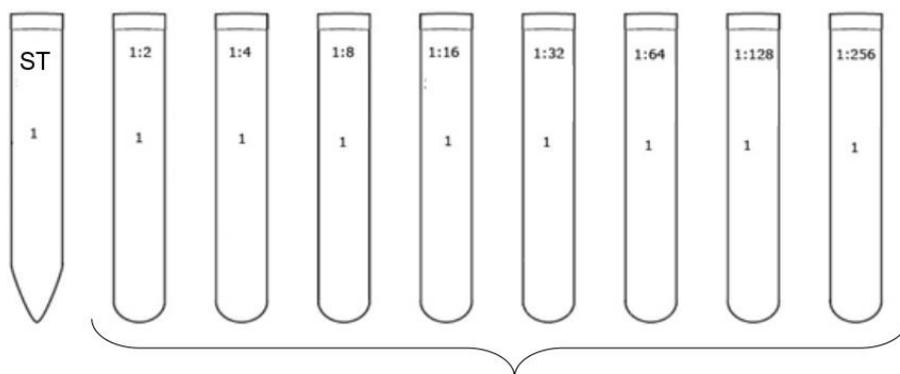
Alunos de Mestrado, Doutorado envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM – LLA.

### 3. CONSIDERAÇÕES NECESSÁRIAS PARA EXECUÇÃO DO PROCEDIMENTO:

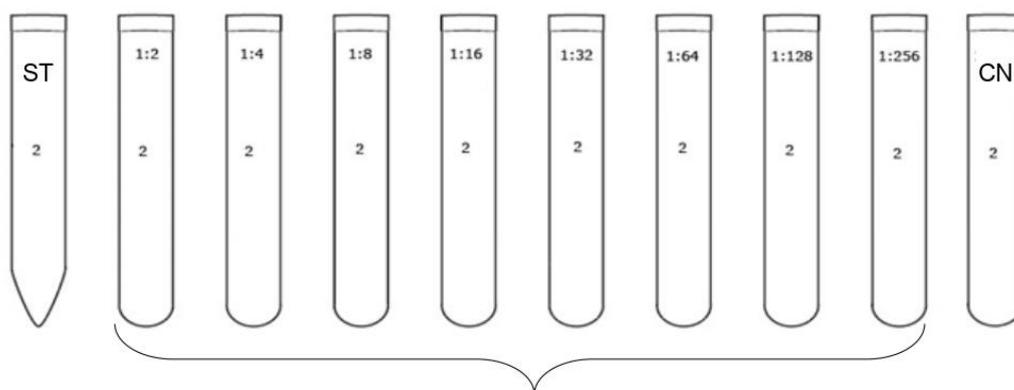
- 3.1. Definir a quantidade de amostras a serem utilizadas.
- 3.2. Organizar os materiais e identificá-los adequadamente no **dia anterior** ao experimento.
  - 3.2.1. Separar as amostras em alíquotas menores de 100µL em microtubos de 1,5mL;
 

**OBS:** Descongelar em banho maria (37°C) e centrifugar por 10min. a 14.000rpm. Retirar o sobrenadante e transferir para microtubos de 1,5mL. É importante utilizar o fluxo laminar para não contaminar as amostras.
  - 3.2.2. Identificar os tubos de citometria em números sequenciais de acordo com a quantidade de amostras para facilitar o procedimento (ex: 1, 2, 3, 4, 5,...);
  - 3.2.3. Identificar um tubo de citometria para o controle negativo com a sigla “CN”;
  - 3.2.4. Identificar um tubo falcon para o pool de BEADS (citocinas) com a sigla “ST”;
  - 3.2.5. Identificar 16 tubos de citometria para a diluição da curva padrão. Os devem ser divididos em 2.

OBS: 8 tubos devem ser identificados com o número 1 e sua respectiva concentração e diluição (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) e 8 tubos devem ser identificados com o número 2 e sua respectiva concentração e diluição (semelhante à curva 1), conforme o exemplo abaixo:



Diluição seriada da curva padrão (1)

Pool de  
citocinas

Diluição seriada da curva padrão (2)

Controle  
Negativo

3.2.6. Armazenar todos os tubos ordenadamente em estantes e protegidos de poeira.

**OBS:** O Kit faz aproximadamente 200 testes (180 amostras e 2 curvas de calibração). É possível dividir o Kit em dois, realizando 2 experimentos com 90 amostras cada.

#### 4. CÁLCULO PARA O POOL DE BEADS

4.1. Calcular a quantidade de BEADs, conforme o exemplo:

Experimento com 68 amostras:

Tubos utilizados:

**68** – Amostras

**16** – Curva padrão

**01** – Controle negativo

Total: 85 tubos

Cálculo: 85 tubos x 25 (quantidade para cada tubo) = 2.125

2.125/ 7 (número de BEADs a serem utilizadas) = 305µL de cada BEAD.

## 5. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E REAGENTES “G” E “F”.

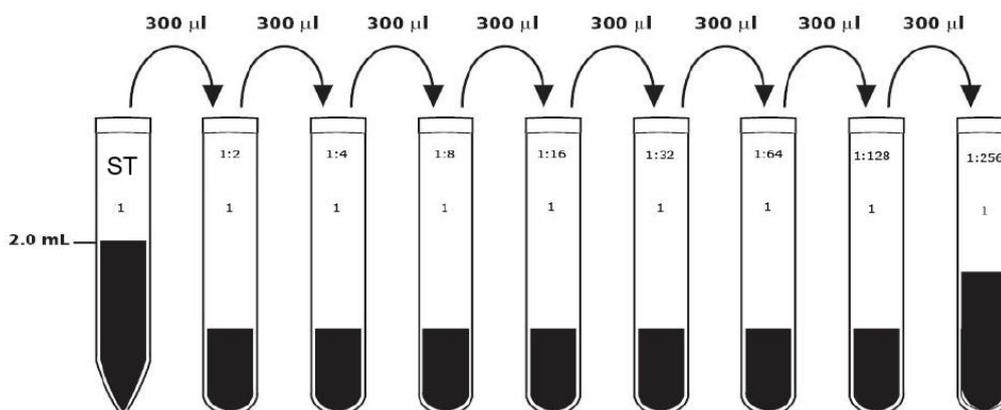
- 5.1. Descongelar as amostras em banho maria (37°C);
- 5.2. Centrifugar por 10 minutos a 14.000rpm (O mesmo procedimento deve ser realizado caso seja necessário diluir as amostras. Para isso, deve-se utilizar o reagente **G do KIT**);
- 5.3. Separar os tubos identificados e separar pipetas, ponteiros e descartes para dar início ao experimento.

## 6. PREPARAÇÃO DOS PADRÕES

- 6.1. Reconstituir o padrão 15 minutos antes de começar o experimento;
- 6.2. O frasco com as citocinas deve ser reconstituído com 2,0mL do REAGENTE G;
- 6.3. Após abrir o frasco, acrescentar 1.000µL do REAGENTE G e agitar lentamente com movimentos circulares por um 1 minuto;
- 6.4. Acrescentar mais 1.000 µL do REAGENTE G e continuar agitando suavemente por aproximadamente 15 minutos para solubilizar bem;

**OBS: JAMAIS vortexar o padrão ou agitar fortemente.**

- 6.5. Adicionar 300µL do REAGENTE G em cada tubo da curva de diluição “1” exceto no tubo ST que está com o padrão. Fazer as diluições sucessivas conforme exemplo abaixo:



- 6.6. No tubo CN adicionar apenas o REAGENTE G.

## 7. PREPARAÇÃO DO POOL DE BEADs

7.1. Adicionar o volume calculado de cada BEAD (ex: 305µL). Reagentes A1 – A7 do kit, no Tubo “BD”.

**OBS: Vortexar bem as BEADS a cada vez que for utilizá-las.**

7.2. Adicionar 25µL do pool de BEADS para cada tubo de amostra, curva de diluição “2” e controle negativo.

## 8. EXECUÇÃO DAS REAÇÕES

8.1. Adicionar 25µL do pool de BEADS em cada tubo da curva de diluição “2”. Não esquecer de vortexar as BEADS de tempo em tempo;

8.2. Adicionar 25µL do pool de BEADS em todos os tubos das amostras e no tubo CN, sempre vortexando as BEADS;

8.3. Adicionar 25µL do padrão dos tubos da curva de diluição “1” nos tubos da curva de diluição “2”. Colocar respeitando as respectivas diluições;

8.4. Adicionar 25µL de amostra nos seus respectivos tubos. É importante pegar somente o sobrenadante dos tubos;

8.5. Adicionar 25µL do REAGENTE G no tubo CN;

8.6. Adicionar 25µL das amostras em seus respectivos tubos;

8.7. Adicionar 25µL do REAGENTE “B” nos tubos da curva de diluição “2”, amostras e CN;

8.8. Vortexar todos os tubos;

8.9. Incubar por 3h em temperatura ambiente e ao abrigo da luz;

8.10. Após incubação, adicionar 1.000µL do PBS (Kit) em cada tubo;

8.11. Vortexar todos os tubos;

8.12. Centrifugar os tubos por 5 min. a 1.500 rpm, 18°C;

8.13. Desprezar o sobrenadante invertendo cuidadosamente todos os tubos;

8.14. Resuspender com 100uL de PBS (Kit);

8.15. Fazer o tubo de SETAP, 200uL de reagente “D” mais 600uL de PBS (Kit);

8.16. Vortexar todos os tubos e prosseguir para a leitura no citômetro.

## 9. AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS E PADRÕES NO CITÔMETRO

9.1. Criar 2 pastas: “Standard” e “Samples”. Pode adquirir todas as amostras em uma única pasta e depois separar as 10 primeiras para a pasta Standard e o restante para a Samples;

9.2. Abrir o *Template* de aquisição do CBA;

9.3. Conectar o citômetro e acionar os parâmetros do instrumento determinado após calibração do aparelho. Certificar que no item “*Aquisition and Storage*” a resolução do canal está em 1024;

9.4. Ajustar o número de eventos a serem contados para 2.100 em R1 (300 beads de cada analito);

- 9.5. Adicionar o nome do arquivo no item *FILE* com caracteres alfa-numéricos. O nome do arquivo deve conter as iniciais de quem está fazendo o experimento e data do dia do procedimento (ex: JP02052008.001)
- 9.6. Identificar os padrões e amostras no item *SAMPLE ID* (ex: Padrões: CN; 1:256; 1:128, etc. Amostras: 01, 02, 03, etc).
- 9.7. Assegurar que a *gate* R1 está delimitando todas as beads.
- 9.8. Acionar a velocidade *High*;
- 9.9. Iniciar a leitura com o tubo CN e depois em ordem crescente de concentração dos padrões, ou seja, ler da maior diluição para a menor até o tubo ST.

## ANEXO V– Produção Científica (Artigos)

**V-I:** Association of Toll-like receptors polymorphisms with the risk of acute lymphoblastic leukemia in the Brazilian Amazon (doi: 10.1038/s41598-022-19130-7)

www.nature.com/scientificreports

# scientific reports



OPEN

## Association of Toll-like receptors polymorphisms with the risk of acute lymphoblastic leukemia in the Brazilian Amazon

Lilyane Amorim Xabregas<sup>1,2</sup>, Fabíola Silva Alves Hanna<sup>1,2,3</sup>, Fábio Magalhães-Gama<sup>3,4</sup>, Gláucia Lima Souza<sup>1,2</sup>, Daniele Sá Pereira<sup>1,2</sup>, Amanda Barros de Lima<sup>2,3</sup>, Diana Mota Toro<sup>3</sup>, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago<sup>1,2</sup>, Leny Nascimento da Motta Passos<sup>1,2</sup>, Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2,5</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,3,5</sup> & Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>✉

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematologic malignancy in children in childhood. Single-nucleotide polymorphism (SNPs) in key molecules of the immune system, such as Toll-like receptors (TLRs) and CD14 molecules, are associated with the development of several diseases. However, their role in ALL is unknown. A case-control study was performed with 152 ALL patients and 187 healthy individuals to investigate the role of SNPs in TLRs and the CD14 gene in ALL. In this study, *TLR6 C > T rs5743810* [OR: 3.20, 95% CI: 1.11–9.17,  $p=0.003$ ] and *TLR9 C > T rs187084* (OR: 2.29, 95% CI: 1.23–4.26,  $p=0.000$ ) seems to be a risk for development of ALL. In addition, the *TLR1 T > G rs5743618* and *TLR6 C > T rs5743810* polymorphisms with protection against death (OR: 0.17, 95% IC: 0.04–0.79,  $p=0.008$ ; OR: 0.48, 95% IC: 0.24–0.94,  $p=0.031$ , respectively). Our results show that SNPs in TLRs genes may be involved in the pathogenesis of ALL and may influence clinical prognosis; however, further studies are necessary to elucidate the role of *TLR1*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR9* and *CD14* polymorphisms in this disease.

Leukemia (acute and chronic) represents the 10th most frequent cause of cancer worldwide<sup>1</sup>. In Brazil, for the triennium 2020–2022, approximately 10,810 new cases in women and men are expected and approximately 300 new cases in North region of Brazil, where leukemia (acute and chronic) is the fifth most frequent cancer<sup>2,3</sup>. The most common type of leukemia in childhood is acute lymphoblastic leukemia (ALL) with a prevalence up to 25% of cancers in children who are under the age of 15 years<sup>4</sup>.

The neoplastic process results from genetic errors that contribute to blocking cell maturation and accumulation of leukemic clones (blasts) in the bone marrow microenvironment. Its etiology is still unknown; however, some risk factors are associated, including environmental, genetic and infectious factors<sup>5,6</sup>. Evidence from previous studies suggests that ALL is related to a deficit in immune system regulation in early childhood<sup>7–12</sup>. Furthermore, it is suggested that polymorphisms or genetic variations in the genes of molecules that are important in the development and progression of diseases may be important factors in the increase of intrinsic biological differences, influencing clinically distinct results and conferring genetic susceptibility to cancer<sup>13,14</sup>.

Toll-like receptors make up the main family of pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune system, and are involved in fighting pathogens and inflammation, and recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), which thus modulates the immune response via the activation of cells that mediate the immune response. In addition, TLRs are vital molecules

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM 69050-001, Brazil. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil. <sup>5</sup>Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>7</sup>Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil. ✉email: allyson.gui.costa@gmail.com

## V-II: Insights Regarding the Role of Inflammasomes in Leukemia: What Do We Know? (doi: 10.1155/2023/5584492)

Hindawi  
Journal of Immunology Research  
Volume 2023, Article ID 5584492, 15 pages  
<https://doi.org/10.1155/2023/5584492>



### Review Article

## Insights Regarding the Role of Inflammasomes in Leukemia: What Do We Know?

Fábiola Silva Alves-Hanna <sup>1,2</sup>, Juniel Assis Crespo-Neto <sup>2</sup>, Glenda Menezes Nogueira <sup>2,3</sup>,  
Daniele Sá Pereira <sup>2,3</sup>, Amanda Barros Lima <sup>1,2</sup>, Thaís Lohana Pereira Ribeiro <sup>2,3</sup>,  
Vitória Giovanna Rodrigues Santos <sup>2</sup>, Joey Ramone Ferreira Fonseca <sup>2</sup>,  
Fábio Magalhães-Gama <sup>2,4</sup>, Aya Sadahiro <sup>1</sup> and Allyson Guimarães Costa <sup>1,2,3,4,5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

<sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-Minas), Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>5</sup>Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

Correspondence should be addressed to Allyson Guimarães Costa; [allyson.gui.costa@gmail.com](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com)

Received 28 April 2023; Revised 2 July 2023; Accepted 10 July 2023; Published 4 August 2023

Academic Editor: Lele Zhu

Copyright © 2023 Fábiola Silva Alves-Hanna et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Inflammation is a physiological mechanism of the immune response and has an important role in maintaining the hematopoietic cell niche in the bone marrow. During this process, the participation of molecules produced by innate immunity cells in response to a variety of pathogen-associated molecular patterns and damage-associated molecular patterns is observed. However, chronic inflammation is intrinsically associated with leukemogenesis, as it induces DNA damage in hematopoietic stem cells and contributes to the creation of the preleukemic clone. Several factors influence the malignant transformation within the hematopoietic microenvironment, with inflammasomes having a crucial role in this process, in addition to acting in the regulation of hematopoiesis and its homeostasis. Inflammasomes are intracellular multimeric complexes responsible for the maturation and secretion of the proinflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 and the cell death process via pyroptosis. Therefore, dysregulation of the activation of these complexes may be a factor in triggering several diseases, including leukemias, and this has been the subject of several studies in the area. In this review, we summarized the current knowledge on the relationship between inflammation and leukemogenesis, in particular, the role of inflammasomes in different types of leukemias, and we describe the potential therapeutic targets directed at inflammasomes in the leukemic context.

### 1. Introduction

Leukemias are a heterogeneous group of neoplasms with a broad clinical spectrum that is characterized by the impairment of a hematopoietic stem cell (HSC) and the blockage of differentiation at various stages of the maturation process, which are divided into acute myeloblastic leukemia (AML), chronic myeloblastic leukemia (CML), acute lymphoblastic

leukemia (ALL), and chronic lymphoblastic leukemia (CLL) [1]. The incidence rates for leukemias differ between subgroups. In chronic leukemias, there is a trend toward an increase in cases in adults; however, in ALL, pediatric patients are predominant (<15 years old), with a possible appearance after 50 years of age. On the other hand, the other subtypes (CLL, CML, and AML) occur more frequently in adults over 65 years of age [2].

## V-II: Temporal patterns of cytokine and injury biomarkers in hospitalized COVID-19 patients treated with methylprednisolone (doi: 10.3389/fimmu.2023.1229611)



### OPEN ACCESS

EDITED BY  
Soheil Ebrahimipour,  
Babol University of Medical Sciences, Iran

REVIEWED BY  
Karen Ingrid Tasca,  
São Paulo State University, Brazil  
Samrad Mehrabi,  
Shiraz University of Medical Sciences, Iran

\*CORRESPONDENCE  
Gisely Cardoso de Melo  
[✉ cardosogisely@gmail.com](mailto:cardosogisely@gmail.com)

RECEIVED 26 May 2023  
ACCEPTED 26 July 2023  
PUBLISHED 16 August 2023

CITATION  
Mwangi VI, Netto RLA, de Moraes CEP,  
Silva AS, Silva BM, Lima AB, Neves JCF,  
Borba MGS, Val FFA, de Almeida ACG,  
Costa AG, Sampaio VS, Gardinassi LG, de  
Lacerda MVG, Monteiro WM and  
de Melo GC (2023) Temporal patterns of  
cytokine and injury biomarkers in  
hospitalized COVID-19 patients treated  
with methylprednisolone.  
*Front. Immunol.* 14:1229611  
doi: 10.3389/fimmu.2023.1229611

COPYRIGHT  
© 2023 Mwangi, Netto, de Moraes, Silva,  
Silva, Lima, Neves, Borba, Val, de Almeida,  
Costa, Sampaio, Gardinassi, de Lacerda,  
Monteiro and de Melo. This is an open-  
access article distributed under the terms of  
the [Creative Commons Attribution License  
\(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

# Temporal patterns of cytokine and injury biomarkers in hospitalized COVID-19 patients treated with methylprednisolone

Victor Irungu Mwangi<sup>1</sup>, Rebeca Linhares Abreu Netto<sup>1</sup>,  
Carlos Eduardo Padron de Moraes<sup>1,2</sup>, Arineia Soares Silva<sup>1</sup>,  
Bernardo Maia Silva<sup>1,2</sup>, Amanda Barros Lima<sup>3,4</sup>,  
Juliana Costa Ferreira Neves<sup>1</sup>, Mayla Gabriela Silva Borba<sup>1,2</sup>,  
Fernando Fonseca de Almeida e Val<sup>1,2</sup>,  
Anne Cristine Gomes de Almeida<sup>2,5</sup>,  
Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,4,6,7</sup>,  
Vanderson de Souza Sampaio<sup>1,2,8</sup>, Luiz Gustavo Gardinassi<sup>5</sup>,  
Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda<sup>1,2,9</sup>,  
Wuelton Marcelo Monteiro<sup>1,2</sup> and Gisely Cardoso de Melo<sup>1,2,7\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, <sup>2</sup>Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, <sup>4</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, Brazil, <sup>5</sup>Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Brazil, <sup>6</sup>Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, Brazil, <sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil, <sup>8</sup>Instituto Todos pela Saúde, São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>9</sup>Instituto Leonidas & Maria Deane/Fundação Oswaldo Cruz (ILMD/Fiocruz Amazônia), Manaus, Brazil

**Background:** The novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) presents with complex pathophysiological effects in various organ systems. Following the COVID-19, there are shifts in biomarker and cytokine equilibrium associated with altered physiological processes arising from viral damage or aggressive immunological response. We hypothesized that high daily dose methylprednisolone improved the injury biomarkers and serum cytokine profiles in COVID-19 patients.

**Methods:** Injury biomarker and cytokine analysis was performed on 50 SARS-Cov-2 negative controls and 101 hospitalized severe COVID-19 patients: 49 methylprednisolone-treated (MP group) and 52 placebo-treated serum samples. Samples from the treated groups collected on days D1 (pre-treatment) all the groups, D7 (2 days after ending therapy) and D14 were analyzed. Luminex assay quantified the biomarkers HMGB1, FABP3, myoglobin, troponin I and NTproBNP. Immune mediators (CXCL8, CCL2, CXCL9, CXCL10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-12p70, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, and IL-1 $\beta$ ) were quantified using cytometric bead array.

**Results:** At pretreatment, the two treatment groups were comparable demographically. At pre-treatment (D1), injury biomarkers (HMGB1, Tnl,

**ANEXO VI– Produção Científica (Resumos em Congressos)**

**VI-I:** The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) administration on cytokine production by bone marrow and peripheral blood derived stem cells in primary culture (doi: 10.1016/j.htct.2022.09.507)



Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Volume 44, Supplement 2, October 2022, Pages S299-S300



# THE EFFECT OF GRANULOCYTE COLONY-STIMULATING FACTOR (G-CSF) ADMINISTRATION ON CYTOKINE PRODUCTION BY BONE MARROW AND PERIPHERAL BLOOD DERIVED STEM CELLS IN PRIMARY CULTURE

AB Lima<sup>a b</sup>, F Magalhães-Gama<sup>b c</sup>, WLL Neves<sup>b</sup>, NP Garcia<sup>b</sup>, HNS Ibiapina<sup>b</sup>, AM Tarragô<sup>b d</sup>, EB Leon<sup>a</sup>, AG Costa<sup>a b d</sup>, A Malheiro<sup>a b d</sup>, ND Araújo<sup>a b</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil

<sup>b</sup> Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brazil

<sup>c</sup> Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG, Brasil

<sup>d</sup> Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brazil

Available online 15 October 2022, Version of Record 15 October 2022.

**VI-II:** Associação do polimorfismo NLRP3 C/T rs10754558 com o aumento de blastos na médula óssea em pacientes com leucemia linfoblástica aguda (doi: 10.1016/j.htct.2022.09.262)



Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Volume 44, Supplement 2, October 2022, Pages S155-S156



## ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NLRP3 C/T RS10754558 COM O AUMENTO DE BLASTOS NA MÉDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

FSA Hanna<sup>a b</sup>, DS Pereira<sup>b c</sup>, GL Souza<sup>b c</sup>, AB Lima<sup>a b</sup>, F Magalhães-Gama<sup>b d</sup>, AM Tarragô<sup>b c</sup>, A Malheiro<sup>a b c</sup>, AG Costa<sup>a b c e</sup>

- <sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil
- <sup>b</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil
- <sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil
- <sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG, Brasil
- <sup>e</sup> Escola de Enfermagem de Manaus (EEM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

Available online 15 October 2022, Version of Record 15 October 2022.

**VI-III:** Associação do polimorfismo IL1B RS16944 com parâmetros laboratoriais em pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda (doi: 10.1016/j.htct.2022.09.112)



Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Volume 44, Supplement 2, October 2022, Page S67



# ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IL1B RS16944 COM PARÂMETROS LABORATORIAIS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

[JAC Neto](#)<sup>a</sup>, [FSA Hanna](#)<sup>b</sup>, [GM Nogueira](#)<sup>c</sup>, [JRF Fonseca](#)<sup>c</sup>, [GL Souza](#)<sup>d</sup>, [DS Pereira](#)<sup>d</sup>, [AB Lima](#)<sup>b</sup>,  
[AM Tarragô](#)<sup>c,d</sup>, [AMA Marie](#)<sup>b,c,d</sup>, [AG Costa](#)<sup>b,c,d,e</sup>

<sup>a</sup> Faculdade Estácio do Amazonas (UNESA), Manaus AM, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>c</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

<sup>e</sup> Escola de Enfermagem de Manaus (EEM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

Available online 15 October 2022, Version of Record 15 October 2022.