



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**

**GERALDO PEDRAL SAMPAIO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD105 (ENDOGLINA) EM  
PRECURSORES LINFOIDES NORMAIS E EM BLASTOS  
NEOPLÁSICOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS  
PRECURSORAS B NO ESTADO DA BAHIA**

Salvador, BA

2023

**GERALDO PEDRAL SAMPAIO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD105 (ENDOGLINA) EM  
PRECURSORES LINFOIDES NORMAIS E EM BLASTOS  
NEOPLÁSICOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS  
PRECURSORAS B NO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento

Co-orientadora: Eugênia Terra Granado Pina

Salvador, BA

2023

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S192 Sampaio, Geraldo Pedral

Análise da expressão de CD105 (endoglina) em precursores linfoides normais e em blastos neoplásicos de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B no estado da Bahia/Geraldo Pedral Sampaio. – Salvador, 2023.

73 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer Nascimento; Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eugênia Terra Granado Pina.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

Inclui referências, anexos e apêndices.

1. Leucemia linfoblástica aguda B. 2. Pediatria. 3. Imunofenotipagem. 4. CB105. I. Nascimento, Roberto José Meyer. II. Pina, Eugênia Terra Granado. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616-006.6-053.2(813.8)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



Nº003D/2023

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE INTITULADO: "Análise da expressão de CD105 (endoglina) em precursores linfóides normais e em blastos neoplásicos de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B no estado da Bahia" do doutorando Geraldo Pedral Sampaio.

Aos seis dias do mês de março do ano de dois mil e vinte e três, na sala de reunião vinculada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia (PPGIm-UFBA), a Banca Examinadora composta pelos Professores: **Dra. Eugênia Terra Granado Pina, Co-orientadora, Dr. Bruno Diaz Paredes, Dr. Marco Aurelio Salvino de Araújo, Dra. Luciana Souza de Aragão França e Dra. Luciana Santos Cardoso** se reúne com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de tese intitulado: "Análise da expressão de CD105 (endoglina) em precursores linfóides normais e em blastos neoplásicos de pacientes pediátricos com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B no estado da Bahia" do doutorando Geraldo Pedral Sampaio. Após a apresentação, arguição e comentários dos membros da Banca Examinadora fica determinado que as sugestões discutidas sejam implementadas na versão final da tese. Havendo cumprido as exigências do Programa quanto à defesa do trabalho final, a Banca Examinadora conclui que mediante a entrega do exemplar final pelo aluno com as devidas modificações no prazo de 60 dias, o Pós-Graduando está habilitado à obtenção do título de doutor em Imunologia. Adicionalmente, os pareceres individuais dos membros da Banca Examinadora serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar se encerra a sessão da qual é lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo doutorando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, seis de março de dois mil e vinte e três.

Dra. Eugênia Terra Granado Pina  
Co-orientadora

Dr. Marco Aurélio Salvino de Araújo  
Banca Examinadora

Dr. Bruno Diaz Paredes  
Banca Examinadora

Dra. Luciana Souza de Aragão França  
Banca Examinadora

Dr. Luciana Santos Cardoso  
Banca Examinadora

Geraldo Pedral Sampaio  
Doutorando

Dra. Silvia Lima Costa  
Coordenadora do PPGIm ICS-UFBA

Dedico esta tese a meu falecido pai.

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para a construção deste trabalho, seja de forma direta ou indireta.

Ao meu orientador Prof. Dr. Roberto Meyer, que sempre se apresenta disponível às inúmeras solicitações. Pela sua vasta experiência na Imunologia e excelente coordenação do LABIMUNO, que tornaram este trabalho possível, pois de lá vem toda a base de citometria de fluxo e aprendizado aplicado neste trabalho (serviço de Imunofenotipagem para doenças onco-hematológicas em especial a Dr. Herbert, Allan, Mariane e Lorene). Agradecer também a professora Dra. Soraya C. Trindade e Rebeca Bulhosa por toda a parceria e a por sua atenção a este trabalho.

Ao professor Dr. Alex José Torres ao qual tive oportunidade de dar os primeiros passos no universo da citometria de fluxo.

Gostaria de agradecer a equipe de professora Dra. Camila Alexandrina e sua equipe Yasmin Almeida e Keina Dourado por nossa colaboração e viabilização do para este trabalho.

Aos meus pais, irmãos e a minha família (esposa Camila e filhos Rafael e Noah), que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei em todo o percurso da minha vida.

As crianças com câncer e seus familiares que nos permitiram o desenvolver do projeto e tanto contribuíram para um melhor entendimento da leucemia infantil.

Ao corpo clínico de onco-pediatras que vivem e lutam esta batalha dia a dia lado a lado com as crianças com câncer (Hospital Aristides Mlatez – Dra. Ana Maria; Hospital Martagão Gesteira – Dra. Juliana e Luciana Nunes; Santa Casa de Itabuna – Dra Tereza Cardoso).

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas do HAM que tanto contribuíram na logística deste trabalho (Dra. Kátia Curvello e Dr. Jefferson Correia).

Aos colegas de caminhada e rotina (Felice, Chaislan Igor, Dra. Eugenia Pina, Giovanna e Paulina) compartilhando conhecimento e contribuindo de forma incomensurável no desenvolver deste trabalho.

À Aline e Jussi, que me acompanham no Programa de Pós-Graduação em Imunologia desde o ingresso no Doutorado, sempre presentes e me auxiliando com tudo que era necessário.

E por fim, mas não menos importante, aos meus amigos pela paciência e suporte emocional que me forneceram na etapa final de escrita da tese.

## RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA), possui uma incidência bimodal, caracterizada pela perda de habilidade normal de diferenciação e proliferação, havendo um acúmulo de células progenitoras linfóides e expansão clonal em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos. É a mais comum na infância e adolescência, tendo diversos fatores associados à sua etiologia. O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. Nesse contexto, a análise da expressão de moléculas na curva maturativa de precursores linfóides normais e neoplásicos é uma ferramenta que contribui para elucidar o comportamento do ambiente medular na análise de Doença Residual Mensurável (DRM). A molécula endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor da família do TGF- $\beta$  que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese. Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é expressa nas células-tronco hematopoiéticas (CTH) e recentemente tem sido sugerida como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células precursoras B (LLA-cpB). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominados de hematogônias, e em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-cpB. O estudo foi realizado em amostras de pacientes onco-pediátricos do Hospital Aristides Maltez, Martagão Gesteira e Santa Casa de Itabuna, utilizando painéis pré-definidos para a análise da expressão do CD105. A aquisição dos eventos foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCalibur e as análises realizadas no software Infinicyt™ 9 1.8. As amostras dos pacientes, avaliados ao diagnóstico ou durante DRM, foram analisadas individualmente quanto à presença ou ausência da expressão antigênica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. O CD105, ao diagnóstico, foi expresso em 73,33% dos pacientes com LLA-cpB, tendo a maior expressão nos blastos leucêmicos. Já quando comparado com DRM, a maior expressão foi nas hematogônias em DRM negativa (67,28%), com média de intensidade de fluorescência (MIF) de 87,26. Quando analisado individualmente (paciente 1), os blastos tiveram uma maior expressão e MIF, 21,56% e 26,14, respectivamente. CD105 pode ser considerado um potencial marcador

prognóstico para detecção de resposta à terapia de indução na infância LLA-B, e pode servir para otimizar as decisões para tratamento.

**Palavras-chave:** Leucemia Linfoblástica Aguda B, pediátrico, CD105, imunofenotipagem.

## ABSTRACT

Acute lymphocytic leukemia (ALL) has a bimodal incidence, characterized by loss of normal ability to differentiate and proliferate, with an accumulation of lymphoid progenitor cells and clonal expansion in bone marrow, peripheral blood, and other tissues. It is the most common in childhood and adolescence, with several factors associated with its etiology. The use of flow cytometry, in conjunction with morphological analysis, is essential for the diagnosis and follow-up of such diseases. In this context, the analysis of the expression of molecules in the maturation curve of normal and neoplastic lymphoid precursors is a tool that contributes to elucidating the behavior of the medullary environment in the analysis of Measurable Residual Disease (MRD). The endoglin molecule (ENG, CD105) is a co-receptor of the TGF- $\beta$  family that plays a crucial role in the regulation of angiogenesis. Although best known for its expression in endothelial cells, endoglin is also expressed in hematopoietic stem cells (HSC) and has recently been suggested as a marker of poor prognosis for pediatric patients with B Cell Precursor ALL (BCP-ALL). In this context, the present work evaluated the expression of CD105 in normal precursors of B cells, also called hematogonia, and in leukemic blasts from pediatric patients with BCP-ALL. The study was carried out on onco-pediatric patients samples from Hospital Aristides Maltez, Martagão Gesteira, and Santa Casa de Itabuna, using pre-defined panels for the analysis of CD105 expression. Events were acquired using a BD FACSCalibur flow cytometer and analyzes were performed using the Infinicyt™ 9 1.8 software. Patient samples, evaluated at diagnosis or during MRD, were individually analyzed for the presence or absence of antigenic expression of each marker used in flow cytometry. CD105, at diagnosis, was expressed in 73.33% of



patients with BCP-ALL, with the highest expression in leukemic blasts. When compared with MRD, the highest expression was in hematogonia in negative MRD (67.28%), with a mean MFI of 87.26. When analyzed individually (patient 1), the blasts had a higher expression and MFI, 21.56 and 26.14, respectively. CD105 can be considered a potential prognostic marker for the detection of response to induction therapy in childhood BCP-ALL, and may serve to optimize treatment decisions.

**Keywords:** Acute Lymphoblastic Leukemia B, pediatric, CD105, immunophenotyping..

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Alterações genéticas associadas a fenótipos clássicos / OMS-2016. 8

**Tabela 2-** Painel descritivo de anticorpos utilizado para triagem e diagnóstico 11

**Tabela 3 -** Painel de anticorpos utilizado para Doença Residual Mínima 11

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
2	<b>OBJETIVOS</b>	5
3	<b>CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura</b>	6
	3.1 LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA DE CELULAS B	6
	3.2 CLASSIFICACAO OMS	6
	3.3 DIAGNOSTICO E TRATAMENTO	7
	3.4 IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	8
	3.5 CD105 (ENDOGLINA)	9
	3.6 Referências	13
4	<b>CAPÍTULO 2 – Artigo Científico 1</b>	17
	4.1 Introdução	19
	4.2 Materiais e Métodos	20
	4.3 Resultados	22
	4.4 Discussão	30
	4.5 Consideracoes finais	31
	4.6 Referencias	32
5	<b>CAPÍTULO 3 – Artigo Científico 2</b>	39
	5.1 Introdução	41
	5.2 Materiais e Métodos	42
	5.3 Resultados	44
	5.4 Discussão	50
	5.5 Consideracoes finais	53
	5.6 Referencias	54
6	<b>ANEXO COMISSÃO DE ETICA</b>	58
	6.1 ANEXO A	59
	6.2 ANEXO B	59
	6.3 ANEXO C	62
7	<b>APÊNDICE</b>	64
	7.1 Artigos publicados em 2016	64
	7.2 Artigos publicados em 2016	65
	7.3 Artigos publicados em 2016	66
	7.4 Artigos publicados em 2018	67

7.5	Artigos publicados em 2018	68
7.6	Artigos publicados em 2019	69
7.7	Artigos publicados em 2019	70
7.8	Artigos publicados em 2019	71
7.9	Artigos publicados em 2020	72
7.10	Artigos publicados em 2021	73

## 1. INTRODUÇÃO

As leucemias agudas (LA) são neoplasias mais comuns na infância, representando 25-35% dos casos em crianças abaixo de 15 anos em países desenvolvidos (PARKIN et al., 1988). No Brasil, estudos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do INCA mostram que existem diferenças regionais importantes nas taxas de incidência de LA, que demandam estudos sobre a etiologia da doença (REIS et al., 2011 e 2016), tendo sido observada para LA, uma taxa de incidência ajustada por idade de 53,3 por milhão em crianças de 0-14 anos. Em Salvador foi observada uma taxa de incidência de 25,6 casos por milhão em crianças de 0-14 anos, e entre crianças com menos de 5 anos uma taxa de 44,8 por milhão. Poucos estudos foram realizados avaliando a população do estado de maneira mais específica. Um trabalho publicado pelo grupo de pesquisa do IGM (CÉZAR et al., 2015), sugere que o perfil imunofenotípico e prognóstico em pacientes pediátricos LLA-B do estado estão relacionados à mistura racial, além de mostrar uma sobrevida global em 6 anos de 67,5% nessa população, que está abaixo do encontrado em países com maior nível socioeconômico (PUI et al., 2015).

A leucemia linfóide aguda (LLA), também conhecida como leucemia linfoblástica aguda, é uma neoplasia hematológica maligna, que se possui uma incidência bimodal (dois picos), o primeiro na infância e o segundo por volta dos 50 anos, caracterizada pela perda de habilidade normal de diferenciação e proliferação, havendo um acúmulo de células progenitoras linfóides e expansão clonal em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos (JABBOUR et al., 2015). A LLA é a mais comum na infância e adolescência, sendo sua maior ocorrência em homens (INCA, 2020). A classificação como leucemia ocorre com presença de mais de 20% de blastos neoplásicos em medula óssea e/ou sangue periférico (WHO, 2017).

Diferentes fatores podem estar diretamente associados à etiologia das LLA, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais (WIEMELS, 2012). O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. Protocolos quimioterápicos podem levar à remissão da leucemia, mas eventos refratários e recidivas da

patologia podem ocorrer, sendo essencial o monitoramento da resposta terapêutica. Tal acompanhamento é realizado através da avaliação da Doença Residual Mínima (DRM), um protocolo de rotina que permite a identificação da presença de blastos leucêmicos em níveis muito baixos durante o tratamento, possibilitando a adequação do tratamento para baixo ou alto risco, e a indicação para transplante de medula óssea, quando necessário. Nesse contexto, a análise da expressão de moléculas na curva maturativa de precursores linfóides normais e neoplásicos é uma ferramenta que contribui para elucidar o comportamento do ambiente medular na análise de DRM (PETERS et al, 2011).

A molécula endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor da família do *TGF- $\beta$*  (do inglês *Transforming growth factor  $\beta$* ) que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese (COSIMATO et al, 2018). Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é expressa nas células-tronco hematopoiéticas (HSC) (PRONK et al., 2007; CHEN et al., 2002). Em 2017, um estudo utilizando modelo de xenotransplante mostrou que os blastos positivos para endoglina (CD105) obtidos de pacientes com leucemia, apresentam maior capacidade leucemogênica do que blastos CD105 negativos. Outro trabalho muito recente sugere CD105 como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células B (LLA-B) (ELKHOLY ET AL, 2021). Neste contexto, o presente trabalho pretende avaliar a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominadas de hematogônias, e em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-B.

Durante a ontogênese de células B observam-se que algumas substâncias, como as interleucinas, são responsáveis pela modulação na expressão de marcadores, sendo o CD19 de membrana o mais precoce e que perde sua expressão apenas nos plasmócitos. Outros marcadores caracterizam cada fase de maturação das células, nas imaturas pode-se observar o CD34, TdT, CD22, CD34, CD10, CD45, CD19, e em células maduras CD19, CD20, CD22, CD45, SmlgM; sendo os principais marcadores de células B o CD19, CD20, CD22 e CD79a (ZAGO,2013). A função imune tem sido associada à probabilidade de sobrevivência em várias doenças, incluindo doenças autoimunes, doenças infecciosas, tumores sólidos, doença de Alzheimer e leucemia. A interação entre o sistema imunológico e

a LLA é complexa e abrange diversas células e citocinas. Alterações na expressão dessas citocinas podem ter um importante papel na imunopatogênese da LLA (GALLEGOS- ARREOLA et al., 2013).

O Fator de Crescimento Transformante- $\beta$  (em inglês Transforming Growth Factor- beta,  $TGF-\beta$ ) é o membro fundador de uma grande família de fatores de crescimento de polipeptídios segregados, constituído por mais de 30 membros em seres humanos, incluindo isoformas do  $TGF-\beta$  ( $TGF-\beta$  1,  $TGF-\beta$  2,  $TGF-\beta$  3), ativinas e outras proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) (SCHMIERER; HILL, 2007). A família  $TGF-\beta$  constitui um conjunto multifuncional de citocinas que regulam uma surpreendente variedade de processos celulares durante e além do desenvolvimento. No organismo, os membros do  $TGF-\beta$  regulam o tecido homeostase e regeneração (GORDON et al., 2009). Em relação à hematopoiese, endoglina via  $TGF-\beta$  desempenha um papel importante na regulação do comportamento HSC, em especial a quiescência e na auto-renovação (WATABE; MIYAZONO, 2009).

O  $TGF-\beta$  1 é um fator pleiotrópico detectado pela maioria das células. Regula um amplo espectro de respostas celulares, incluindo a hematopoiese. A fim de processar as respostas de  $TGF-\beta$  1 no tempo e no espaço de maneira apropriada, há uma regulação rígida de sua sinalização em várias etapas. A sinalização a jusante é mediada pelos receptores tipo I e tipo II e modulada pelo receptor "acessório" Endoglina, também denominado cluster de diferenciação 105 (CD105). A endoglina foi inicialmente identificada em células de leucemia pré-B, mas tem recebido mais atenção devido à sua alta expressão em células endoteliais ativadas. Por sua vez, a endoglina foi descoberta como o fator causador de doenças associadas à disfunção vascular, como telangiectasia hemorrágica hereditária-1 (HHT-1), pré-eclâmpsia e restrição de crescimento intrauterino (IUPR). Como os pacientes com HHT geralmente apresentam sinais de inflamação nas lesões vasculares, e a perda de endoglina na linhagem mieloide leva à inflamação espontânea, especula-se que a endoglina tenha impacto nos processos inflamatórios (MEUKER SK et al, 2020). Em linha, a endoglina é expressa em células progenitoras/precursoras durante a hematopoiese, bem como em células maduras e diferenciadas do sistema imune inato e adaptativo. No entanto, até agora, apenas

pró-monócitos e macrófagos foram o foco da pesquisa, embora a endogлина tenha sido identificada em muitos outros subconjuntos de células do sistema imunológico. Esses achados implicam um papel funcional da endogлина na maturação e função das células imunes. Além da relevância funcional da endogлина nas células endoteliais, o CD105 é expresso diferencialmente durante a hematopoiese, defendendo um papel desse receptor no desenvolvimento de linhagens celulares individuais. Além disso, a expressão de endogлина está presente em células imunes maduras do sistema imunológico inato (ou seja, macrófagos e mastócitos) e adaptativo (ou seja, células T), sugerindo ainda a endogлина como um fator que molda as respostas imunes (MEUKER SK *et al*, 2020).

O CD105 é outro marcador que é observado na maturação de células B, sendo um receptor da superfamília do  $TGF-\beta$ , expresso nas células-tronco hematopoiéticas de todos os sítios hematopoiéticos, incluindo a medula óssea. Sua principal função está relacionada à angiogênese, sendo um importante ator na patogênese de doenças vasculares e na progressão tumoral (WIKSTROM P *et al*, 2002; COSIMATO *et al*, 2018; A ELKHOLY *et al*, 2021). Foi observada a expressão do CD105 em 81,8% dos pacientes com LLA-B e 8,5% em pacientes LLA-T. Neste mesmo trabalho é sugerido um maior potencial leucemogênico em blastos positivos para CD105, quando comparados aos blastos negativos (DOURADO *et al*, 2017).

A LLA-B é caracterizada pela expansão clonal, bloqueio na diferenciação, e resistência à morte, podendo aparecer em duas fases, na infância e fase adulta, possui uma boa resposta à quimioterapia, e alta taxa de recaída (INABA, H. *et al*, 2013; PAUL *et al*, 2016; RASHED *et al*, 2019). É o câncer mais frequente na infância e adolescência, correspondendo a 85% dos casos de LLA (PUI CH *et al*, 2008). De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), a LLA-B atualmente possui 11 subtipos, sendo 2 entidades provisórias, obedecendo o critério de diferenciação genética (ARBER *et al*, 2016).

O uso da citometria de fluxo é fundamental para o diagnóstico das leucemias agudas, e atrelado à análise morfológica pode-se chegar a um diagnóstico preciso e suficiente. Os protocolos de quimioterapia podem levar à remissão, no entanto, podem ocorrer eventos de refratariedade e recaída à patologia, tornando o



monitoramento da Doença Residual Mínima (DRM) um protocolo rotineiro, que guiará a utilização de tratamentos mais ou menos intensos ou a indicação de transplante de medula óssea. Nesse contexto, além da observação das expressões dos marcadores, as curvas de maturação são ferramentas que contribuem bastante para elucidação do comportamento do ambiente medular nas análises de DRM (PETERS et al, 2011), conseqüentemente, a identificação de novos marcadores prognósticos não só promove a acurácia da estratificação de risco dos pacientes, mas também minimiza a chance de recaída, otimizando a terapia no início do tratamento (RASHED et al., 2019).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a expressão imunofenotípica do CD105 (Endoglina) em curva maturativa de precursores da linhagem B e blastos leucêmicos de crianças com diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a expressão do CD105 nos casos de LLA-B;
- Avaliar a expressão do CD105 da linhagem B precursora normal;
- Correlacionar a expressão de CD105 com doença, em precursores e linfócitos maduros.

### **3. CAPÍTULO 1 – Revisão de Literatura**

#### **3.1. Leucemia Linfóide Aguda de Células B**

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é o câncer mais comum na infância e adolescência. No Brasil, estima-se que para câncer infantojuvenil, 4.150 novos casos de leucemia sejam diagnosticados para o sexo feminino e 4.310 para o sexo masculino, predominantemente LLA (INCA, 2020). Essa neoplasia hematológica é caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas nas células progenitoras da linhagem linfóide, resultando em bloqueio da diferenciação, estímulo da proliferação e resistência à morte celular (INABA, H. et al., 2013). Cerca de 90% das LLA têm alteração de cariótipo ao diagnóstico. A incidência de LLA geralmente segue uma distribuição bimodal, com o primeiro pico ocorrendo na infância e o segundo pico por volta dos 50 anos. Com estratificação de risco adequada, a LLA responde bem à quimioterapia, mas a mortalidade precoce durante a fase de introdução da quimioterapia não é incomum. Além disso, a alta taxa de recidiva continua sendo um grande problema (TZORTZATOU-STATHOPOULOU et al., 2001). Portanto, a identificação de novos marcadores prognósticos não apenas ajudará a aumentar a precisão da estratificação de risco dos pacientes, mas também minimizará as chances de recaída, otimizando a terapia nos estágios iniciais do tratamento (RASHED et al., 2019). Com a maior taxa de cura da oncologia moderna, parece razoável considerar a terapia de redução de disparidade para reduzir toxicidades de curto e longo prazo sem comprometer os resultados (STANULLA M et al., 2009; ANSARI M et al., 2009).

#### **3.2. CLASSIFICAÇÃO OMS**

Em decorrência do avanço da imunofenotipagem e citogenética molecular a classificação da OMS divide as LLA em neoplasias de precursor B ou T. A OMS, em 2016, trouxe atualizações sobre as classificações das leucemias/linfomas B, tendo 11 tipos, sendo duas entidades provisórias. As alterações genéticas ( Tabela 1) observadas são: t(9;22)(q34.1;q11.2) - BCR-ABL1; rearranjo t(v;11q23.3) - KMT2A; t(12;21)(p13.2;q22.1) - ETV6-RUNX1; hiperploídia; hipoploídia; t(5;14)(q31.1;q32.3) -

IL3-IGH; t(1;19)(q23;p13.3) - TCF3-PBX1; BCR-ABL1-like; iAMP21, as duas últimas são as entidades provisórias (ARBER et al., 2016). Todos esses marcadores auxiliam na orientação de estudos genéticos, definem grupos com melhor ou pior prognóstico, identificam expressões aberrantes e facilitam estudos pós-tratamento de doença mínima residual.

Tabela 1 – Alterações genéticas associadas a fenótipos clássicos / OMS-2016.

Alteração genética associado a fenotipo classico			
Características imunofenotípicas			
Alteracao genetica	Fenotipo classico	Principais	Secundarias
<b>MLL-r</b>	Pro-B	NG2+, CD15+, CD66c-, CD24-	CD33+, CD65+
<b>BCR-ABL</b>	Común	CD25+, CD66c+	CD33+, CD13+, CD21+, CD27+
<b>TEL-AML</b>	Común	CD9-, CD66c-, CD27+, CD44-	CD33+, CD13+, CD20-
<b>Hiperdiploide</b>	Común	CD123+, CD66c-	CD21-, CD27-, CD13-, CD33-
<b>Hipodiploide</b>	Común	Dados insuficientes (baixa frecuencia)	CD66c+
<b>E2A-PBX</b>	Pre-B	CD9+, CD34-, CD66c-	CD10-
<b>iAMP21</b>	Pre-B/Común	Dados insuficientes	
<b>BCR-ABL1-like</b>	Común	Dados insuficientes	

### 3.3. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

O diagnóstico de leucemia aguda é feito pela presença de  $\geq 20\%$  de blastos no sangue periférico ou na medula óssea, identificados através de análise morfológica de esfregaço. A classificação das neoplasias linfóides de 2016 da organização Mundial da saúde (OMS) leva em consideração dados genéticos, características clínicas, morfologia celular e imunofenótipo, todos com implicações importantes para o prognóstico e tratamento da doença (ARBER et al., 2016).

Testes histoquímicos, citogenéticos e imunofenotípicos ajudam a distinguir blastos de leucemia linfoblástica aguda daqueles de leucemia mieloide aguda ou outros processos patológicos. Determinação de indicadores imunofenotípicos específicos, como CD3 (para células linfóides T) e CD19, CD20 e CD22 (para células linfóides B) são essenciais para a identificação de leucemia aguda.

O tratamento para leucemia linfoblástica aguda recém-diagnosticada geralmente consiste em 3 a 4 ciclos de quimioterapia resistente não cruzada nos primeiros 9-12 meses, seguidos por 2,5 a 3 anos quimioterapia de manutenção. As quatro principais fases da quimioterapia para a leucemia linfoblástica aguda são indução da remissão, consolidação após remissão, manutenção e intensificação temporárias e manutenção. O objetivo do tratamento de indução é a remissão completa, definida como < 5% de blastos na medula óssea. Em pacientes em remissão completa, a doença residual mínima é o fator prognóstico mais importante. A doença residual mínima (< 0,01 a 0,1% de células leucêmicas na medula óssea) é uma doença microscópica que não é detectada por exames convencionais, mas pode ser medida por exames mais sensíveis, como a imunofenotipagem por citometria de fluxo (BERRY et al., 2017).

### **3.4. IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO**

A citometria de fluxo multiparamétrica fornece um perfil veloz e pormenorizado da expressão antigênica na leucemia aguda que, quando usado em conjunto com a avaliação morfológica, leva ao diagnóstico diferencial estreito. Apesar da crescente importância das características moleculares e genéticas na subclassificação das leucemias agudas, as análises morfológicas e imunofenotípicas continuam sendo as principais modalidades pelas quais essas doenças são consideradas pela primeira vez. A imunofenotipagem por citometria de fluxo pode ajudar em estabelecer um diagnóstico de leucemia aguda, confirmando de forma mais objetiva e definitiva a presença de progenitores hematopoiéticos expandidos e demonstrando anormalidades imunofenotípicas nos progenitores que se encontram fora das perturbações observadas durante a regeneração medular normal (Wood BLaB, MJ 2010), como demonstrado nos painéis descritos nas tabela 2 e tabela 3 no quais apresentamos os anticorpos monoclonais tanto para diagnóstico, quanto para a avaliação de Doença Residual Mensurável (DRM) respectivamente.

A análise por citometria de fluxo pode ser realizada em poucas horas em praticamente todos os casos e muitas vezes é suficiente, quando combinada com o exame morfológico convencional, para chegar a uma diagnose diferencial estreito ou mesmo definitivo de LLA. Uma grande variedade de amostras é adequada para

avaliação por citometria de fluxo, embora, em geral, os melhores resultados sejam obtidos com amostras à base de fluido, como sangue periférico e aspirado de medula óssea (PETERS et al., 2011).

As Leucemia Linfoblástica Aguda Precursora de Células B (*B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia / BCP-ALL*) são malignidades de células B imaturas envolvendo medula óssea (*Bone Marrow - BM*), sangue periférico (*Peripheral Blood - PB*) e até mesmo apresentando envolvimento primário de locais nodais ou extranodais (BCP-LBL). A BCP-ALL imunofenotipicamente é diagnosticada pelas diferenças entre os padrões de expressão do antígeno em células leucêmicas e suas contrapartes normais (BELTRAME et al., 2021). A maioria dos casos de leucemia / linfoma linfoblástico B apresenta níveis elevados de expressão de vários marcadores de linhagem B, incluindo CD19, CD22 e CD79a. A expressão de CD10, muitas vezes ligeiramente superior à de precursores linfóides B imaturos normais (ou hematogônias), é clássica, mas não é específica nem necessária para a diagnose. Embora PAX5 e TdT também sejam usuais, a expressão de antígenos leucocitários CD45, CD34 e CD20 pode mostrar padrão de expressão de fraca a negativa. As imunoglobulinas de superfície são extremamente raras, mesmo no caso de rearranjos de genes de imunoglobulinas. A expressão inadequada de marcadores de linhagem mielóide é comum, especialmente CD13 e CD33, raramente CD15 (SEEGMILLER et al., 2009), mas a positividade da mieloperoxidase indicaria uma leucemia aguda de fenótipo misto (PETERS et al., 2011) .

### **3.5. TGF- $\beta$ e hematopoiese**

A regulação da hematopoiese depende do equilíbrio da proliferação, diferenciação e sinais apoptóticos das células progenitoras hematopoiéticas. Desta forma desempenhando um papel importante, mas demonstra efeitos específicos da célula e do contexto. Ensaio de células-tronco humanas CD34+ tratadas com TGF- $\beta$  1 exógeno in vitro levam à interrupção do crescimento e inibição da formação de colônias (OTTMANN, O.; PELUS, L.M., 1998; SING, G.K.; ET al., 1988). TGF- $\beta$  1 parece preferencialmente manter a quiescência de progenitores hematopoiéticos precoces (OTTMANN, O.; PELUS, L.M., 1998). Notavelmente, o nocaute condicional de TGF- $\beta$  R1 em camundongos adultos leva a um número normal de células

progenitoras hematopoiéticas funcionais com capacidade normal de autorrenovação e regeneração (LARSSON, J.; *et al*, 2003). Isso pode refletir a sinalização do *TGF-β* 1 por meio de receptores alternativos, o que foi relatado em outros tipos de células (DONG, M.; *et al*, 2006). Alternativamente, outras citocinas ou fatores de crescimento podem compensar a perda de *TGF-β* R1. Enquanto o *TGF-β* 3 parece ser um potente regulador negativo de células-tronco hematopoiéticas (*HSCs*), o *TGF-β* 2 exibe um potencial regulador negativo mais modesto e, em alguns estudos, até promove a atividade de *HSC* (LANGER, J.C.; *et al*, 2004 & JACOBSEN, S.; *et al*, 1991). Claramente, há uma interação complexa entre as isoformas de *TGF-β* e outros membros da superfamília para manter a hematopoiese e o pool de *HSC*. O acúmulo de evidências destaca o *TGF-β* como um importante regulador das células B, incluindo desenvolvimento, ativação e diferenciação. Alguns desses efeitos são ações diretas do *TGF-β*, mas alguns aspectos da resposta das células B são indiretos por meio da comunicação intercelular.

Além de regular o pool de *HSC*, o *TGF-β* modula o desenvolvimento e a ativação subsequentes das células B. O *TGF-β* 1 inibe a expressão da cadeia leve kappa em clones de células pré-B murinas, exercendo um efeito seletivo inibitório na aquisição de cadeias gama de superfície (LEE, G.; *et al.*, 1987 & REHMANN, J.A.; *et al.*, 1994). Além disso, o *TGF-β* tem sido associado ao controle do centro germinativo (GC) (ALBRIGHT, A.R.; *et al.*, 2019 & STELLING, A.; *et al.*, 2018). Camundongos sem *TGF-β* R2 especificamente em células B GC, exibem hiperproliferação de centroblastos, centrócitos e células GC (Stelling, A.; *et al.*, 2018). No entanto, diferentes modelos murinos mostraram resultados contrastantes de *TGF-β* na capacidade de resposta de células B e produção de imunoglobulina (LI, R.; *et al.*, 2006 & SATO, S.; *et al.*, 2005).

O *TGF-β* claramente desempenha um papel na regulação da proliferação e sobrevivência de células B. In vitro, o *TGF-β* 1 desencadeia apoptose em células B normais e algumas linhas de células B transformadas, levando à indução de pró-apoptótica e regulação negativa de proteínas antiapoptóticas (LØMO, J.; *et al.*, 1995 & SPENDER, L.; *et al.*, 2009). No entanto, enquanto modelos in vivo de camundongos com deficiência seletiva de *TGF-β* R2 de células B mostram diminuição do tempo de vida de células B convencionais, um acúmulo de células B1

peritoneais, bem como hiperplasia de células B em placas de Peyer, foi observado no mesmo modelo (CAZAC, B.B.; *et al.*, 2000). Isso sugere que a sinalização do *TGF-β* pode ter efeitos pró e antiapoptóticos nas células B, dependendo do contexto, estágio de desenvolvimento e microambiente. Coletivamente, esses estudos destacam a complexidade da biologia das células B do *TGF-β* e refletem as interações relativamente mal compreendidas entre a sinalização do *TGF-β* e a regulação normal das células B (TAMAYO, E.; *et al.*, 2018).

Compreender o impacto do *TGF-β* na hematopoiese normal é importante, pois a recaída da linfoproliferações B leva à falência da medula óssea (M.O) e à morte. De fato, as neoplasias linfoproliferativas B estão de contramão a diferenciação das HSCs em relação aos progenitores mielóides em detrimento dos progenitores eritróides na circulação periférica (SANTORO, A. *et al.*, 2020). É importante ressaltar que o *TGF-β* 1 promove HSCs com viés mieloide *in vitro* e *in vivo* (CHALLEN, G.A. *et al.*, 2010). Alterações induzidas pela doença no nicho de BM, mediadas em parte por *TGF-β*, poderiam, portanto, desempenhar um papel na redistribuição observada de HSCs na linfoproliferações B.

### **3.6.CD105 (ENDOGLINA)**

O gene ENG (Endogлина) humano fica localizado no cromossomo 9q34.11 e codifica a endogлина, uma glicoproteína transmembranar que funciona como um receptor auxiliar da família *TGF-β* (CHEIFETZ *et al.*, 1992; GOUGOS; LETARTE, 1990). Endogлина (CD105) é um receptor do *TGF-β* tipo I e III, uma citocina pleiotrópica que rege a proliferação, diferenciação, migração e adesão celular. A endogлина é considerada um poderoso marcador da angiogênese e um potencial ator essencial na patogênese de doenças vasculares e na progressão tumoral (FONSATTI *et al.*, 2003). Isso sugere que o nível de expressão de CD105 define uma hierarquia entre as células hematopoiéticas aórticas, permitindo a purificação de progenitores hematopoiéticos clonogênicos versus mais imaturos, e que a via do *TGF-β* desempenha um papel crítico nesse processo (MARIO ROQUES *et al.*, 2012). O CD105 tem sido proposto como alvo para diagnóstico por imagem, bem como para terapia personalizada em tumores sólidos (FONSATTI *et al.*, 2009). No entanto, muito menos se sabe sobre a expressão de endogлина em células neoplásicas



hematopoiéticas em grande número de malignidades sanguíneas. Muitos anos atrás, Buhning et al. descobriram que a endogлина não foi detectável em células precursoras hemopoiéticas positivas para CD34 da medula óssea, bem como em células B 'maduras', células T, NK e mieloides, mas estava presente em um subconjunto de células mononucleares positivas para glicoforina A. Em um estudo seguinte, Rokhlin et al. demonstraram através da citometria de fluxo a existência de duas populações endogлина positivas na medula óssea fetal: células precursoras da linhagem B e pró-eritroblastos.

A endogлина foi relacionada ao potencial de colonização de células-tronco de vida longa (*Long-term Hematopoietic Stem Cells – Lt-HSC*) e ter propriedades associadas a precursores hematopoiéticos primitivos (PIRELLI et al., 2000). Mais recentemente, Della Porta et al. descreve que pacientes com síndromes mielodisplásicas tiveram uma expressão significativamente maior de endogлина em eritroblastos comparados com controles patológicos e saudáveis. No seguimento da radio/quimioterapia, é realizado rotineiramente o transplante de células-tronco hematopoiéticas para reconstituir o sistema hematopoiético dos pacientes oncológicos tratados. Para contornar os problemas de neutropenia e trombocitopenia como consequência de curto prazo do transplante, as células tronco mesenquimal (*Mesenchymal stem cells - MSC*)/células-tronco hematopoiéticas (*Hematopoietic stem cells - HSC*) é frequentemente usado (KOÇ, O.N et al, 2000). As MSCs representam uma população de células-tronco somáticas multipotentes presentes em vários tecidos, incluindo a medula óssea Seu fenótipo é caracterizado pela expressão de Endogлина entre outros marcadores. (DA SILVA MEIRELLES, L. et al, 2006).

Neste contexto, recentemente estudou o papel da endogлина nas leucemias agudas e demonstrou que a endogлина é encontrada distintamente expressa na grande maioria dos blastos leucêmicos em LLA e LMA, podendo ser considerada um marcador de leucemias agudas (DOURADO et al, 2017), no estudo ainda demonstraram que blastos positivos para endogлина apresentam maior atividade leucemogênica em comparação com sua contraparte negativa. Cosimato et al., 2018, analisando os diversos subtipos de LLAB, observou que apenas os tipos mais imaturos expressam o antígeno. Notavelmente, endogлина estava consistentemente

ausente em 'Burkitt-like' LLA-B com fenótipo maduro. A expressão de endogлина foi correlacionada com mau prognóstico em muitos tipos de neoplasias sólidas, no entanto, sua influência em neoplasias hematológicas ainda é uma área de forte interesse a ser explorada (A ELKHOLY et al., 2021).

A habilidade de iniciar leucemia em um modelo de xenotransplante foi restrita (LLA) ou enriquecida (LMA) na fração endogлина positiva. De forma interessante, este estudo revelou ainda que o bloqueio da endogлина em um modelo de LMA in vivo, utilizando anticorpo bloqueador TRC105, inibiu a progressão da leucemia após o estabelecimento da doença, mas em LLA, o TRC105 sozinho foi ineficaz devido a uma maior secreção da forma solúvel da endogлина (sENG). No entanto, tanto em LLA e LMA, TRC105 combinado com quimioterapia padrão, potencializou a inibição da progressão da doença, indicando que TRC105 pode representar uma nova opção terapêutica para LLA e LMA (DOURADO et al, 2017).

Tabela 2- Painel descritivo de anticorpos utilizado para triagem e diagnóstico.

Fluorocromos	Tubos									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
FITC	HLA-DR	CD45	CD2	CD7	CD64	CD8	CD36	CD15	CD9	MPO (cit)
PE	CD117	CD10	CD13	CD34	CD14	CD4	CD105	CD16	CD56	CD79a (cit)
PerCP-Cy 5.5	CD34	CD20	CD45	CD45	CD45	CD3	CD34	CD45	CD45	CD3 (cit)
APC	CD45	CD19	CD11b	CD123	CD300e	CD45	CD45	CD10	CD38	CD45

Fonte: Elaboração do autor, 2022.

Tabela 3 - Painel de anticorpos utilizado para Doença Residual Mínima.

Fluorocromos	Tubos						
	1	2	3	4	5	6	7
FITC	CD38	CD38	CD81	CD45	CD38	CD38	CD38
PE	CD34	CD13 +33	CD20	CD10	CD66c	CD73+ 304	CD10 5
PerCP-Cy 5.5	CD45	CD45	CD45	CD20	CD45	CD45	CD45
APC	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19	CD19

Fonte: Elaboração do autor, 2022.

## REFERÊNCIAS

A ELKHOLY, Rasha; FOUDA, Mohamed H; ELHAWARY, Eslam e; A ELKHOLY, Reem; A ELSHORA, Ola. Impact of CD105 Flow-Cytometric Expression on Childhood B Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal Of Blood Medicine**, [S.L.], v. 12, p. 147-156, mar. 2021.

ALBRIGHT, A.R.; KABAT, J.; LI, M.; RASO, F.; REBOLDI, A.; MUPPIDI, J.R. TGF $\beta$  signaling in germinal center B cells promotes the transition from light zone to dark zone. *J. Exp. Med.* **2019**, 216, 2531–2545.

ANSARI M, SAUTY G, LABUDA M, et al. Polymorphisms in multidrug resistance associated protein gene 4 is associated with outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. **Blood**. 2009;114:1383–1386.

ARBER, Daniel A.; ORAZI, Attilio; HASSERJIAN, Robert; THIELE, Jürgen; BOROWITZ, Michael J.; BEAU, Michelle M. Le; BLOOMFIELD, Clara D.; CAZZOLA, Mario; VARDIMAN, James W.. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [S.L.], v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 19 maio 2016. American Society of Hematology.

BELTRAME, MIRIAM & SOUTO, ELIZABETH & YAMAMOTO, MIHOKO & FURTADO, FELIPE & COSTA, ELAINE & SANDES, ALEX & PIMENTA, GLICÍNIA & JÚNIOR, GERALDO & SANTOS-SILVA, MARIA CLAUDIA & LORAND-METZE, IRENE & IKOMA-COLTURATO, MAURA. (2021). Updating recommendations of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX) for diagnosis of acute leukemias using four-color flow cytometry panels. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*. 43. 10.1016/j.htct.2021.04.001.

BERRY DA, Zhou S, Higley H, Mukundan L, Fu S, Reaman GH, Wood BL, Kelloff GJ, Jessup JM, Radich JP. Association of Minimal Residual Disease With Clinical Outcome in Pediatric and Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: A Meta-analysis. **JAMA Oncol**. 2017 Jul 13;3(7):e170580.

BÜHRING HJ, MÜLLER CA, LETARTE M, GOUGOS A, SAALMÜLLER A, VAN AGTHOVEN AJ, BUSCH FW. Endoglin is expressed on subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. **Leukemia**. 1991 Oct;5(10):841-7.

CAZAC, B.B.; ROES, J. TGF- $\beta$  Receptor Controls B Cell Responsiveness and Induction of IgA In Vivo. **Immunity** 2000, 13, 443–451.

CHALLEN, G.A.; BOLES, N.C.; CHAMBERS, S.M.; GOODELL, M.A. Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF- $\beta$  1. **Cell Stem Cell** 2010, 6, 265–278.

CHEN, C.-Z. et al. Non linear partial differential equation sand applications: Identification of endoglin as a functional marker that defines long term

repopulating hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15468–15473, 26 nov. 2002.

COSIMATO, Vincenzo; SCALIA, Giulia; RAI, Maddalena; GENTILE, Laura; CERBONE, Vincenza; VISCONTE, Feliciano; STATUTO, Teodora; VALVANO, Luciana; D'AURIA, Fiorella; CALICE, Giovanni. Surface endoglin (CD105) expression on acute leukemia blast cells: an extensive flow cytometry study of 1002 patients. **Leukemia&Lymphoma**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 2242-2245, 15 jan. 2018.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell Sci.** 2006, 119 Pt 11, 2204–2213.

DELLA PORTA, M G; MALCOVATI, L; INVERNIZZI, R; TRAVAGLINO, E; PASCUTTO, C; MAFFIOLI, M; A GALLÌ,; BOGGI, S; PIETRA, D; VANELLI, L. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastics syndrome. **Leukemia**, [S.L.], v. 20, n. 4, p. 549-555, 23 fev. 2006. Springer Science and Business Media LLC. Dong, M.; Blobel, G.C. Role of transforming growth factor- $\beta$  in hematologic malignancies. **Blood** 2006, 107, 4589–4596.

DOURADO, K. M. C., BAIK, J., OLIVEIRA, V. K. P., BELTRAME, M., YAMAMOTO, A., THEUER, C. P., FIGUEIREDO, C. A. V., VERNERIS, M. R., PERLINGEIRO, R. C. R. 2017. Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. **Blood**. 4;129(18):2526-2536.

FONSATTI, E.; NICOLAY, H. J.M.; ALTOMONTE, M.; COVRE, A.; MAIO, M.. Targeting cancer vasculature via endoglin/CD105: a novel antibody based diagnostic and therapeutic strategy in solid tumours. **Cardiovascular Research**, [S.L.], v. 86, n. 1, p. 12-19, 7 out. 2009. Oxford University Press (OUP).

FONSATTI, E.; SIGALOTTI, L.; ARSLAN, P.; ALTOMONTE, M.; MAIO, M. Emerging Role of Endoglin (CD105) as a Marker of Angiogenesis with Clinical Potential in Human Malignancies. **Current Cancer Drug Targets**, [S.L.], v. 3, n. 6, p. 427-432, 1 dez. 2003. Bentham Science Publishers Ltd.

GALLEGOS-ARREOLA, M. P. et al. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. **Intech**, p. 45–72, 2013.

INABA, H.; GREAVES, M.; MULLIGHAN, C. G. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**, 381: 1943–55, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA**. Tipos de Câncer, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em: 07 Jun. 2022.

J. TGF $\beta$  in Cancer. **Cell**, 134. 2008.

JABBOUR, Elias; O'BRIEN, Susan; KONOPLEVA, Marina; KANTARJIAN, Hagop. New insights in to the pathophysiology and therapy of adult acute

lymphoblastic leukemia. **Cancer**, [S.L.], v. 121, n. 15, p. 2517-2528, 17 abr. 2015.

JACOBSEN, S.; KELLER, J.; RUSCETTI, F.; KONDAIAH, P.; ROBERTS, A.; FALK, L. Bidirectional effects of transforming growth factor beta (TGF-beta) on colony-stimulating factor-induced human myelopoiesis in vitro: Differential effects of distinct TGF-beta isoforms. **Blood** 1991, 78, 2239–2247.

KOÇ, O.N.; GERSON, S.L.; COOPER, B.W.; DYHOUSE, S.M.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; LAZARUS, H.M. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. **J. Clin. Oncol.** 2000, 18, 307–316.

LANGER, J.C.; HENCKAERTS, E.J.V.; ORENSTEIN, J.; SNOECK, H.-W. Quantitative Trait Analysis Reveals Transforming Growth Factor- $\beta$ 2 as a Positive Regulator of Early Hematopoietic Progenitor and Stem Cell Function. **J. Exp. Med.** 2004, 199, 5–14.

LARSSON, J.; BLANK, U.; HELGADOTTIR, H.; BJÖRNSSON, J.M.; EHINGER, M.; GOUMANS, M.-J.; FAN, X.; LEVÉEN, P.; KARLSSON, S. TGF-  $\beta$  signaling-deficient hematopoietic stem cells have normal self-renewal and regenerative ability in vivo despite increased proliferative capacity in vitro. **Blood** 2003, 102, 3129–3135.

LEE, G.; ELLINGSWORTH, L.R.; GILLIS, S.; WALL, R.; KINCADE, P.W. Beta transforming growth factors are potential regulators of B lymphopoiesis. **J. Exp. Med.** 1987, 166, 1290–1299.

LI, R.; ROSENDAHL, A.; BRODIN, G.; CHENG, A.M.; AHGREN, A.; SUNDQUIST, C.; KULKARNI, S.; PAWSON, T.; HELDIN, C.-H.; HEUCHEL, R. Deletion of Exon I of SMAD7 in Mice Results in Altered B Cell Responses. **J. Immunol.** 2006, 176, 6777–6784.

LØMO, J.; BLOMHOFF, H.K.; BEISKE, K.; STOKKE, T.; SMELAND, E.B. TGF-beta 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. **J. Immunol.** 1995, 154, 1634–1643.

MENICHELLA, GIACOMO; RUMI, CARLO. CD34+/CD105+ cells are enriched in primitive circulating progenitors residing in the G0 phase of the cell cycle and contain all bone marrow and cord blood CD34+/CD38low/–precursors. **British Journal Of Haematology**, [S.L.], v. 108, n. 3, p. 610-620, mar. 2000. Wiley.

MEURER SK, WEISKIRCHEN R. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. **Int J Mol Sci.** 2020 Dec 3;21(23):9247. doi: 10.3390/ijms21239247. PMID: 33287465; PMCID: PMC7729465.

OTTMANN, O.; PELUS, L.M. Differential proliferative effects of transforming growth factor-beta on human hematopoietic progenitor cells. **J. Immunol.** 1988, 140, 2661–2665.

PAUL, SHILPA; KANTARJIAN, HAGOP; JABBOUR, ELIAS J..Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, [S.L.], v. 91, n. 11, p. 1645-1666, nov. 2016. Elsevier BV.

PETERS, John M.; ANSARI, M. Qasim. Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 135, n. 1, p. 44-54, 1 jan. 2011. Archives of Pathology and Laboratory Medicine.

PIRELLI, Luca; SCAMBIA, Giovanni; BONANNO, Giuseppina; RUTELLA, Sergio; PUGGIONI, Pierluigi; BATTAGLIA, Alessandra; MOZZETTI, Simona; MARONE, Maria; MARION ROQUES, CHARLES DURAND, RODOLPHE GAUTIER, PIERRE-YVES CANTO, LAURENCE PETIT-COCAULT, LAURENT YVERNOGEOU, DOMINIQUE DUNON, MICHÈLE SOUYRI, THIERRY JAFFREDO. Endoglin expression level discriminates long-term hematopoietic from short-term clonogenic progenitor cells in the aorta. **Haematologica** 2012;97(7):975-979; <https://doi.org/10.3324/haematol.2011.046235>.

PRONK, C. J. H. et al. Elucidation of the Phenotypic, Functional, and Molecular Topography of a Myeloerythroid Progenitor Cell Hierarchy. **CellStemCell**, v. 1, n. 4, p. 428–442, 11 out. 2007.

PUI CH, ROBISON LL, LOOK AT. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet** 2008;371:1030– 1043.

RA: Aberrantcytokinesignaling in leukemia. **Oncogene** 2007; 26:6738. RASHED, Wafaa M.; HAMZA, Mahmoud M.; MATBOLI, Marwa; SALEM, Sherinl..MicroRNA as a prognostic biomarker for survival in childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. **Cancer And Metastasis Reviews**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 771-782, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

REHMANN, J.A.; LEBIEN, T.W. Transforming growth factor- $\beta$  regulates normal human pre-B cell differentiation. **Int. Immunol.** 1994, 6, 315–322.

ROKHLIN OW, COHEN MB, KUBAGAWA H, LETARTE M, COOPER MD. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. **J Immunol.** 1995 May 1;154(9):4456-65.

SANTORO, A.; ANDREI, C.; BRYANT, C.; CALDERBANK, E.; WRAY, A.; BAXTER, J.E.; GODFREY, A.; LAURENTI, E.; RINGSHAUSEN, I. Chronic lymphocytic leukemia increases the pool of peripheral blood hematopoietic stem cells and skews differentiation. **Blood Adv.** 2020, 4, 6310–6314.

SATO, S.; SANJO, H.; TAKEDA, K.; NINOMIYA-TSUJI, J.; YAMAMOTO, M.; KAWAI, T.; MATSUMOTO, K.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. **Nat. Immunol.** 2005, 6, 1087–1095.

SEEGMILLER, Adam C.; KROFT, Steven H.; KARANDIKAR, Nitin J.; MCKENNA, Robert W..Characterization of Immunophenotypic Aberrancies in 200 Cases of B Acute Lymphoblastic Leukemia. **American Journal Of Clinical**

**Pathology**, [S.L.], v. 132, n. 6, p. 940-949, dez. 2009. Oxford University Press (OUP).

SING, G.K.; KELLER, J.R.; ELLINGSWORTH, L.R.; RUSCETTI, F.W. Transforming growth factor beta selectively inhibits normal and leukemic human bone marrow cell growth in vitro. **Blood** 1988, 72, 1504–1511.

SPENDER, L.; O'BRIEN, D.; SIMPSON, D.; DUTT, D.; GREGORY, C.; ALLDAY, M.; CLARK, L.; INMAN, G. TGF- $\beta$  induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-X L. **Cell Death Differ.** 2009, 16, 593–602.

STANULLA M, SCHRAPPE M. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. **SeminHematol** 2009;46:52–63.

STELLING, A.; HASHWAH, H.; BERTRAM, K.; MANZ, M.G.; TZANKOV, A.; MÜLLER, A. The tumor suppressive TGF- $\beta$  /SMAD1/S1PR2 signaling axis is recurrently inactivated in diffuse large B-cell lymphoma. **Blood** 2018, 131, 2235–2246.

STEVEN HS et al. WHO: classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edição. Lyon: **WHO**, 2017.

TERWILLIGER, T; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood Cancer Journal**, [S.L.], v. 7, n. 6, p. 577-577, jun. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

TZORTZATOU-STATHOPOULOU, Fotini; PAPADOPOULOU, Athina L.; MOSCHOVI, Maria; BOTSONIS, Athanasios; TSANGARIS, George T..Low Relapse Rate in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia After Risk-Directed Therapy. **Journal Of Pediatric Hematology/Oncology**, [S.L.], v. 23, n. 9, p. 591-597, dez. 2001. Ovid Technologies (WoltersKluwer Health).

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. Wood BLaB, MJ (2010) The flow cytometric evaluation of hematopoietic neoplasia. In: Clinical diagnosis and management by laboratory methods (Henry). W.B. Saunders **Chemico Biological Interactions**, v. 196, n. 3, p. 59–67, 5 abr. 2012.

ZAGO, Marco Antonio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013.



#### 4. CAPÍTULO 2 – Artigo Científico 1.

### **ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CD105 (ENDOGLINA) EM PRECURSORES LINFOIDES NORMAIS E EM BLASTOS NEOPLÁSICOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE CÉLULAS PRECURSORAS B**

**Geraldo P Sampaio<sup>2</sup>, Chaislan Igor da S Nascimento<sup>1</sup>, Eugênia Terra Granado Pina<sup>3</sup>, Roberto José Meyer<sup>2</sup>**

**Resumo:** A leucemia linfóide aguda (LLA), possui uma incidência bimodal, caracterizada pela perda de habilidade normal de diferenciação e proliferação, havendo um acúmulo de células progenitoras linfóides e expansão clonal em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos. É a mais comum na infância e adolescência, tendo diversos fatores associados à sua etiologia. O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. Nesse contexto, a análise da expressão de moléculas na curva maturativa de precursores linfóides normais e neoplásicos é uma ferramenta que contribui para elucidar o comportamento do ambiente medular na análise de Doença Residual Mensurável (DRM). A molécula endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor da família do *TGF- $\beta$*  que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese. Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é expressa nas células-tronco hematopoiéticas (CTH) e recentemente tem sido sugerida como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células precursoras B (LLA-cpB). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominados de hematogônias, e em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-cpB. O estudo foi realizado em amostras de pacientes onco-pediátricos do Hospital Aristides Maltez, Martagão Gesteira e Santa Casa de Itabuna, utilizando painéis pré-definidos para a análise da expressão do CD105. A aquisição dos eventos foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCalibur e as análises realizadas no software Infinicyt™ 9 1.8. As amostras dos pacientes, avaliados ao diagnóstico ou durante DRM, foram analisadas individualmente quanto à presença ou ausência da expressão antigênica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. O CD105, ao diagnóstico, foi expresso em 73,33% dos pacientes com LLA-cpB, tendo a maior expressão nos blastos leucêmicos. Já quando comparado com DRM, a maior expressão foi nas hematogônias em DRM negativa (67,28%), com média de intensidade de fluorescência (MIF) de 87,26. Quando analisado individualmente (paciente 1), os blastos tiveram uma maior expressão e MIF, 21,56% e 26,14, respectivamente. CD105 pode ser considerado um potencial marcador prognóstico para detecção de resposta à terapia de indução na infância LLA-B, e pode servir para otimizar as decisões para tratamento.

**Palavras-chave: Leucemia Linfoblástica Aguda B, pediátrico, CD105, imunofenotipagem.**

**ANALYSIS OF CD105 (ENDOGLIN) EXPRESSION IN NORMAL LYMPHOID PRECURSORS AND IN NEOPLASTIC BLASTS FROM PEDIATRIC PATIENTS WITH B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**Abstract:** Acute lymphocytic leukemia (*ALL*) has a bimodal incidence, characterized by loss of normal ability to differentiate and proliferate, with an accumulation of lymphoid progenitor cells and clonal expansion in bone marrow, peripheral blood, and other tissues. It is the most common in childhood and adolescence, with several factors associated with its etiology. The use of flow cytometry, in conjunction with morphological analysis, is essential for the diagnosis and follow-up of such diseases. In this context, the analysis of the expression of molecules in the maturation curve of normal and neoplastic lymphoid precursors is a tool that contributes to elucidating the behavior of the medullary environment in the analysis of Measurable Residual Disease (MRD). The endoglin molecule (ENG, CD105) is a co-receptor of the *TGF- $\beta$*  family that plays a crucial role in the regulation of angiogenesis. Although best known for its expression in endothelial cells, endoglin is also expressed in hematopoietic stem cells (*HSC*) and has recently been suggested as a marker of poor prognosis for pediatric patients with B Cell Precursor ALL (*BCP-ALL*). In this context, the present work evaluated the expression of CD105 in normal precursors of B cells, also called hematogonia, and in leukemic blasts from pediatric patients with BCP-ALL. The study was carried out on onco-pediatric patients samples from Hospital Aristides Maltez, Martagão Gesteira, and Santa Casa de Itabuna, using pre-defined panels for the analysis of CD105 expression. Events were acquired using a BD FACSCalibur flow cytometer and analyzes were performed using the Infinicyt™ 9 1.8 software. Patient samples, evaluated at diagnosis or during MRD, were individually analyzed for the presence or absence of antigenic expression of each marker used in flow cytometry. CD105, at diagnosis, was expressed in 73.33% of patients with BCP-ALL, with the highest expression in leukemic blasts. When compared with MRD, the highest expression was in hematogonia in negative MRD (67.28%), with a mean MFI of 87.26. When analyzed individually (patient 1), the blasts had a higher expression and MFI, 21.56 and 26.14, respectively. CD105 can be considered a potential prognostic marker for the detection of response to induction therapy in childhood BCP-ALL, and may serve to optimize treatment decisions.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia B, pediatric, CD105, immunophenotyping.

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA), também conhecida como leucemia linfóide aguda, é uma neoplasia hematológica maligna, caracterizada pela presença de mais de 20% de blastos neoplásicos em medula óssea e/ou sangue periférico (STEVEN et al., 2017), possui uma incidência bimodal (dois picos), o primeiro na infância e o segundo por volta dos 50 anos, caracterizada pela perda de habilidade normal de diferenciação e proliferação, havendo um acúmulo de células progenitoras linfóides e expansão clonal em medula óssea, sangue periférico e outros tecidos (JABBOUR et al., 2015). A LLA é a leucemia mais comum na infância e adolescência (INCA, 2020). No Brasil, estima-se que para câncer infantojuvenil, 4.150 novos casos de leucemia sejam diagnosticados para o sexo feminino e 4.310 para o sexo masculino, predominantemente LLA (INCA, 2020).

Diferentes fatores podem estar diretamente associados à etiologia das LLA, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais (WIEMELS, 2012). O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. Protocolos quimioterápicos podem levar à remissão da leucemia, mas eventos refratários e recidivas da patologia podem ocorrer, sendo essencial o monitoramento da resposta terapêutica. Tal acompanhamento é realizado através da avaliação da Doença Residual Mensurável (DRM), um protocolo de rotina que permite a identificação da presença de blastos leucêmicos em níveis muito baixos durante o tratamento, possibilitando a adequação do tratamento para baixo ou alto risco, e a indicação para transplante de medula óssea, quando necessário. Nesse contexto, a análise da expressão de moléculas na curva maturativa de precursores linfóides normais e neoplásicos é uma ferramenta que contribui para elucidar o comportamento do ambiente medular na análise de DRM (PETERS et al, 2011).

A molécula endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor da família do TGF- $\beta$  (do inglês *Transforming growth factor*  $\beta$ ) que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese (COSIMATO et al, 2018). Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é expressa nas células-tronco hematopoiéticas (HSC) (PRONK et al., 2007; CHEN et al., 2002). Em

2017, um estudo utilizando modelo de xenotransplante mostrou que os blastos positivos para endoglina (CD105) obtidos de pacientes com leucemia, apresentam maior capacidade leucemogênica do que blastos CD105 negativos. Outro trabalho muito recente sugere CD105 como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células precursoras B (LLA-cpB) (ELKHOLY ET AL, 2021). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominadas de hematogônias, e em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-B.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Pacientes e amostras**

Neste estudo foram incluídos 21 pacientes diagnosticados com LLA-cpB, com idade entre 0 e 18 anos, com amostras recebidas entre janeiro de 2019 a dezembro de 2021 no serviço de imunofenotipagem do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Aristides Maltez (HAM)/ Liga Bahiana Contra o Câncer. Como descrito no Quadro 1, entre os pacientes analisados, 9 apresentavam apenas amostras de diagnóstico, 6 apresentavam amostras de diagnóstico e de DRM coletadas em torno dos dias 15 (D15), 33 (D33) e/ou 78 do tratamento (D78), 2 desses pacientes também com amostras de recaída. E 6 pacientes apresentavam apenas amostras de DRM D78.

Os pacientes selecionados foram diagnosticados através do que é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (ARBER et al., 2016; WHO, 2017). O critério de diagnóstico foi baseado na apresentação clínica, hemograma completo, esfregaços morfológicos e imunofenotipagem de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP). Foi considerado leucemia aguda a presença de 20% ou mais de blastos na medula óssea ou no sangue periférico, avaliados através de esfregaços morfológicos. Dos participantes deste estudo foram obtidos dados demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, naturalidade, tipo de amostra utilizada no diagnóstico, percentual de blastos leucêmicos, leucometria, idade do início do tratamento.

### **2.2 Imunofenotipagem**

A análise de imunofenotipagem foi feita em amostras de MO e SP coletadas em tubos contendo EDTA. A LLA-cpB foi diagnosticada usando o painel de leucemia aguda, utilizado na rotina do laboratório, que incluiu as seguintes combinações de marcadores de superfície: HLA-DR/CD117/CD34/CD45, CD45/CD10/CD20/CD19, CD2/CD13/CD45/CD11b, CD7/CD33/CD45/CD123, CD64/CD14/CD45/CD300e, CD8/CD4/CD3/CD45, CD36/CD105/CD34/CD45, CD15/CD16/CD45/CD10, CD9/CD56/CD45/CD38, e o tubo contendo marcadores intracitoplasmáticos (cit) MPOcit/CD79acit/CD3cit/CD45. Para avaliação de DRM foi utilizado o painel com as seguintes combinações de marcadores de superfície: CD38/CD34/CD45/CD19, CD38/CD13+CD33/CD45/CD19, CD81/CD20/CD45/CD19, CD45/CD10/CD20/CD19, CD38/CD66c/CD45/CD19, CD38/CD73+CD304/CD45/CD19 e CD38/CD105/CD45/CD19.

Amostras de MO ( $10 \times 10^5$  / Leucograma) ou SP (50  $\mu$ L), foram marcadas com os anticorpos para moléculas de superfície referidos acima, e incubadas por 15 minutos (min) em temperatura ambiente (TA), em ambiente escuro. Em seguida, 500  $\mu$ L de FACS Lysing Solution® (BD Biosciences, CA, EUA) previamente diluído 1:10 em água destilada, foram adicionados às amostras que foram então incubadas por 15 min em TA, no escuro. As células foram lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e o sedimento foi suspenso na mesma solução. Nas marcações intracitoplasmáticas, após transcorrer o período de incubação do anticorpo de superfície, foi utilizado 50 $\mu$ L da solução de fixação (kit de fixação e permeabilização - FIX & PERM; Nordic Mubio), acondicionando as amostras em TA, no escuro, por 10 min. As células foram então lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e após adicionados 50 $\mu$ L da solução de permeabilização (kit de fixação e permeabilização - FIX & PERM; Nordic Mubio) ao sedimento, junto com os anticorpos para moléculas intracitoplasmáticas e incubação por 15 min, em TA, no escuro. As células foram então lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e o sedimento suspenso na mesma solução, seguindo-se aquisição das amostras. Pelo menos 30.000 eventos para diagnóstico e 500.000 eventos para DRM por tubo foram adquiridos no citômetro de fluxo de 4 cores BD FACSCalibur (BD Biosciences, CA,

EUA) e analisados usando o software Infinicyt™ 9 1.8 (Cytognos, 10 Salamanca, Espanha). A compensação dos diferentes fluorocromos foi previamente realizada, utilizando amostras de SP de pacientes não leucêmicos.

As populações de blastos leucêmicos, hematogônias, linfócitos maduros e plasmócitos foram identificadas com base na expressão da molécula CD45 *versus* características de granulidade interna (CD45 X SSC), além de CD45 X CD19, SSC X CD38 em conjunto com a expressão de outras moléculas. Marcadores foram considerados positivos em uma população celular, quando pelo menos 20% das células apresentarem sua expressão. Para avaliação da expressão da molécula CD105, utilizou-se a porcentagem de células marcadas e a média da intensidade de fluorescência (MIF). Como controle negativo para CD105, foi utilizada a população de linfócitos B maduros na mesma amostra, e como controle positivo a expressão em células vermelhas.

### 2.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o pacote de *software* GraphPad Prism version 9.0. As amostras dos pacientes incluídos no estudo, com diagnóstico de LLA-cpB, avaliados ao diagnóstico ou durante DRM foram analisadas individualmente quanto à presença ou ausência da expressão antigênica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a avaliação exploratória e descritiva dos dados, buscando identificar diferenças em subgrupos de pacientes de acordo com informações como idade, sexo, leucometria, faixa etária, e resultados de DRM.

### 2.4 Considerações éticas

Este projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 03826318.2.0000.5662 ICS/UFBA. Os pacientes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento por seus responsáveis legais.

## RESULTADOS

Este estudo foi conduzido avaliando 21 crianças diagnosticadas com LLA-cpB, sendo 11 meninas (52%) e 10 meninos (48%), com idades variando de 0 a 18 anos com um valor mediano 6,57 anos. Foram avaliadas 15 amostras ao diagnóstico e 20 amostras de DRM, coletadas em torno do D15, D33 e D78 do tratamento (Quadro 1).

QUADRO 1 - Dados demográficos e laboratoriais dos pacientes.

ID PACIENTE	FASE	SEXO	IDADE	AMOSTRA	%BLASTOS	LEUCOMETRIA (mm)
1	D	F	15	SP	72	34.810
1	D15	F	15	MO	2,6	28.790
1	D33	F	15	MO	0	57.420
1	D78	F	15	MO	0,74	17.880
1	R	F	15	MO	0	143.070
2	D	F	5	SP	39	8.120
2	D33	F	5	MO	0	11.600
2	D78	F	6	MO	0	30.710
3	D	F	18	SP	92	118.660
3	D15	F	18	MO	4	5.280
3	D33	F	18	MO	0	9.220
3	R	F	18	MO	46	121.150
4	D	M	0	MO	68	3.070
4	D15	M	0	MO	0,02	7.830
4	D33	M	0	MO	0	21.380
4	D78	M	1	MO	0,15	7.830
5	D	M	2	MO	75	31.180
5	D15	M	2	MO	0,05	49.290
5	D78	M	3	MO	0	57.000
6	D	F	6	SP	87	53.420

7	D	M	7	MO	47,4	2.130
8	D	F	3	MO	92,51	134.550
9	D	M	14	MO	88,38	484.300
10	D	M	4	MO	93	313.250
11	D	F	3	MO	62,47	41.250
12	D	M	15	MO	68,18	40.950
13	D	F	4	MO	82,35	9.050
14	D	M	4	MO	82,05	140.480
14	D15	M	4	MO	0,01	13.100
14	D78	M	4	MO	0	57.200
15	D	F	4	MO	76,54	15.040
16	D78	M	6	MO	0	63.000
17	D33	F	6	MO	0	48.800
18	D78	F	5	MO	0	13.390
19	D78	F	11	MO	0	11.200
20	D78	M	3	MO	2,76	75.200
21	D78	M	3	MO	7,8	32.200

Fonte: elaboração do autor, 2022.

Ao diagnóstico foi observada uma média de 75% de blastos, com mediana e média para a contagem total de leucócitos de 49,95 ( $\times 10/\text{mm}^3$ ) e 95,35 ( $\times 10/\text{mm}^3$ ). Entre as DRM, em D15 a média de blastos foi de 1,33%, em D78 3,37% e nas amostras de D33 não foram observados blastos.

Na figura 1 é mostrado um caso representativo de paciente leucêmico, onde são identificadas as populações presentes na amostra, e a expressão de CD105. As células blásticas LLA-cpB foram identificadas por expressão intermediária CD45, positiva de CD19, além de CD10 e/ou CD79a, e foi observada a presença de alterações imunofenotípicas em outros marcadores. Como controle negativo interno para marcação de CD105, foram utilizados linfócitos B maduros presentes em cada amostra, identificados pela alta expressão do CD45, expressão positiva para CD19 e negativa para CD38. Enquanto como controle positivo interno para CD105, foi utilizada a população eritroide, identificada por ser CD45 negativa e CD36 positiva.



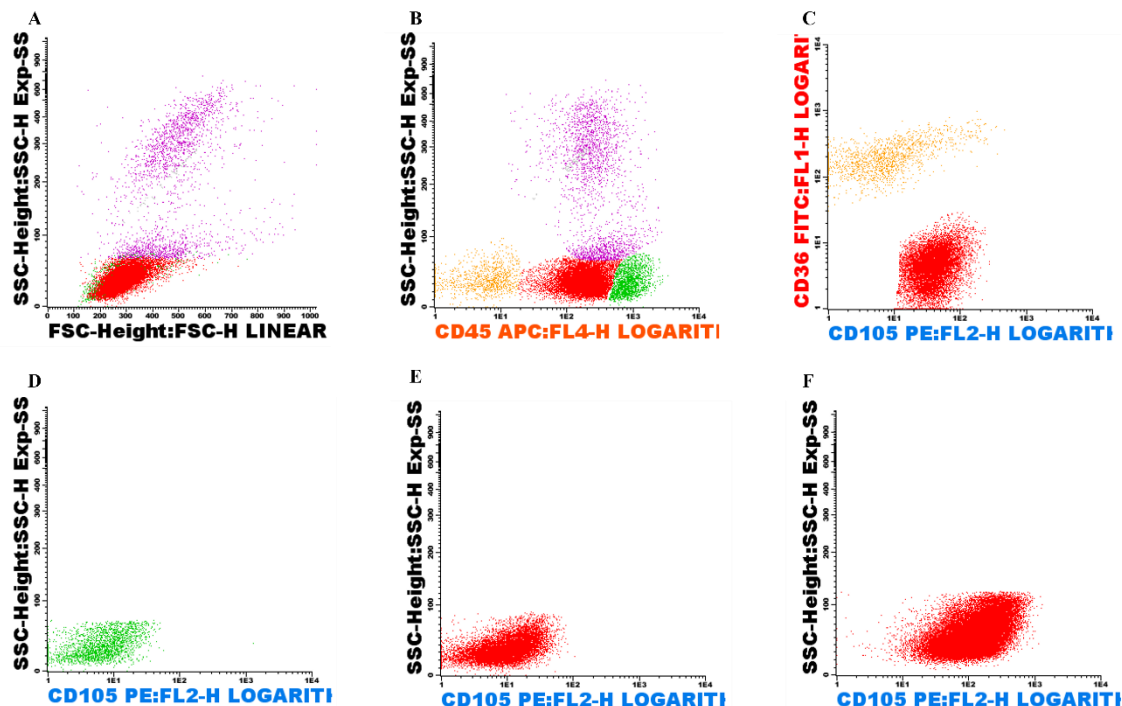


Figura 1. Caso representativo de diagnóstico e controles internos. Em A, as populações são separadas pelo tamanho e granulosidade (FSC x SSC). Em B, através do CD45 x SSC, é possível observar as populações de granulócitos (roxo), eritroide (laranja), blastos (vermelho) e linfócitos maduros (verde). Por meio do dot plot C observa-se as duas populações com positividade para o CD105 (eritroide e blastos). Os linfócitos maduros foram utilizados como controle interno negativo para CD105 (D). Os dot plots E e F, mostram blastos negativos e positivos para o CD105, respectivamente.

Quanto aos resultados da imunofenotipagem, o CD19 foi expresso em todos os casos 21/21 (100%) de LLA-cpB. Ao diagnóstico, CD105 foi detectada em 11/15 (73,33%) pacientes, e teve uma variação de expressão de 83,55 – 100%, com mediana do valor de percentual 97,48%. Em relação ao valor de MIF, observou-se uma mediana de 42,61%. A expressão de CD105 em relação ao MIF foi estratificada em baixa (< 20), intermediária ( $\geq 20 < 60$ ) e alta ( $\geq 60$ ). Sendo observados 33,33% dos casos com alta expressão, 26,66% com expressão intermediária e 13,33% com baixa expressão. (Figura 2 e Tabela 1).

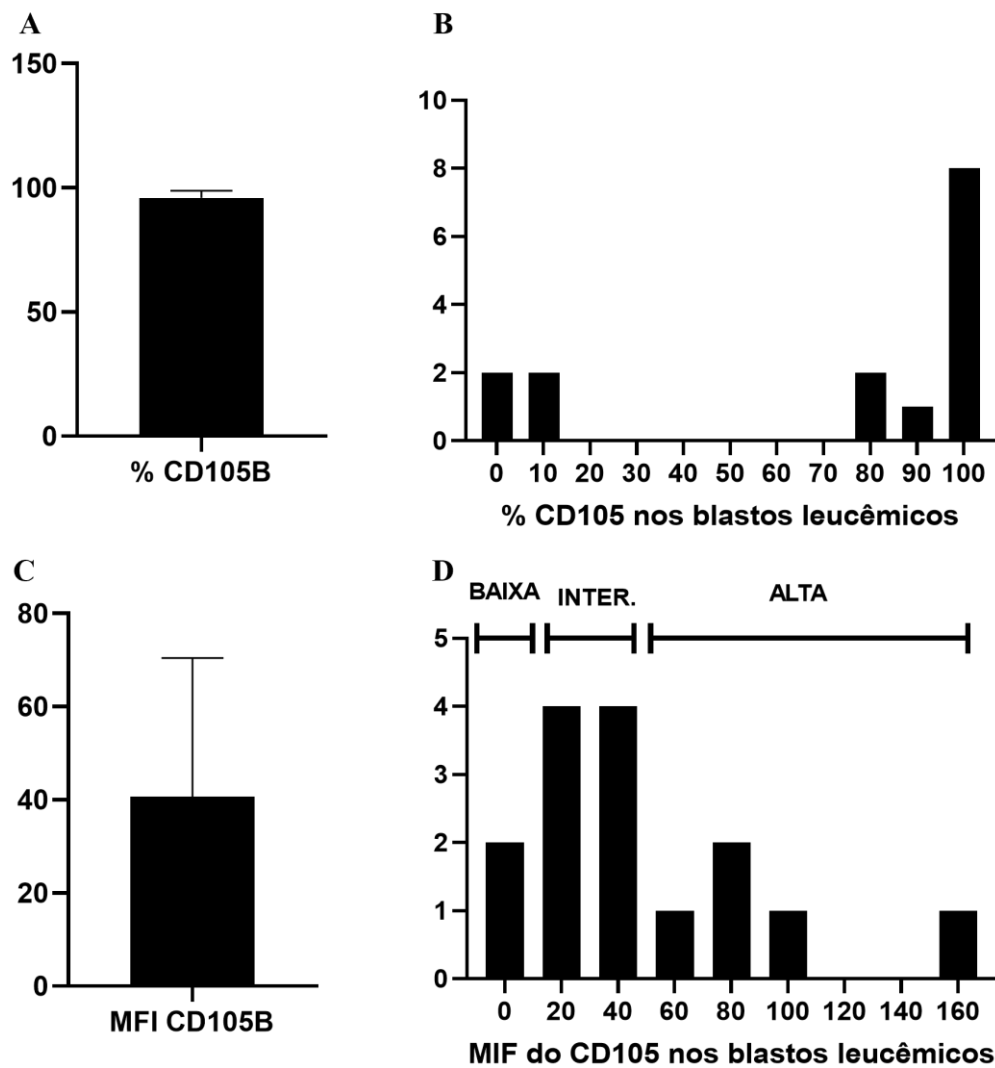


Figura 2. A) Mediana e intervalo interquartil da porcentagem de expressão de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. B) Distribuição de frequência da porcentagem de expressão de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. C) Mediana e intervalo interquartil dos valores de MIF de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. D) Distribuição de frequência dos valores de MIF de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência. Inter.: Intermediária.

Tabela 1. Expressão do antígeno CD105 de acordo com características demográficas e clínico-laboratoriais de pacientes com LLA-cpB.

Total (%)	n	%CD105		MIF CD105		
		CD105	CD105	Baixa	Intermediária	Alta
		Negativo (%)	Positivo (%)			
		n	n			
<b>Idade (anos)</b>						
1						
0-1 (4,76)		1 (100)	0	1	0	0
15						
2-10 (71,42)		2 (13,33)	13 (86,66)	2	7	6
5						
11-18 (23,80)		2 (40)	3 (60)	2	1	2
<b>Sexo</b>						
11						
Feminino (52,38)		4 (36,36)	7 (63,63)	4	3	4
10						
Masculino (47,61)		3 (30)	7 (70)	3	3	4
<b>Leucometria (X10<sup>9</sup>/L)</b>						
<50	13					
	(61,90)	4 (30,76)	9 (69,23)	4	6	3
≥50	8					
	(38,09)	2 (25)	6 (75)	2	1	5
<b>DRM D33</b>						
Negativo	4					
	(80)	3 (75)	1 (25)	3	0	1

Positivo	1 (20)	1 (100)	0	1	0	0
DRM D78						
Negativo	4 (57,14)	1 (25)	3 (75)	1	0	3
Positivo	3 (42,85)	1 (33,33)	2 (66,66)	1	1	1
Recaída						
Não	19 (90,47)	4 (21,05)	15 (78,94)	4	8	7
Sim	2 (9,52)	1 (50)	1 (50)	1	0	1
Total	21	6 (28,57)	15 (71,42)			

Fonte: elaboração do autor, 2022.

Avaliamos a expressão de CD105 durante o monitoramento de DRM dos pacientes. Para a identificação dos blastos e linfócitos maduros foi utilizada a mesma estratégia do diagnóstico. As hematogônias foram identificadas pela expressão intermediária da molécula CD45, heterogênea de CD10, alta expressão de CD38 e expressão de CD34 nas células mais imaturas. Os controles internos foram mantidos conforme descrito no diagnóstico. (Figura 3).

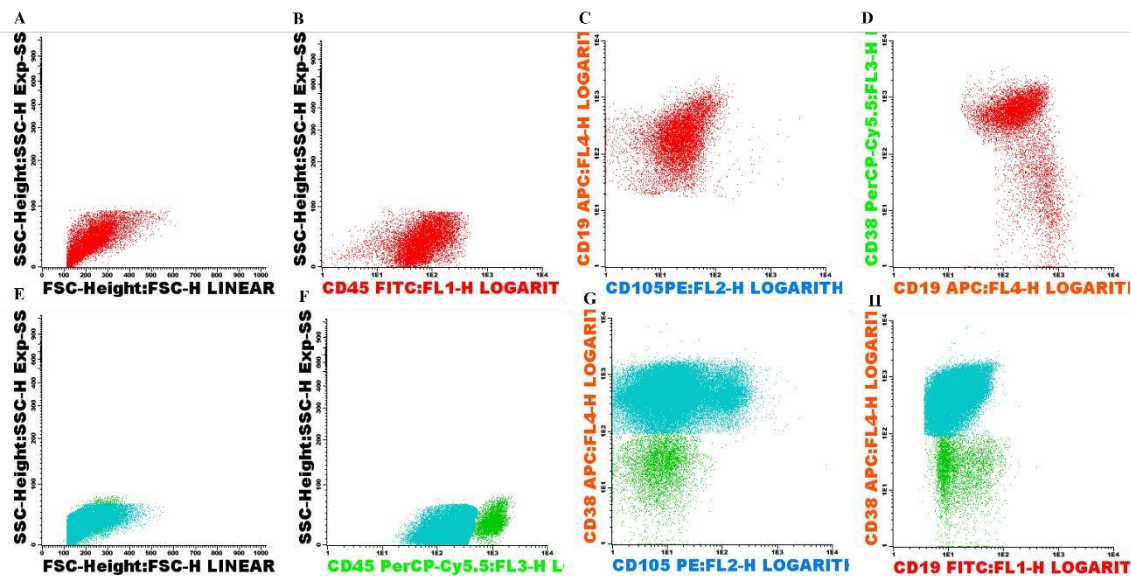


Figura 3. Caso representativo de Doença Residual Mínima (DRM), evidenciando blastos leucêmicos em vermelho, hematogônias (azul) e linfócitos maduros (verde).

Blastos de tamanho e complexidade baixa (A), CD45 intermediário (B), duplo positivo para CD19 e CD105 (C) e heterogênea para CD38 (D). Células de tamanho e complexidade baixa (E), em F, hematogônias (azul) CD45 intermediário e linfócitos maduros CD45 forte (verde). Hematogônias possuem expressão forte de CD38, e positividade para CD105, diferente dos linfócitos maduros, que é duplo negativo para ambos os marcadores (G). Em H, população de hematogônias em azul e linfócitos maduros B em verde.

Comparamos a expressão de CD105 nas populações celulares encontradas nas amostras de DRM (Figura 4). Entre as hematogônias de pacientes DRM-, observamos um maior percentual e maior MIF na expressão de CD105, em relação aos blastos e hemagonônias de pacientes DRM+, no entanto, tais aumentos não representam diferenças estatísticas em relação às outras duas populações citadas. Já entre os linfócitos B maduros, confirmamos a expressão negativa (abaixo de 20%) e MIF de baixa a intensidade negativa.

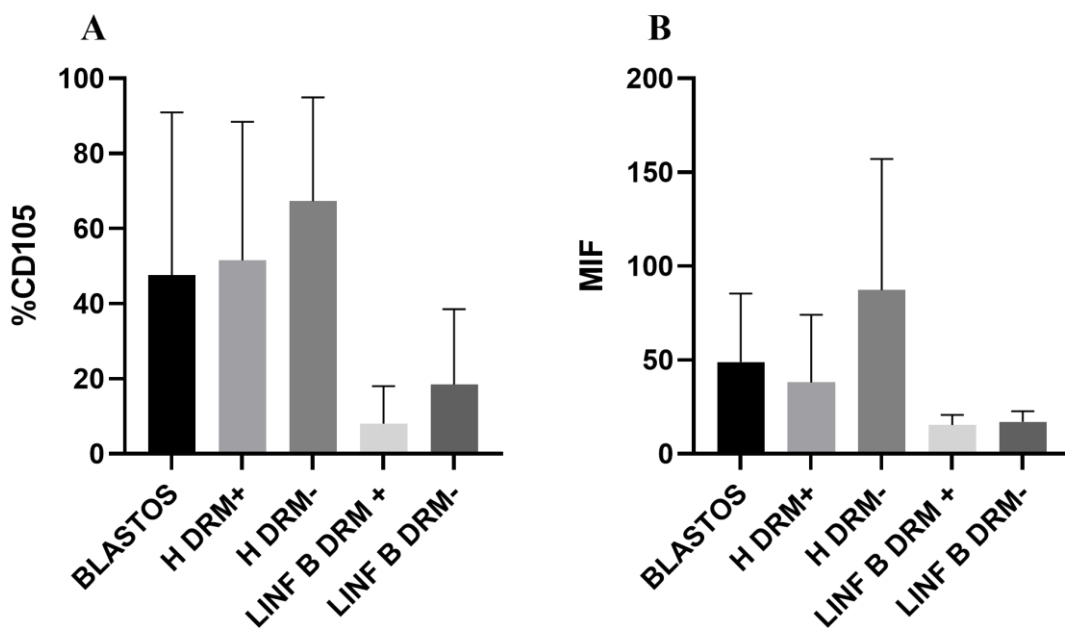


Figura 4. A) Média e desvio padrão da expressão de CD105 nas populações de células em DRM D78. B) Média e desvio padrão do MIF da expressão do CD105 nas populações em DRM D78.

Em um dos pacientes (paciente 1), foi possível avaliar a expressão de CD105 desde o diagnóstico até a recidiva (Figura 5). Observou-se que os blastos leucêmicos estiveram presentes em todas as avaliações tendo um aumento significativo da expressão do CD105 na recidiva. As hematogônias foram

encontradas apenas em D78, sendo a maior expressão do CD105 na análise. Os linfócitos maduros apresentaram uma variação da expressão de CD105, com média de 1,63%. A partir do MIF as amostras foram estratificadas em baixa expressão (D, D15, D33), intermediária (D78) e alta expressão (R). (Figura 5).

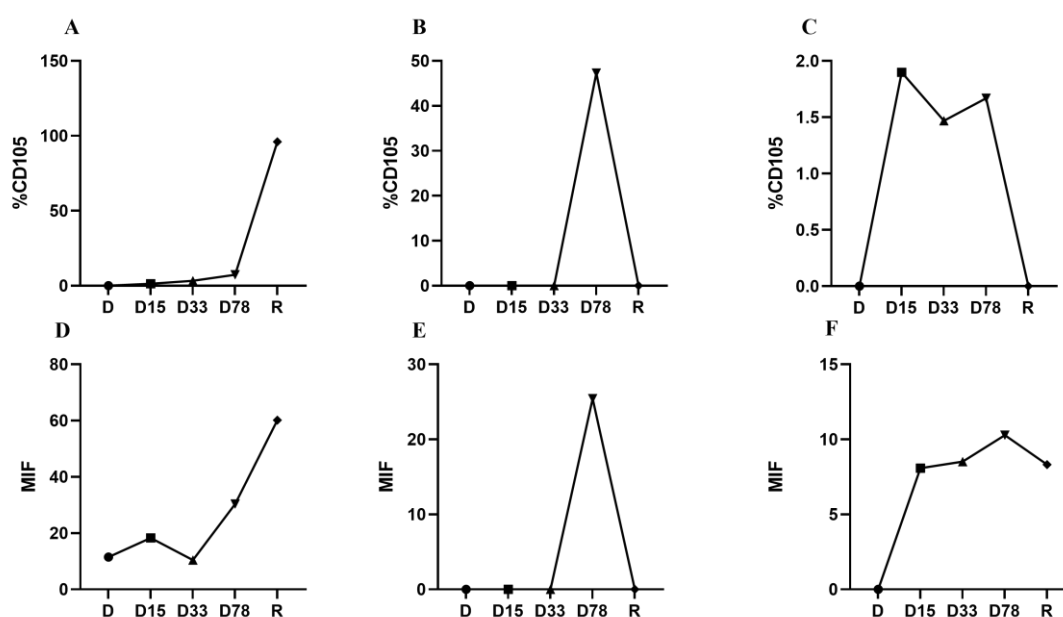


Figura 5. Caso representativo (paciente 1), avaliando a expressão e MIF do CD105 do seu diagnóstico à recidiva dentro das populações de blastos leucêmicos, hematogônias e linfócitos maduros. A) Expressão do CD105 nos blastos leucêmicos. B) Expressão do CD105 em hematogônias. C) Expressão do CD105 nos linfócitos maduros. D) Valores de MIF de CD105 nos blastos leucêmicos. E) Valores de MIF de CD105 em hematogônias. F) Valores de MIF de CD105 nos linfócitos maduros. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência.

## DISCUSSÃO

Novos alvos terapêuticos para LLA são urgentemente necessários e continuam sendo um desafio clínico (INABA et al., 2013). Embora progressos significativos tenham sido feitos na última década para o tratamento da LLA, em pacientes com LLA refratária ou recidivante, a quimioterapia de segunda linha mostrou um efeito ruim, raramente resultando em sobrevivência a longo prazo (ELKHOLY et al., 2021; DIAS et al., 2016). Assim, há uma necessidade crítica de novas opções terapêuticas, onde a imunoterapia, em especial com o uso de

anticorpos monoclonais, mostra resultados promissores com efeitos terapêuticos significativos e baixa toxicidade (FARHADFAR; LITZOW, 2016).

O CD105 ou endogлина é um receptor do TGF- $\beta$  tipo I e III, uma citocina pleiotrópica que rege a proliferação, diferenciação, migração e adesão celular. A endogлина é considerada um poderoso marcador da angiogênese e um potencial ator essencial na patogênese de doenças vasculares e na progressão tumoral (FONSATTI et al., 2001). CD105 é um alvo promissor, com potencial terapêutico para pacientes com tumores sólidos e outras doenças neoplásicas, que apresentam aumento da angiogênese (CHAKHACHIRO et al., 2013). Dourado et al. (2017), estudaram o uso de anticorpo monoclonal TRC105, específico para endogлина, em modelo de xenotransplante para o estabelecimento de leucemia aguda. Observaram que o anticorpo é capaz de inibir o desenvolvimento de leucemia a partir de blastos primários de LMA, além de inibirem a progressão da leucemia após o estabelecimento da doença, mas em LLA-cpB TRC105 sozinho foi ineficaz devido à presença de CD105 solúvel. No entanto, tanto em LLA quanto em LMA, TRC105 combinado com quimioterapia padrão, potencializou a inibição da progressão da doença, indicando que TRC105 pode representar uma nova opção terapêutica. Assim, a análise da expressão de CD105 pode ser de grande valia não só para avaliar o prognóstico, mas também a aplicação de terapia direcionada às leucemias agudas.

Nos estudos de Elkholy et al. (2021) a análise multivariada mostrou que a positividade de CD105 é um fator independente que está associado a um resultado desfavorável para terapia de indução, onde a maior taxa de falha de indução foi nos pacientes positivos para o CD105. Isso destaca a importância de CD105 como marcador prognóstico em LLA-cpB. Isso é comparável ao que Kauer et al. (2019) encontraram em seu estudo de CD105 em Leucemia Mieloide Aguda (LMA), onde foi observada uma correlação entre a expressão de CD105 e com resultados desfavoráveis e falhas de resposta à quimioterapia. Neste trabalho é recomendado o uso da expressão de CD105 como marcador prognóstico na LMA, o que poderia ajudar a otimizar o acompanhamento e as decisões de tratamento para esses pacientes. Os autores sugerem que o resultado desfavorável observado em pacientes com LMA CD105 positivos está relacionado à participação da molécula na desregulação das vias de sinalização dependentes de TGF- $\beta$  e independentes de

*TGF-β*, levando a um aumento na angiogênese, o que dá uma maior chance para sobrevivência de células malignas, com o aumento do risco de doença residual mensurável positiva.

Por mais que se saiba da expressão do CD105 nas leucemias, ainda é preciso melhorar os dados sobre a sua relação com o prognóstico (KAUER et al., 2019). Em nosso trabalho foi mostrada a expressão positiva de CD105 em 73,33% dos casos diagnosticados com LLA-cpB. Este resultado é um pouco mais elevado do que o apresentado por Cosimato et al. (2018), que relataram expressão positiva de CD105 em 68,4% dos casos de LLA-cpB e do que Elkholy et al. (2021), com 41,2% dos casos positivos. A expressão de CD105 nas hematogônias, tanto em pacientes com DRM positiva quanto negativa, mostra que a molécula pode estar relacionada ao processo de diferenciação normal de células B, o que não foi ainda mostrada na literatura. Tal avaliação traz ainda a possibilidade de uso da molécula na identificação de blastos leucêmicos como durante avaliação de DRM. Esses dados são ainda bastante iniciais, mas trazem dados novos e que podem contribuir tanto no diagnóstico e prognóstico das LLA-cpB, assim como no processo de diferenciação normal de precursores B.

Nosso estudo contribui com os conhecimentos sobre a expressão de CD105 em pacientes pediátricos com LLA-cpB, e amplia a discussão de sua utilização como marcador de DRM. O aumento do número de pacientes avaliados é uma importante perspectiva do estudo, de forma a ser possível avaliar a correlação da expressão da molécula com o prognóstico, e ter resultados mais contundentes da sua expressão na curva maturativa de linfócitos B.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com dados da literatura, e resultados observados em nosso trabalho, a molécula CD105 pode ser considerada um potencial marcador para o prognóstico de pacientes pediátricos com LLA-cpB, pode estar relacionada à maturação de células B, favorecendo uma otimização nas tomadas de decisões de tratamento para pacientes diagnosticados com LLA-cpB.



## REFERÊNCIAS

- ARBER, Daniel A.; ORAZI, Attilio; HASSERJIAN, Robert; THIELE, Jürgen; BOROWITZ, Michael J.; BEAU, Michelle M. Le; BLOOMFIELD, Clara D.; CAZZOLA, Mario; VARDIMAN, James W.. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [S.L.], v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 19 maio 2016. American Society of Hematology.
- CHAKHACHIRO, Zaher I.; ZUO, Zhuang; ALADILY, Tariq N.; KANTARJIAN, Hagop M.; CORTES, Jorge E.; ALAYED, Khaled; NGUYEN, Martin H.; MEDEIROS, L. Jeffrey; BUESO-RAMOS, Carlos. CD105 (Endoglin) Is Highly Overexpressed in a Subset of Cases of Acute Myeloid Leukemias. **American Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 140, n. 3, p. 370-378, 1 set. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1309/ajcpg8xh7zonakxk>.
- CHEN CZ, Li M, de Graaf D, et al. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci Usa**. 2002;99:15468–15473.
- COSIMATO, Vincenzo; SCALIA, Giulia; RAI, Maddalena; GENTILE, Laura; CERBONE, Vincenza; VISCONTE, Feliciano; STATUTO, Teodora; VALVANO, Luciana; D'AURIA, Fiorella; CALICE, Giovanni. Surface endoglin (CD105) expression on acute leukemia blast cells: an extensive flow cytometry study of 1002 patients. **Leukemia & Lymphoma**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 2242-2245, 15 jan. 2018.
- DIAS A, Kenderian SJ, Westin GF, Litzow MR. Novel Therapeutic Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**. 2016 Aug;11(4):253-64. doi: 10.1007/s11899-016-0326-1. PMID: 27101015.
- DOURADO KMC, Baik J, Oliveira VKP, Beltrame M, Yamamoto A, Theuer CP, Figueiredo CAV, Verneris MR, Perlingeiro RCR. Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. **Blood**. 2017 May 4;129(18):2526-2536. doi: 10.1182/blood-2017-01-763581. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28351936; PMCID: PMC5418640.
- ELKHOLY, Rasha; FOUDA, Mohamed H; ELHAWARY, Eslam e; A ELKHOLY, Reem; A ELSHORA, Ola. Impact of CD105 Flow-Cytometric Expression on Childhood B. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal Of Blood Medicine**, [S.L.], v. 12, p. 147-156, mar. 2021.

FARHADFAR N, Litzow MR. New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res.** 2016 Oct;49:13-21. doi: 10.1016/j.leukres.2016.07.009. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27521873.

FONSATTI, Ester; VECCHIO, Luigi del; ALTOMONTE, Maresa; SIGALOTTI, Luca; NICOTRA, Maria Rita; CORAL, Sandra; NATALI, Pier Giorgio; MAIO, Michele. Endoglin: an accessory component of the tgf- $\beta$ -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies.

**Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 188, n. 1, p. 1-7, 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1095>.

INABA H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet.** 2013 Jun 1;381(9881):1943-55. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62187-4. Epub 2013 Mar 22.

PMID: 23523389; PMCID: PMC3816716.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA

SILVA.**INCA**. Tipos de Câncer, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em

<<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>.

Acesso em: 07 Jun. 2022.

JABBOUR, Elias; O'BRIEN, Susan; KONOPLEVA, Marina; KANTARJIAN, Hagop.

New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia.

**Cancer**, [S.L.], v. 121, n. 15, p. 2517-2528, 17 abr. 2015.

KAUER, J., Schwartz, K., Tandler, C. et al. CD105 (Endoglin) como fator prognóstico negativo na LMA. **Sci Rep** 9, 18337 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54767x>.

PETERS, John M.; ANSARI, M. Qasim. Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 135, n. 1, p. 44-54, 1 jan. 2011.

PRONK, C. J. H. et al. Elucidation of the Phenotypic, Functional, and Molecular Topography of a Myeloerythroid Progenitor Cell Hierarchy. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 4, p. 428–442, 11 out. 2007.

SONG, Kui; LI, Min; XU, Xiaojun; XUAN, Li; HUANG, Guinian; LIU, Qifa. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 334-342, 17 maio 2016.

Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2016.4600>.

STEVEN HS et al. WHO: classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edição. Lyon: **WHO**, 2017.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia.

**Chemico Biological Interactions**, v. 196, n. 3, p. 59–67, 5 abr. 2012.

## 5. CAPÍTULO 3 – Artigo Científico 2.

### **EXPRESSÃO DE CD105 (ENDOGLINA) EM PRECURSORES LINFOIDES NORMAIS E EM BLASTOS NEOPLÁSICOS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA B NA INFÂNCIA**

Geraldo P Sampaio, Chaislan Igor da S Nascimento, Yasmim Cristina Ferreira de Almeida, , Keina Maciele Campos Dourado , Soraya Castro Trindade, Eugênia Terra Granado Pina, Roberto José Meyer

**Resumo:** A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o câncer mais frequente na infância e na adolescência, caracterizada pela proliferação clonal maligna de blastos leucêmicos acima de 20% na medula e/ou sangue periférico. No Brasil, estima-se que para câncer infantojuvenil, a maior parte corresponde ao sexo masculino, predominantemente LLA. O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. A molécula endogлина é um co-receptor da família do TGF- $\beta$  que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese. Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endogлина também é expressa nas células-tronco hematopoiéticas (CTH) e recentemente tem sido sugerida como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células precursoras B (LLA-cpB). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominadas de hematogônias, em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-B e Linfócito Maduros B. O estudo foi realizado em amostras de pacientes onco-pediátricos do Hospital Aristides Maltez, utilizando painéis pré-definidos para a análise da expressão do CD105. A aquisição dos eventos foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCalibur e as análises realizadas no software Infinicyt. As amostras dos pacientes, foram analisadas quanto à presença ou ausência da expressão antigênica de cada marcador. O CD105, ao diagnóstico, foi expresso em 48/58 (82,75%) paciente e apresentou uma média de expressão do MIF de 61,13 no total de blastos dos pacientes com LLA-cpB, tendo a maior expressão nos blastos leucêmicos. A mediana do MIF foi maior nas hematogônias quando comparado com as outras populações. CD105 pode, ser considerado um potencial marcador prognóstico para detecção de resposta à terapia de indução na infância LLA-B, servir para otimizar as decisões para tratamento e estar relacionado em outros processos biológicos.

**Palavras-chave:** Leucemia Linfoblástica Aguda B, pediátrico, CD105, imunofenotipagem.

## **CD105 (ENDOGLIN) EXPRESSION IN NORMAL LYMPHOID PRECURSORS AND NEOPLASTIC BLASTS IN CHILDHOOD B-ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

**Abstract:** Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most frequent cancer in childhood and adolescence, characterized by malignant clonal proliferation of leukemic blasts above 20% in the marrow and/or peripheral blood. In Brazil, it is estimated that for childhood cancer, most correspond to males, predominantly ALL. The use of flow cytometry, in conjunction with morphological analysis, is essential for the diagnosis and follow-up of such diseases. The endoglin molecule is a co-receptor of the TGF- $\beta$  family that plays a crucial role in the regulation of angiogenesis. Although best known for its expression in endothelial cells, endoglin is also expressed in hematopoietic stem cells (*HSC*) and has recently been suggested as a marker of poor prognosis for pediatric patients with B-precursor cell ALL (CpB-ALL). In this context, the present study evaluated the expression of CD105 in normal precursors of B cells, also called hematogonia, in leukemic blasts from pediatric patients with ALL-B and Mature B lymphocytes. Hospital Aristides Maltez, using predefined panels for the analysis of CD105 expression. Events were acquired using a BD FACSCalibur flow cytometer and analyzes were performed using Infinicyt software. Patient samples were analyzed for the presence or absence of antigenic expression of each marker. CD105, at diagnosis, was expressed in 48/58 (82.75%) and obtained an average expression of 61.13% of patients with ALL-cpB, with the highest expression in leukemic blasts. The MIF was higher in hematogonia when compared to the other populations. CD105 may be considered a potential prognostic marker for detecting response to childhood ALL-B induction therapy, serve to optimize treatment decisions, and be related to other biological processes.

**Keywords:** Acute Lymphoblastic Leukemia B, pediatric, CD105, immunophenotyping.

## 1 INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o câncer mais frequente na infância e na adolescência, caracterizada pela proliferação clonal maligna de blastos leucêmicos acima de 20% na medula e/ou sangue periférico (STEVEN et al., 2017). No Brasil, estima-se que para câncer infantojuvenil, a maior parte corresponde ao sexo masculino (4.310:4.150), predominantemente LLA (INCA, 2020), sendo que, 85% dos casos de LLA são derivados de linhagens de células B e 15% de linhagens de células T (PUI CH et al, 2008).

Cerca de 90% das LLA têm alteração de cariótipo ao diagnóstico, e diferentes fatores podem estar diretamente associados à sua etiologia, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais (WIEMELS, 2012). A FAB classificava as LLA pela morfologia (FAB L1, L2 ou L3), porém uma vez que a imunofenotipagem se mostrou mais útil na determinação do grau de diferenciação ou maturação da célula leucêmica, a classificação da OMS divide-as em neoplasias de precursor B ou T. O uso da citometria de fluxo, em conjunto com a análise morfológica, é fundamental para o diagnóstico e acompanhamento de tais enfermidades. Protocolos quimioterápicos podem levar à remissão da leucemia, mas eventos refratários e recidivas da patologia podem ocorrer, sendo assim, a identificação de novos marcadores prognósticos não apenas ajudará a aumentar a precisão da estratificação de risco dos pacientes, mas também minimizará as chances de recaída, otimizando a terapia nos estágios iniciais do tratamento (RASHED et al., 2019).

A molécula endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor acessório para TGF- $\beta$  uma citocina pleiotrópica que rege a proliferação, diferenciação, migração e adesão celular, sendo fundamental na angiogênese (COSIMATO et al, 2018). Endoglina é, portanto, sugerido como um marcador de angiogênese relacionada ao tumor e neovascularização. Os seus papéis no prognóstico, diagnóstico e o tratamento de neoplasias tem sido alvo de estudos (WIKSTROM P et al. 2002; WANG JM et al. 1994). Apesar de ser mais conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é encontrada expressa nas células-tronco hematopoiéticas (*HSC*) de todos os sítios hematopoiéticos, incluindo a medula óssea (PRONK et al. 2007; CHEN et al. 2005), onde é descrita como um marcador para *HSC* de longo prazo (CHENG et al. 2005; ROQUES et al. 2012). Um estudo baseado em análises de imunohistoquímica, encontrou endoglina altamente expressa na medula de pacientes com LMA (CHAKHACHIRO et al. 2013) e um estudo de expressão gênica identificou endoglina associada a pior prognóstico em crianças com LLA (CATCHPOOLE et al. 2007). Em 2017,

um estudo utilizando modelo de xenotransplante mostrou que os blastos positivos para endoglina (CD105) obtidos de pacientes com leucemia, apresentam maior capacidade leucemogênica do que blastos CD105 negativos. Outro trabalho muito recente sugere CD105 como marcador de mau prognóstico para pacientes pediátricos com LLA de células precursoras B (LLA-cpB) (ELKHOLY ET AL, 2021). Neste contexto, o presente trabalho avaliou a expressão do CD105 em precursores normais de células B, também denominadas de hematogônias, em blastos leucêmicos de pacientes pediátricos com LLA-B e Linfócito Maduros B.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Pacientes e amostras**

Neste estudo foram incluídos 58 pacientes diagnosticados com LLA-cpB, 9 pacientes controle , avaliados para o diagnóstico diferencial de doença oncohematológica, caracterizados como negativos com idade entre 0 e 18 anos, totalizando em 67 amostras recebidas entre janeiro de 2016 a dezembro de 2021 no serviço de imunofenotipagem do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Aristides Maltez (HAM)/ Liga Bahiana Contra o Câncer oriundos dos serviços de oncopediatria do Hospital Martagão Gesteira, Hospital Aristides Maltez e da Santa Casa da Misericórdia de Itabuna.

Os pacientes selecionados foram diagnosticados através do que é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (ARBER et al., 2016; WHO, 2017). O critério de diagnóstico foi baseado na apresentação clínica, hemograma completo, esfregaços morfológicos e imunofenotipagem de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP). Foi considerado leucemia aguda a presença de 20% ou mais de blastos na medula óssea ou no sangue periférico, avaliados através de esfregaços morfológicos. Dos participantes deste estudo foram obtidos dados demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, naturalidade, tipo de amostra utilizada no diagnóstico, percentual de blastos leucêmicos, leucometria, idade do início do tratamento.

### **2.2 Imunofenotipagem**

A análise de imunofenotipagem foi feita em amostras de MO e SP coletadas em tubos contendo EDTA. A LLA-cpB foi diagnosticada usando o painel de leucemia aguda, utilizado na rotina do laboratório, que incluiu as seguintes combinações de marcadores de superfície:

HLA-DR/CD117/CD34/CD45, CD45/CD10/CD20/CD19, CD2/CD13/CD45/CD11b, CD7/CD33/CD45/CD123, CD64/CD14/CD45/CD300e, CD8/CD4/CD3/CD45, CD36/CD105/CD34/CD45, CD15/CD16/CD45/CD10, CD9/CD56/CD45/CD38, e o tubo contendo marcadores intracitoplasmáticos (cit) MPOcit/CD79acit/CD3cit/CD45. Para avaliação de DRM foi utilizado o painel com as seguintes combinações de marcadores de superfície: CD38/CD34/CD45/CD19, CD38/CD13+CD33/CD45/CD19, CD81/CD20/CD45/CD19, CD45/CD10/CD20/CD19, CD38/CD66c/CD45/CD19, CD38/CD73+CD304/CD45/CD19 e CD38/CD105/CD45/CD19. Amostras de MO ( $10 \times 10^5$  / Leucograma) ou SP (50  $\mu$ L), foram marcadas com os anticorpos para moléculas de superfície referidos acima, e incubadas por 15 minutos (min) em temperatura ambiente (TA), em ambiente escuro. Em seguida, 500  $\mu$ L de FACS Lysing Solution® (BD Biosciences, CA, EUA) previamente diluído 1:10 em água destilada, foram adicionados às amostras que foram então incubadas por 15 min em TA, no escuro. As células foram lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e o sedimento foi suspenso na mesma solução. Nas marcações intracitoplasmáticas, após transcorrer o período de incubação do anticorpo de superfície, foi utilizado 50 $\mu$ L da solução de fixação (kit de fixação e permeabilização - FIX & PERM; Nordic Mubio), acondicionando as amostras em TA, no escuro, por 10 min. As células foram então lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e após adicionados 50 $\mu$ L da solução de permeabilização (kit de fixação e permeabilização - FIX & PERM; Nordic Mubio) ao sedimento, junto com os anticorpos para moléculas intracitoplasmáticas e incubação por 15 min, em TA, no escuro. As células foram então lavadas em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, e o sedimento suspenso na mesma solução, seguindo-se aquisição das amostras. Pelo menos 30.000 eventos para diagnóstico e 500.000 eventos para DRM por tubo foram adquiridos no citômetro de fluxo de 4 cores BD FACSCalibur (BD Biosciences, CA, EUA) e analisados usando o software Infinicyt™ 9 1.8 (Cytognos, 10 Salamanca, Espanha). A compensação dos diferentes fluorocromos foi previamente realizada, utilizando amostras de SP de pacientes não leucêmicos.

As populações de blastos leucêmicos, hematogônias e linfócitos maduros foram identificadas com base na expressão da molécula CD45 *versus* características de granulocidade interna (CD45 X SSC), além de CD45 X CD19, SSC X CD38 em conjunto com a expressão de outras moléculas. Marcadores foram considerados positivos em uma população celular, quando pelo menos 20% das células apresentaram sua expressão. Para avaliação da expressão da molécula CD105, utilizou-se a porcentagem de células marcadas e

a média da intensidade de fluorescência (MIF). Como controle negativo para CD105, foi utilizada a população de linfócitos B maduros na mesma amostra, e como controle positivo a expressão em células vermelhas.

### 2.3. Análises estatísticas

Os dados foram analisados usando o pacote de *software* GraphPad Prism version 9.0 e SPSS estatísticas versão 24. As amostras dos pacientes incluídos no estudo, com diagnóstico de LLA-cpB, avaliados ao diagnóstico foram analisadas individualmente quanto à presença ou ausência da expressão antigênica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a avaliação exploratória e descritiva dos dados, buscando identificar diferenças em subgrupos de pacientes de acordo com informações como idade, sexo, leucometria, faixa etária. Foi realizada análise ANOVA com teste Post Hoc de Games-Howell.

### 2.4 Considerações éticas

Este projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa sob o número CAAE 03826318.2.0000.5662 ICS/UFBA. Os pacientes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento por seus responsáveis legais.

## 3 RESULTADOS

Este estudo foi conduzido avaliando 58 crianças diagnosticadas com LLA-cpB, sendo 30 meninas (51,72%) e 28 meninos (48,27%), com idades variando de 0 a 18 anos com um valor mediano 4 anos (**Tabela 1**). Foram avaliadas 58 amostras ao diagnóstico e 9 amostras de controle .



**Tabela 1. Expressão do antígeno CD105 de acordo com características demográficas de pacientes com LLA-cpB.**

	Total n (%)	%CD105		MIF CD105		
		CD105 Negativo n (%)	CD105 Positivo n (%)	Baixa	Intermediária	Alta
<b>Idade (anos)</b>						
0≥2	10 (17,24)	1 (10)	9 (90)	6	3	0
2≥10	39 (67,24)	8 (20,51)	31 (79,48)	17	9	5
10 - 18	9 (15,51)	1 (11,11)	8 (88,88)	7	1	0
<b>Sexo</b>						
Masculino	28 (48,27)	6 (21,42)	22 (78,57)	15	5	2
Feminino	30 (51,72)	4 (13,33)	26 (86,66)	15	8	3
<b>Leucometria (X10<sup>9</sup>/L)</b>						
<50	26 (63,41)	5 (19,23)	21 (80,76)	19	2	0
≥50	15 (36,58)	5 (33,33)	10 (66,66)	8	2	0
<b>Total</b>	58 (100)	10 (17,25)	48 (82,75)	30 62,5%	13 27,08%	5 10,41%
<b>Média MIF</b>	60,81	14,01	70,56	-	-	-
<b>Mediana MIF</b>	40,01	15,75	44,99	-	-	-

Fonte: elaboração do autor, 2023.

Ao diagnóstico foi observada nos blastos leucêmicos uma média de 60,81 e mediana de 40,01 de MIF. Quanto aos resultados da imunofenotipagem, o CD19 foi expresso em todos os casos 58/58 (100%) de LLA-cpB. Ao diagnóstico, CD105 foi detectada em 48/58 (82,75%) pacientes, e teve uma variação de expressão de 20% – 96%. Em relação ao valor de MIF no grupo CD105+\_, observamos uma média de 70,56 e mediana de 44,99 do MIF. Os pacientes que tiveram valores considerados negativos 10/48 (17,25%) observamos uma média do MIF de 14,01 e mediana de 15,75. Já no controles (Tabela 2.) foi observado uma média de 13,11% e mediana de 13% de células precursoras B, que evidenciaram a presença do CD105 juntamente com a população de células precursoras da linhagem linfóide B denominadas de hematogônias CD34+ onde foi detectada 9/9 (100%) pacientes, e teve uma

variação de expressão de 3,97% – 29,16% dentro desta população. Em relação ao valor de MIF do CD105, observamos uma média de 44,56 e mediana de 45,6 (Tabela 2).

**Tabela 2. Expressão do antígeno CD105 de acordo com as características demográficas e laboratoriais dos controles.**

	Idade (anos)			Sexo		Leucometria		Total	Média MIF	Mediana MIF
	0≥2	2≥10	10--18	Masculino	Feminino	<50	≥50			
<b>n</b>	4	3	2	5	4	3	6	9	44,56	45,6
<b>(%)</b>	(44,44)	(33,33)	(22,22)	(55,55)	(44,44)	(33,33)	(66,66)	(100)		

Fonte: elaboração do autor, 2023.

Na **figura 1** é mostrado um caso representativo de paciente leucêmico, onde são identificadas as populações presentes na amostra, e a expressão de CD105. As células blásticas LLA-cpB foram identificadas por expressão intermediária CD45, positiva de CD19, além de CD10 e/ou CD79a, e foi observada a presença de alterações imunofenóticas em outros marcadores. Como controle negativo interno para marcação de CD105, foram utilizados linfócitos B maduros presentes em cada amostra, identificados pela alta expressão do CD45, expressão positiva para CD19 e negativa para CD38. Enquanto como controle positivo interno para CD105, foi utilizada a população eritroide, identificada por ser CD45 negativa e CD36 positiva.

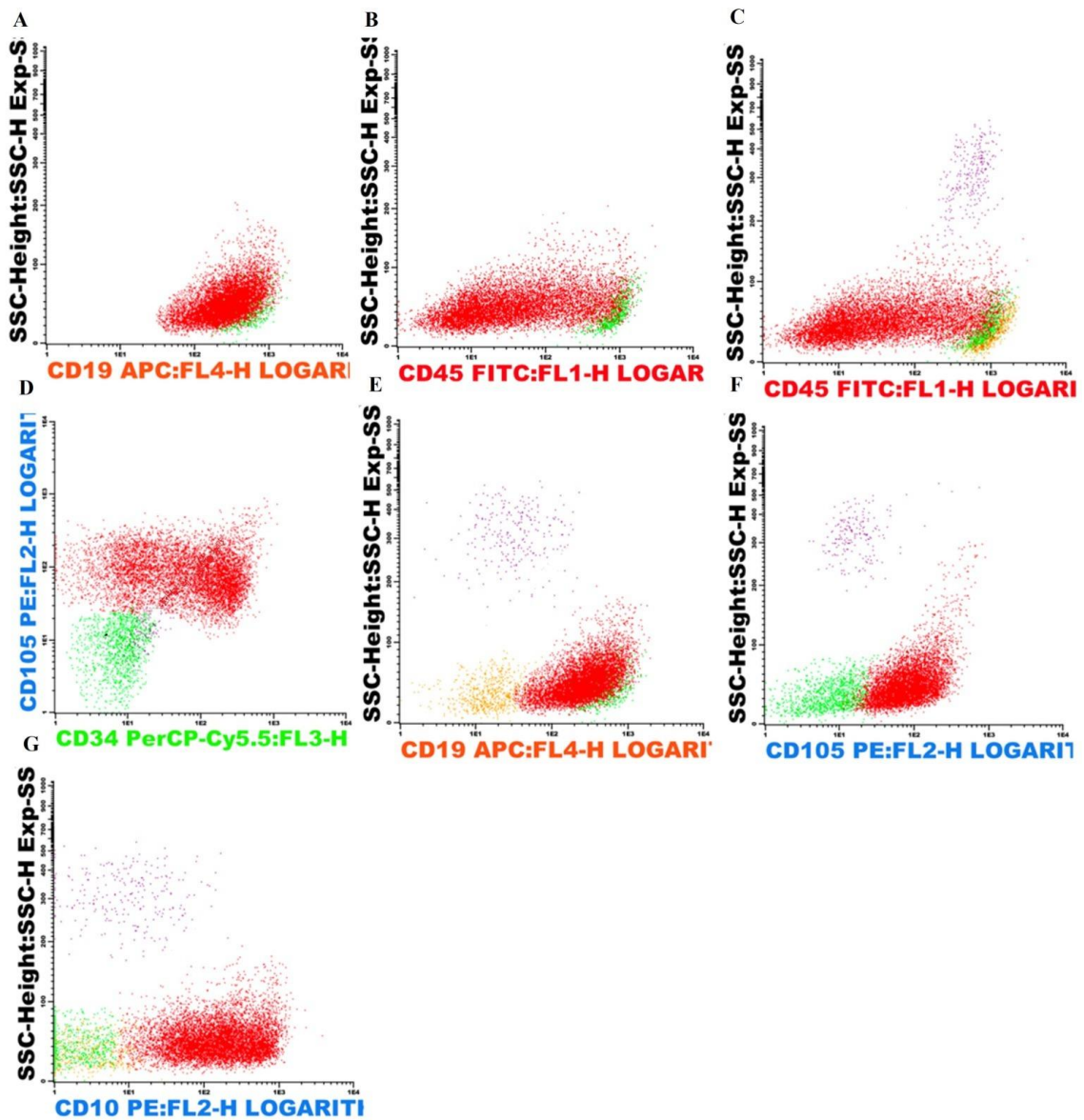


Figura 1. Caso representativo de diagnóstico e controles internos. Em A, as populações são separadas pelo granulocidade e fluorescência evidenciando a população de células doentes e linfócitos maduros presentes no material (SSC x CD19). Em B, através do CD45 x SSC, é possível observar as populações de blastos (vermelho) e linfócitos maduros (verde e laranja). Por meio do dot plot C Em B, através do CD45 x SSC, é possível observar total celular e as populações de granulócitos (roxo), blastos (vermelho) e linfócitos maduros (verde e laranja). Dot Plot de CD34 versus CD105, demonstrando a presença parcial de CD34 e expressão do CD105 (D). Segundo caso representativo mostrado em E, F e G. Em E, as populações são separadas pelo granulocidade e fluorescência evidenciando a população de células doentes e linfócitos maduros presentes no material e p total celular (SSC x CD19). Em A, as populações são separadas pelo granulocidade e fluorescência evidenciando a população de células doentes e linfócitos maduros presentes no material (SSC x CD19). Os dot plots F e G, representam positividade das células blásticas em vermelho para o CD105 e CD10, respectivamente.

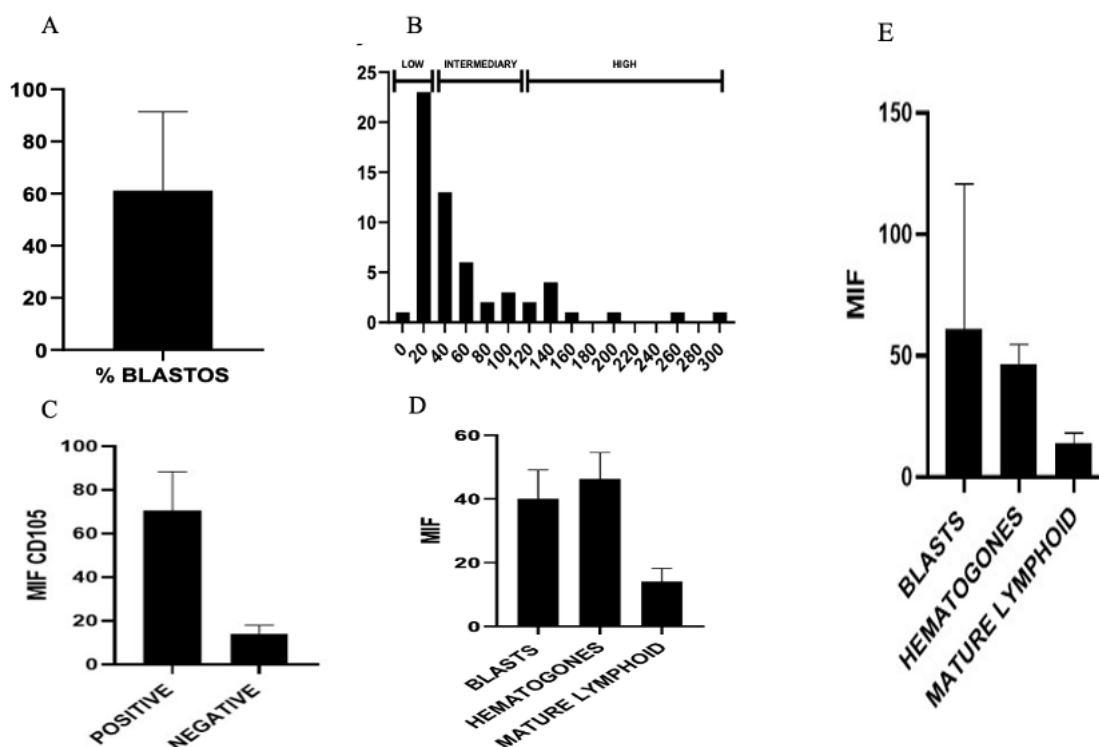


Figura 2. **A)** Mediana e intervalo interquartil da porcentagem de expressão de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. **B)** Distribuição de frequência dos valores de MIF de CD105 nos blastos leucêmicos de pacientes ao diagnóstico. MIF: Média de Intensidade de Fluorescência. Inter.: Intermediária. **C)** Média e intervalo interquartil dos valores de MIF de CD105 nos blastos leucêmicos positivos e negativos para o CD105 de pacientes ao diagnóstico. **D)** Mediana e intervalo interquartil dos valores de MIF de CD105 nos blastos, hematogônias e linfócitos maduros. **E)** Média e intervalo interquartil dos valores de MIF de CD105 nos blastos, hematogônias e linfócitos maduros.

Avaliamos também a expressão de CD105 nos indivíduos controles, nas hematogônias e linfócitos maduros desses indivíduos. Para a identificação de hematogônias e linfócitos maduros foi utilizada a mesma estratégia do diagnóstico. Nos casos controles identificamos as hematogônias pela presença do CD19 e expressão intermediária da molécula CD45, heterogênea de CD10, alta expressão de CD38 e expressão de CD34 nas células mais imaturas. Os controles internos foram mantidos conforme descrito no diagnóstico. **(Figura 3).**

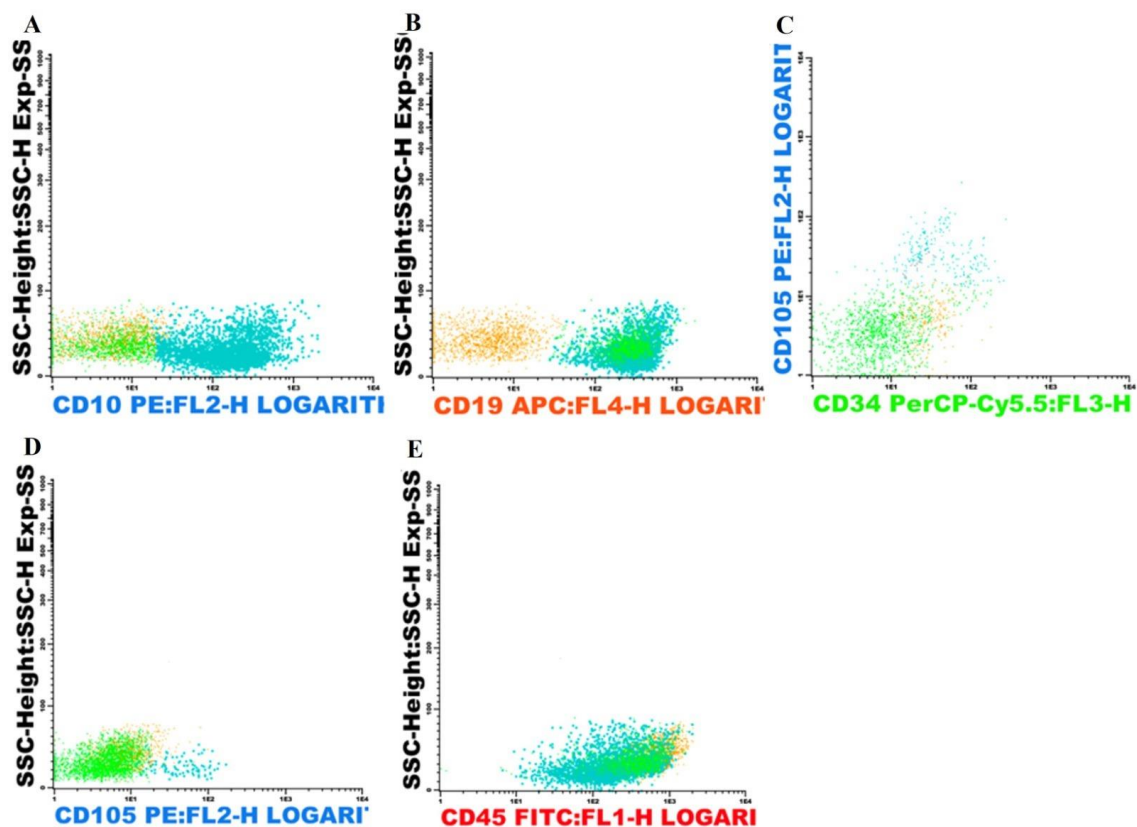


Figura 3. Amostra de individuo controle representado pelo de perfil de hematogônias (azul) e linfócitos maduros (verde). Hematogônias apresentando complexidade baixa e CD10 (SSC X CD10) (A), CD19 presente em diversas fases maturativas das células B precursoras e maduras (B), duplo positivo para CD105 e CD34 evidenciando a presença do CD105 em fase inicial das hematogônias (C) e positividade do CD105 com baixa complexidade associada aos percussores B (D).

Como observado na figura 2 D comparamos a mediana MIF do CD105 nas diferentes populações celulares encontramos diferença estatística significativa entre a população de linfócitos maduros em relação as hematogônias e blastos leucêmicos ( $p < 0.05$ ), contudo quando comparamos a mediana de MIF do CD105 nas populações de células precursoras B e células blasticas B, tais diferenças não representam diferenças estatísticas. Já entre os linfócitos B maduros, confirmamos a expressão negativa (abaixo de 20%) e MIF de baixa expressão.

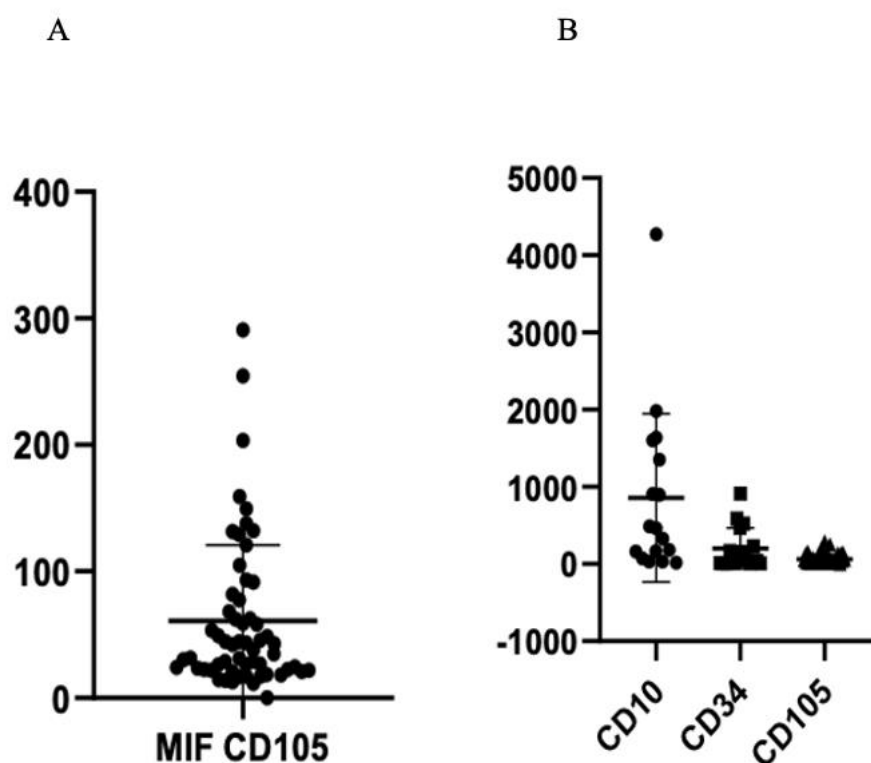


Figura 4. A) Média e desvio padrão da expressão de CD105 nas populações blastos . B) Média e desvio padrão do MIF da expressão do CD10, CD34 e CD105 nas populações de blastos.

Contudo, quando comparamos dentro do grupo de pacientes com LLA a expressão de CD105 em relação ao MIF (Tabela 1.) foi estratificada em baixa ( $20 \geq 60$ ), intermediária ( $60 \geq 140$ ) e alta (140-300). Sendo observados 10,41% dos casos com alta expressão, 27,08% com expressão intermediária e 62,5 % com baixa expressão (p 0.05).

#### 4 DISCUSSÃO

A leucemia linfoblástica aguda de células B (B-ALL) é o câncer pediátrico mais comum. Embora a taxa de cura realmente exceda 85%, o prognóstico dos pacientes recidivantes/refratários é sombrio. Dados recentes da literatura indicam que o microambiente da medula óssea (MO) pode desempenhar um papel crucial no início, manutenção e progressão da doença (FALLATI, A.; et al 2022).

O microambiente hematopoiético é composto por várias células e moléculas que regulam a hematopoiese. A disfunção nesse microambiente pode levar ao desenvolvimento de distúrbios hematológicos, como a LLA B. Estudos (MEURER SK, WEISKIRCHEN R; 2020)

recentes mostraram que a endogлина CD105, uma proteína de membrana expressa em células estromais, está envolvida na regulação do microambiente hematopoiético e pode desempenhar um papel na progressão da LLA B. Nos últimos anos, antecipou-se que a expressão/função da endogлина não se restringe aos precursores endoteliais. Especialmente sua expressão diferencial durante a hematopoiese defende um papel desse receptor no desenvolvimento de linhagens celulares individuais. Isso abre caminho para uma melhor compreensão da hematopoiese em geral, usando o CD105 como um marcador para purificar e analisar os estágios individuais das células de desenvolvimento durante a hematopoiese. Além disso, pode ser usado como marcador para identificar diferentes tipos de leucemia a partir da ocorrência de células precursoras no sangue periférico (MEURER SK, WEISKIRCHEN R; 2020).

A interação entre as células da LLA B e as células estromais no microambiente hematopoiético é crítica para a sobrevivência e proliferação das células leucêmicas. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a expressão de endogлина CD105 em células estromais está aumentada na LLA B e pode promover a sobrevivência das células leucêmicas por meio da ativação da via de sinalização do *TGF-β*. O fator transformador de crescimento  $\beta$  ( $TGF\beta$ ) é um dos mais importantes reguladores da hematopoiese e tem papel fundamental na regulação do equilíbrio entre proliferação e diferenciação nas células hematopoiéticas (TIMMINS, M.A.; RINGSHAUSEN, I.; 2022). Alterações na via do *TGFβ* são frequentemente encontradas na leucemia, embora a interrupção do *TGFβ* não seja suficiente para iniciar a transformação maligna. No entanto, a perda da sinalização de *TGFβ* por meio da inativação mutacional de componentes da via de sinalização ou pela modulação negativa de sua expressão pode ser um segundo golpe crítico que contribui para a manifestação da doença (KIM, S.J.; & LETTERIO, J.; 2003)

Estudos recentes (FALLATI, A.; et al 2022), mostraram que as células leucêmicas e as células estromais na LLA B liberam EVs que contêm proteínas e RNAs que podem afetar a sobrevivência, proliferação e quimiorresistência das células leucêmicas. Além disso, foi demonstrado que as EVs podem afetar a função das células estromais no microambiente hematopoiético, aumentando a expressão da endogлина CD105 e afetando a via de sinalização do *TGF-β* favorecendo assim o ambiente tumoral.

Nos estudos de Elkholy et al. (2021) a análise multivariada mostrou que a positividade de CD105 é um fator independente que está associado a um resultado desfavorável para

terapia de indução, onde a maior taxa de falha de indução foi nos pacientes positivos para o CD105. Isso destaca a importância de CD105 como marcador prognóstico em LLA-cpB. Isso é comparável ao que Kauer et al. (2019) encontraram em seu estudo de CD105 em Leucemia Mieloide Aguda (LMA), onde foi observada uma correlação entre a expressão de CD105 e com resultados desfavoráveis e falhas de resposta à quimioterapia. Neste trabalho é recomendado o uso da expressão de CD105 como marcador prognóstico na LMA, o que poderia ajudar a otimizar o acompanhamento e as decisões de tratamento para esses pacientes. Os autores sugerem que o resultado desfavorável observado em pacientes com LMA CD105 positivos está relacionado à participação da molécula na desregulação das vias de sinalização dependentes de TGF- $\beta$  e independentes de TGF- $\beta$ , levando a um aumento na angiogênese, o que dá uma maior chance para sobrevivência de células malignas, com o aumento do risco de doença residual mensurável positiva.

Por mais que se saiba da expressão do CD105 nas leucemias, ainda é preciso melhorar os dados sobre a sua relação com o prognóstico (KAUER et al., 2019). Em nosso trabalho foi mostrada a expressão positiva de CD105 em 82,75% dos casos diagnosticados com LLA-cpB. Esse resultado é um pouco mais elevado do que o apresentado por Cosimato et al. (2018), que relataram expressão positiva de CD105 em 68,4% dos casos de LLA-cpB e do que Elkholy et al. (2021), com 41,2% dos casos positivos.

A expressão de CD105 nas hematogônias, esteve presente em fase maturativa mais inicial das hematogônias juntamente com o CD34, onde evidenciamos a presença do CD105 em torno de de 13,11% com variação de expressão de 3,97% – 29,16% nas células precursoras B denominadas de hematogonias. Em relação ao valor de MIF do CD105, observamos uma média de 44,56 e mediana de 45,6 nestas células. O que demonstra que a molécula pode estar relacionada ao processo de diferenciação normal de células B, o que não foi ainda mostrada na literatura.

Tal avaliação traz ainda a possibilidade de uso da molécula na identificação de blastos leucêmicos durante avaliação de DRM. Dentro dos casos de LLA -cB ao diagnóstico, CD105 foi detectada em 48/58 (82,75%) pacientes, e teve uma variação de expressão de 20% – 96%. Em relação ao valor de MIF, observamos uma média de 70,56 e mediana de 44,99. Os pacientes que tiveram valores considerados negativos 10/48 (17,25%) observamos uma média de 14,01 e mediana de 15,75. A ausência de molécula também não deve ser deixada de lado, pois além de servir como marcador aberrantes na avaliação das DRM diferenciando por



exemplo precursores normais que expressam CD19+/CD34+/CD105+ de células blasticas aberrantes CD19+/CD34+/CD105- auxiliando no monitoramento e seguimento clínico do paciente durante a quimioterapia. Esta relação pode se dar também pela ausência do CD34 e presença do CD105 como ferramenta muito útil no diagnóstico e DRM. Esses dados são ainda bastante iniciais, mas trazem novas informações, que podem contribuir tanto no diagnóstico e prognóstico das LLA-cpB, assim como no processo de diferenciação normal de precursores B. Além das diferenças entre MIF do CD105, apresentam diferença significativa quando comparamos com o MIF de linfócitos maduros ( $p < 0,05$ ), também houve diferença significativa entre a intensidade de expressão desta molécula entre as células doentes permitindo assim correlacionar a expressão com baixa, média e a alta. Desta forma, podendo ser outro fator observacional na hora de uma avaliação para DRM.

Nosso estudo contribui com os conhecimentos sobre a expressão de CD105 em pacientes pediátricos com LLA-cpB, e amplia a discussão de sua utilização como marcador de DRM. O aumento do número de pacientes avaliados é um importante perspectiva do estudo, de forma a ser possível avaliar a correlação da expressão da molécula com o prognóstico, e ter resultados mais contundentes da sua expressão na curva maturativa de linfócitos B.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados desses estudos sugerem que a endoglina CD105 é um alvo terapêutico promissor na LLA-cpB e que a compreensão do papel da endoglina CD105 no microambiente hematopoiético pode ser útil no desenvolvimento de novas terapias. No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente a função da endoglina CD105 e sua interação com outras células e moléculas no microambiente hematopoiético na LLA B.

Além disso, é importante destacar que a modulação da endoglina CD105 pode ter efeitos em outros processos biológicos, não apenas na regulação do microambiente hematopoiético. Portanto, é crucial avaliar cuidadosamente os efeitos potenciais de terapias direcionadas à endoglina CD105 em outros sistemas biológicos antes de sua aplicação clínica.

## REFERÊNCIAS

ARBER, Daniel A.; ORAZI, Attilio; HASSERJIAN, Robert; THIELE, Jürgen; BOROWITZ, Michael J.; BEAU, Michelle M. Le; BLOOMFIELD, Clara D.; CAZZOLA, Mario; VARDIMAN, James W.. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasm and acute leukemia. **Blood**, [S.L.], v. 127, n. 20, p. 2391-2405, 19 maio 2016. American Society of Hematology.

CATCHPOOLE, D., A. LAIL, D. GUO, Q. R. CHEN, AND J. KHAN. 2007. 'Gene expression profiles that segregate patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia: an independent validation study identifies that endoglin associates with patient outcome', **Leuk Res**, 31: 1741-7.

CHAKHACHIRO, Zaher I.; ZUO, Zhuang; ALADILY, Tariq N.; KANTARJIAN, Hagop M.; CORTES, Jorge E.; ALAYED, Khaled; NGUYEN, Martin H.; MEDEIROS, L. Jeffrey; BUESO-RAMOS, Carlos. CD105 (Endoglin) Is Highly Overexpressed in a Subset of Cases of Acute Myeloid Leukemias. **American Journal Of Clinical Pathology**, [S.L.], v. 140, n. 3, p. 370-378, 1 set. 2013. Oxford University Press (OUP).

CHEN CZ, Li M, de Graaf D, et al. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci Usa**. 2002; 99:15468–15473.

CHENG, J., AND K. M. SAKAMOT. 2005. 'Topics in pediatric leucemia—acute myeloid leukemia', **Med Gen Med**, 7:20

COSIMATO, Vincenzo; SCALIA, Giulia; RAI, Maddalena; GENTILE, Laura; CERBONE, Vincenza; VISCONTE, Feliciano; STATUTO, Teodora; VALVANO, Luciana; D'AURIA, Fiorella; CALICE, Giovanni. Surface endoglin (CD105) expression on acute leukemia blast cells: an extensive flow cytometry study of 1002 patients. **Leukemia & Lymphoma**, [S.L.], v. 59, n. 9, p. 2242-2245, 15 jan. 2018.

DIAS A, Kenderian SJ, Westin GF, Litzow MR. Novel Therapeutic Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**. 2016 Aug;11(4):253-64. doi: 10.1007/s11899-016-0326-1. PMID: 27101015.

DOURADO KMC, Baik J, Oliveira VKP, Beltrame M, Yamamoto A, Theuer CP, Figueiredo CAV, Verneris MR, Perlingeiro RCR. Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. **Blood**. 2017 May 4;129(18):2526-2536. doi: 10.1182/blood-2017-01-763581. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28351936; PMCID: PMC5418640.

ELKHOLY, Rasha; FOU DA, Mohamed H; ELHAWARY, Eslam e; A ELKHOLY, Reem; A ELSHORA, Ola. Impact of CD105 Flow-Cytometric Expression on Childhood B. Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal Of Blood Medicine**, [S.L.], v. 12, p. 147-156, mar. 2021.

FALLATI, A.; DI MARZO, N.; D'AMICO, G.; DANDER, E. Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): An Ally of B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (B-ALL) Cells in Disease Maintenance and Progression within the Bone Marrow Hematopoietic Niche. **Cancers** 2022, 14,3303. <https://doi.org/10.3390/cancers14143303>

FARHAD FAR N, Litzow MR. New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**. 2016 Oct;49:13-21. doi: 10.1016/j.leukres.2016.07.009. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27521873.

FONSATTI, Ester; VECCHIO, Luigi del; ALTOMONTE, Maresa; SIGALOTTI, Luca; NICOTRA, Maria Rita; CORAL, Sandra; NATALI, Pier Giorgio; MAIO, Michele. Endoglin: an accessory component of the tgf- $\beta$ -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. **Journal Of Cellular Physiology**, [S.L.], v. 188, n. 1, p. 1-7, 2001.

INABA H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**. 2013 Jun 1;381(9881):1943-55.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA**. Tipos de Câncer, Rio de Janeiro, 2020. Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/infantil>>. Acesso em: 07 Jan. 2023.

JABBOUR, Elias; O'BRIEN, Susan; KONOPLEVA, Marina; KANTARJIAN, Hagop. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer**, [S.L.], v. 121, n. 15, p. 2517-2528, 17 abr. 2015.

KAUER, J., Schwartz, K., Tandler, C. et al. CD105 (Endoglin) como fator prognóstico negativo na LMA. **Sci Rep** **9**, 18337 (2019).

KIM, S.J.; LETTERIO, J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. **Leukemia** 2003, 17, 1731–1737.

MEURER SK, WEISKIRCHEN R. Endoglin: An 'Accessory' Receptor Regulating Blood Cell Development and Inflammation. **Int J Mol Sci**. 2020 Dec 3;21(23):9247. doi: 10.3390/ijms21239247. PMID: 33287465; PMCID: PMC7729465.

PETERS, John M.; ANSARI, M. Qasim. Multiparameter Flow Cytometry in the Diagnosis and Management of Acute Leukemia. **Archives Of Pathology & Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 135, n. 1, p. 44-54, 1 jan. 2011.

PRONK, C. J. H. et al. Elucidation of the Phenotypic, Functional, and Molecular Topography of a Myeloerythroid Progenitor Cell Hierarchy. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 4, p. 428–442, 11 out. 2007.

PUI CH, ROBISON LL, LOOK AT. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet** 2008;371:1030–1043.

RASHED, Wafaa M.; HAMZA, Mahmoud M.; MATBOLI, Marwa; SALEM, Sherin I.. MicroRNA as a prognostic biomarker for survival in childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. **Cancer And Metastasis Reviews**, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 771–782, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

ROQUES, M., C. DURAND, R. GAUTIER, P. Y. CANTO, L. PETIT-COCAULT, L. YVERNOGÉAU, D. DUNON, M. SOUYRI, AND T. JAFFREDO. 2012. 'Endoglin expression. Level discriminates long-term hematopoietic from short-term clonogenic progenitor cells in the aorta', **Haematologica**, 97:975-9.

SONG, Kui; LI, Min; XU, Xiaojun; XUAN, Li; HUANG, Guinian; LIU, Qifa. Resistance to chemotherapy is associated with altered glucose metabolism in acute myeloid leukemia. **Oncology Letters**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 334-342, 17 maio 2016. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2016.4600>.

STEVEN HS et al. WHO: classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edição. Lyon: **WHO**, 2017.

TIMMINS, M.A.; RINGSHAUSEN, I. Transforming Growth Factor-Beta Orchestrates Tumour and Bystander Cells in B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. **Cancers**2022,14,1772. [https:// doi.org/10.3390/cancers14071772](https://doi.org/10.3390/cancers14071772)

WANG JM, KUMAR S, PYE D, HABOUBI N AND AL-NAKIB L: Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. **J Natl Cancer Inst** 86: 386-388, 1994.

WIEMELS, J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chemico Biological Interactions**, v. 196, n. 3, p. 59–67, 5 abr. 2012. 1731–1737.

WIKSTROM P, LISSBRANT IF, STATTIN P, EGEVAD L AND BERGH A: Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. **Prostate** 51: 268-275, 2002.

## 6. ANEXOS COMISSÃO DE ETICA

### ANEXO A – APROVAÇÃO DO CAAE (PLATAFORMA BRASIL)

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

#### CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE:

03826318.2.0000.5662

Número do Parecer:

[Pesquisar](#)

*Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.*

#### DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Análise da frequência de variantes genéticas no gene da endoglina e expressão do CD105

Número do CAAE:

03826318.2.0000.5662

Número do Parecer:

5684349

Quem Assinou o Parecer:

Roberto Paulo Correia de Araújo

Pesquisador Responsável:

CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FC

Data Início do Cronograma:

01/10/2019

Data Fim do Cronograma:

31/12/2023

Contato Público:

CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FC

[Voltar](#)

## ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

A criança \_\_\_\_\_ (nome completo em letra de forma), sob sua responsabilidade, está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE DA ENDOGLINA E EXPRESSÃO DO CD105 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA B INFANTIL”. Antes de decidir pela participação na pesquisa, é importante que entenda o porquê a pesquisa será realizada e o que ela envolve. Por favor, dedique um tempo para ler atentamente as informações seguintes. Pergunte-nos se surgir alguma dúvida, se alguma informação não for clara ou caso necessite de maiores informações. Utilize o tempo que for necessário para decidir. A participação no estudo é voluntária e os dados fornecidos serão sigilosos.

Nesta pesquisa pretendemos **avaliar se as variantes genéticas no gene da endoglina podem estar associadas a um maior risco para leucemia e como se dá a expressão da endoglina nas células leucêmicas**. O motivo que nos leva a estudar é devido à possibilidade de **contribuir para a comunidade médica e científica na melhor compreensão da leucemia linfóide aguda B infantil**.

Para esta pesquisa adotaremos os seguintes procedimentos: **a partir da coleta de 10ml de amostras de sangue e/ou medula óssea colhidas na prática diagnóstica pelo Médico Oncologista e cedida ao estudo após o consentimento deste termo, ALÉM DISSO DEVEM SER COLHIDAS AMOSTRAS DE SALIVA COM O USO DE SWAB (UM PROCEDIMENTO SIMPLES, INDOLOR E NÃO INVASIVO), POSTERIORMENTE AS AMOSTRAS SERÃO ENCAMINHADAS PARA SEREM FEITAS AS ANÁLISES** necessárias para atingir os objetivos da pesquisa. Em seguida, essas amostras serão descartadas em resíduos apropriados para seu destino final e incineração. Devido o estudo envolver análise genética (estudo dos genes), é necessário que responda o Questionário de cor autodeclarada (Anexo A).

Informamos que podem não ocorrer benefícios clínicos diretos para a criança, mas a sua participação poderá colaborar para a comunidade médica e científica na melhor compreensão da leucemia linfóide aguda B infantil, vias de diagnóstico e tratamento.

Os riscos relacionados a este estudo se devem à eventual identificação do registro do participante, mas faremos um banco de dados que identificarão as amostras com números e o cadastro desses números só será acessado pelo grupo de pesquisa, garantindo, desta forma, o seu anonimato; durante a coleta de sangue para investigação clínica e diagnóstica você pode sentir dor no local, existe um pequeno risco de infecção e, muito raramente, algumas pessoas podem desmaiar após a agulha ter sido inserida ou retirada da pele, mas a equipe estará presente para tomar as medidas necessárias com vistas a reduzir qualquer eventualidade, como deitar o paciente para que a pressão sanguínea seja reestabelecida.

Para participar deste estudo a criança sob sua responsabilidade não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso seja identificado e comprovado danos provenientes desta pesquisa, a criança sob sua responsabilidade tem assegurado o direito a indenização.





**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

A criança deverá ser esclarecida sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. O (a) Sr. (a), responsável pela criança poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação da criança a qualquer momento. A participação dela é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido e cuidado pela equipe de saúde do Hospital.

Ao se tratar de crianças com idade igual ou inferior a 06 anos, deve haver o compromisso por parte do (a) Responsável e Pesquisador que está aplicando este Termo, em esclarecer a criança sobre os objetivos e etapas desta pesquisa de forma clara e adequada à sua idade, antes da sua inclusão neste estudo.

Caso o (a) Sr. (a) tenha alguma dúvida ou necessite de qualquer esclarecimento ou ainda deseje retirar-se da pesquisa, por favor, entre em contato com os pesquisadores: Pesquisador responsável – Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, Pesquisadores colaboradores – Yasmim Cristina Ferreira de Almeida ou Geraldo Pedral Sampaio, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde – 5º andar, Vale do Canela, CEP 40.110-902 Salvador, Bahia, Brasil, Telefone: (71) 3283-8921.

Também em caso de dúvida, o(a) senhor(a) poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP/ICS/UFBA), 4º andar, Vale do Canela.. Telefone: (71) 3283-8951.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O nome da criança sob sua responsabilidade ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. A criança sob sua responsabilidade não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, deverão ser assinados e rubricados em todas as páginas. Uma via deverá ser arquivada pelo pesquisador responsável, no Laboratório de Imunofarmacologia e Biologia Molecular (UFBA) e a outra será fornecida ao senhor. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a identidade da criança sob sua responsabilidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resolução Nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde), utilizando as informações somente para os fins acadêmicos e científicos.

Se você leu ou leram para você este termo e foi suficientemente informado(a) quanto a pesquisa, procedimentos, benefícios, riscos e retirou suas dúvidas, por favor preencha e assine o espaço abaixo:

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade no. \_\_\_\_\_ responsável pelo Menor \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa de maneira clara e detalhada. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de consentimento de participação do Menor sob minha responsabilidade, se assim o desejar. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.





**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_.

	<u>NOME</u> <u>(em letra de forma)</u>	<u>ASSINATURA:</u>	<u>POLEGAR</u> <u>(Se necessário)</u>
Participante/ Criança:	_____	_____	
Representante Legal:	_____	_____	
Pesquisador/ Profissional delegado:	_____	_____	
Testemunha: (Se aplicável)	_____	_____	

Em caso de desistência da criança sob minha responsabilidade em permanecer na pesquisa, autorizo que os seus dados já coletados referentes a resultados de exames, questionários respondidos e similares ainda sejam utilizados na pesquisa, com os mesmos propósitos já apresentados neste TCLE.

\_\_\_\_\_  
Nome completo e assinatura do Representante Legal

## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MAIORES DE 7 ANOS



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

### TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Como não há consenso nacional sobre qual a idade mínima para a aplicação do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, o CEP/ICS/UFBA decidiu em plenária que este Termo deverá ser aplicável a participantes da pesquisa com idade igual ou superior a 7 (sete) anos.

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa **"ANÁLISE DA FREQUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE DA ENDOGLINA E EXPRESSÃO DO CD105 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA B INFANTIL"**.

O nosso objetivo é entender se a endogлина (uma proteína) pode estar associada a um maior risco para a leucemia.

Para esta pesquisa iremos coletar **10 ml de amostras de sangue e/ou medula óssea colhidas pelo seu Médico Oncologista e cedida ao estudo após a sua liberação, ALÉM DISSO DEVEM SER COLHIDAS AMOSTRAS DE SALIVA COM O USO DE SWAB (UM PROCEDIMENTO SIMPLES, INDOLOR E NÃO INVASIVO). POSTERIORMENTE AS AMOSTRAS SERÃO ENCAMINHADAS PARA SEREM FEITAS AS ANÁLISES** necessárias para atingir os objetivos dessa pesquisa.

Além disso, é necessário que você responda o Questionário de cor autodeclarada (Anexo A).

Podem não ocorrer benefícios clínicos diretos para você, mas a sua participação é importante, pois assim, você poderá colaborar com a comunidade médica e científica na melhor compreensão da leucemia visando melhorar o diagnóstico e o tratamento.

Os riscos relacionados a este estudo se devem à eventual identificação do seu registro (como o seu nome), mas a equipe da pesquisa fará um banco de dados, garantindo, que o seu nome não será identificado. Além disso, durante a coleta de sangue e medula óssea você pode sentir dor no local, existe um pequeno risco de infecção e, muito raramente, algumas pessoas podem desmaiar após a agulha ter sido inserida ou retirada da pele, mas a equipe de saúde estará presente para evitar que isso ocorra, tomando todas as medidas necessárias.

Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição e do seu responsável quando finalizada. Em caso de desistência em permanecer na pesquisa, peça ao seu responsável que entre em contato com o grupo de pesquisa.



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

Caso você não tenha entendido alguma explicação ou não queira mais participar desta pesquisa, por favor, fale com os pesquisadores abaixo:

Pesquisador responsável - Camila Alexandrina Viana de Figueiredo, Pesquisadores colaboradores - Yasmim Cristina Ferreira de Almeida ou Geraldo Pedral Sampaio, Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, - Instituto de Ciências da Saúde - 5º andar, Vale do Canela, CEP 40.110-902 Salvador, Bahia, Brasil, Telefone: (71) 3283-8921.

Se você leu ou leram para você este termo e foi suficientemente informado(a) quanto a pesquisa, procedimentos, benefícios, riscos e retirou suas dúvidas, por favor preencha e assinie o espaço abaixo:

Eu, \_\_\_\_\_ (nome), portador(a) do documento de Identidade no. \_\_\_\_\_ (se já tiver documento), fui informado(a) dos objetivos deste trabalho, de maneira clara e detalhada e não tenho dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei pedir novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se achar melhor para mim. Tendo a autorização em participar do meu responsável já assinada, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi uma cópia deste documento assinado.

Salvador, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_\_.

	<u>NOME</u> (em letra de forma)	<u>ASSINATURA:</u>	<u>POLEGAR</u> (Se necessário)
Participante/ Criança:	_____	_____	
Representante Legal:	_____	_____	
Pesquisador/ Profissional delegado:	_____	_____	
Testemunha: (Se aplicável)	_____	_____	

## 7. APÊNDICE

### 7.1. Artigos publicados em 2016

> PLoS One. 2016 Sep 13;11(9):e0162793. doi: 10.1371/journal.pone.0162793. eCollection 2016.

#### Detection of IgG Anti-Leishmania Antigen by Flow Cytometry as a Diagnostic Test for Cutaneous Leishmaniasis

Geraldo Pedral-Sampaio <sup>1</sup>, Jessé S Alves <sup>2</sup>, Albert Schriefer <sup>2 3</sup>, Andréa Magalhães <sup>2</sup>, Roberto Meyer <sup>1</sup>, Marshall J Glesby <sup>4</sup>, Edgar M Carvalho <sup>2 3 5</sup>, Lucas P Carvalho <sup>2 3 5</sup>

Affiliations + expand

PMID: 27622535 PMCID: PMC5021300 DOI: 10.1371/journal.pone.0162793

Free PMC article

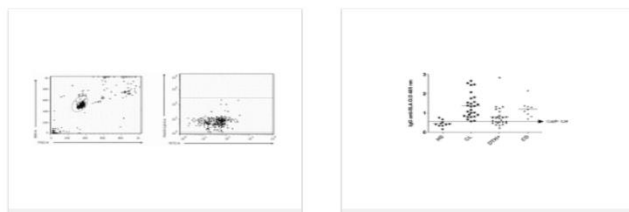
#### Abstract

Diagnosis of cutaneous leishmaniasis (CL) relies on clinical presentation, parasite isolation, histopathologic evaluation and positive Montenegro skin test. However, the low amounts of parasites in the lesion of these individuals make parasite isolation and histopathologic diagnosis unreliable, often leading to false-negative results. Also, 15% of people living in endemic areas have sub-clinical infection characterized by positive Montenegro skin test, which may contribute to misdiagnosis. Although the main Leishmania killing mechanism is through cell-mediated immune response, antibodies against Leishmania antigens are found in infected individuals. Here our goal was to develop a new serological technique using polystyrene microspheres sensitized with soluble Leishmania antigens as a tool for the detection of IgG in serum from CL patients by flow cytometry. To validate the assay we carried out a comparative test (ELISA) commonly used as a diagnostic test for parasitic diseases. To determine cross-reactivity we used serum from patients with Chagas disease, caused by a trypanosome that has several proteins with high homology to those of the Leishmania genus. We observed that the flow cytometry technique was more sensitive than the ELISA, but, less specific. Our results show that the flow cytometry serologic test can be used to confirm CL cases in *L. braziliensis* transmission areas, however, presence of Chagas disease has to be ruled out in these individuals.

#### Conflict of interest statement

The authors have declared that no competing interests exist.

#### Figures



#### FULL TEXT LINKS



#### ACTIONS

“ Cite

📁 Collections

#### SHARE



#### PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Conflict of interest statement

Figures

Similar articles

Cited by

References

MeSH terms

Substances

Related information

Grant support

LinkOut - more resources

> [Anticancer Drugs](#). 2016 Nov;27(10):960-9. doi: 10.1097/CAD.0000000000000413.

## The flavonoid apigenin from *Croton betulaster* Mull inhibits proliferation, induces differentiation and regulates the inflammatory profile of glioma cells

Paulo L C Coelho <sup>1</sup>, Mona N Oliveira, Alessandra B da Silva, Bruno P S Pitanga, Victor D A Silva, Giselle P Faria, Geraldo P Sampaio, Maria de Fatima D Costa, Suzana Braga-de-Souza, Silvia L Costa

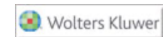
Affiliations + expand

PMID: 27622606 DOI: [10.1097/CAD.0000000000000413](https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000413)

### Abstract

This study aimed to investigate the antitumor and immunomodulatory properties of the flavonoid apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone), which was extracted from *Croton betulaster* Mull, in glioma cell culture using the high-proliferative rat C6 glioma cell line as a model. Apigenin was found to have the ability to reduce the viability and proliferation of C6 cells in a time-dependent and dose-dependent manner, with an IC<sub>50</sub> of 22.8 μmol/l, 40 times lower than that of temozolomide (1000 μmol/l), after 72 h of apigenin treatment. Even after C6 cells were treated with apigenin for 48 h, high proportions of C6 cells entered apoptosis (39.56%) and autophagy (22%) as shown by flow cytometry using annexin V/propidium iodide and acridine orange staining, respectively. In addition, the flavonoid apigenin induced cell accumulation in the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle and inhibited glioma cell migration efficiently. Moreover, apigenin induced astroglial differentiation and morphological changes in C6 cells, characterized by increased expression of glial fibrillary acidic protein and decreased expression of nestin protein, a typical marker of neuronal precursors. The immunomodulating effects of apigenin were also characterized by a change in the inflammatory profile as evidenced by a significant decrease in interleukin-10 and tumor necrosis factor production and increased nitric oxide levels. Because apigenin can induce differentiation, apoptosis, and autophagy, can alter the profile of cytokines involved in regulating the immune response, and can reduce the survival, growth, proliferation, and migration of C6 cells, this flavonoid may be considered a potential antitumor drug for the adjuvant treatment of malignant gliomas.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

“ Cite

📖 Collections

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

MeSH terms

Substances

Related information

LinkOut - more resources



REVISÕES DE LITERATURA

## PORPHYROMONAS GINGIVALIS E PERIODONTITE CRÔNICA - AVANÇOS RECENTES

Victor Hugo Rocha Leon\*, Ellen Karla Nobre dos Santos Lima\*\*, Ana Carla Montino Pimentel\*\*\*, Patrícia Mares de Miranda\*\*\*\*, Paulo Cirino de Carvalho Filho\*\*\*\*\*, Soraya Castro Trindade\*\*\*\*\*, Márcia Tosta Xavier\*\*\*\*\*

Autor correspondente: Ellen Karla Nobre dos Santos Lima - ellenobre@hotmail.com

\* Cirurgião-dentista

\*\* Cirurgiã-dentista. Doutoranda em Imunologia, Universidade Federal da Bahia

\*\*\* Periodontista. Doutoranda em Imunologia, Universidade Federal da Bahia

\*\*\*\* Cirurgiã-dentista. Mestranda em Imunologia, Universidade Federal da Bahia

\*\*\*\*\* Doutor em Imunologia. Professor Assistente da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

\*\*\*\*\* Doutora em Imunologia. Professora Titular da Universidade Estadual de Feira de Santana

\*\*\*\*\* Doutora em Bioquímica. Professora Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública

### Resumo

A periodontite é multifatorial e acomete os tecidos circundantes dos dentes. Sua etiologia inclui microrganismos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Este trabalho objetivou discutir o papel de *Porphyromonas gingivalis* na periodontite crônica. Foram pesquisadas as bases eletrônicas PubMed, BIREME e SciELO, buscando aspectos históricos e estudos publicados entre 2000 e 2015, usando, em português e inglês, os descritores: "Periodontite Crônica", "*Porphyromonas gingivalis*" e "Fatores de virulência". Foram encontrados 205 artigos e 24 foram incluídos. Foram selecionados registros sobre doenças periodontais dos primórdios civilizatórios até os dias atuais. Sua prevalência na população mundial permanece alta e diversas pesquisas abordam a etiopatogenia da doença. *P. gingivalis* é capaz de induzir resposta humoral e celular nos indivíduos infectados. Estudos sobre seus mecanismos de escape e fatores de virulência relatam dano tecidual consequente à resposta imuno-inflamatória exacerbada do hospedeiro que pode evoluir para edentulismo. Estudos da resposta imune a *P. gingivalis* sugerem seu papel na perpetuação do estado inflamatório por interferir na produção de citocinas e em mecanismos de morte celular em tecidos do hospedeiro, resultando em destruição tecidual. Os conhecimentos atuais sobre mecanismos de infecção e fatores de virulência de *P. gingivalis* indicam seu papel como componente-chave na periodontite crônica.

**Palavras-chave:** Periodontite Crônica; *Porphyromonas gingivalis*; Fatores de Virulência.

• Artigo submetido para avaliação em 20/03/2016 e aceito para publicação em 23/05/2016 •

DOI: 10.17267/2238-2720revbahianaodontov7i2.885



## 7.2. Artigos publicados em 2018

> [Neurotoxicology](#). 2018 Mar;65:85-97. doi: 10.1016/j.neuro.2018.02.001. Epub 2018 Feb 6.

### Agathisflavone, a flavonoid derived from *Poincianella pyramidalis* (Tul.), enhances neuronal population and protects against glutamate excitotoxicity

Cleide Dos Santos Souza <sup>1</sup>, Maria Socorro Grangeiro <sup>1</sup>, Erica Patricia Lima Pereira <sup>1</sup>, Cleonice Creusa Dos Santos <sup>1</sup>, Alessandra Bispo da Silva <sup>1</sup>, Geraldo Pedral Sampaio <sup>1</sup>, Daiana Dias Ribeiro Figueiredo <sup>2</sup>, Jorge Mauricio David <sup>3</sup>, Juceni Pereira David <sup>2</sup>, Victor Diogenes Amaral da Silva <sup>1</sup>, Arthur Morgan Butt <sup>4</sup>, Sílvia Lima Costa <sup>5</sup>

Affiliations + expand

PMID: 29425760 DOI: [10.1016/j.neuro.2018.02.001](#)

#### Abstract

Flavonoids are bioactive compounds that are known to be neuroprotective against glutamate-mediated excitotoxicity, one of the major causes of neurodegeneration. The mechanisms underlying these effects are unresolved, but recent evidence indicates flavonoids may modulate estrogen signaling, which can delay the onset and ameliorate the severity of neurodegenerative disorders. Furthermore, the roles played by glial cells in the neuroprotective effects of flavonoids are poorly understood. The aim of this study was to investigate the effects of the flavonoid agathisflavone (FAB) in primary neuron-glia co-cultures from postnatal rat cerebral cortex. Compared to controls, treatment with FAB significantly increased the number of neuronal progenitors and mature neurons, without increasing astrocytes or microglia. These pro-neuronal effects of FAB were suppressed by antagonists of estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ). In addition, treatment with FAB significantly reduced cell death induced by glutamate and this was associated with reduced expression levels of pro-inflammatory (M1) microglial cytokines, including TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL6, which are associated with neurotoxicity, and increased expression of IL10 and Arginase 1, which are associated with anti-inflammatory (M2) neuroprotective microglia. We also observed that FAB increased neuroprotective trophic factors, such as BDNF, NGF, NT4 and GDNF. The neuroprotective effects of FAB were also associated with increased expression of glutamate regulatory proteins in astrocytes, namely glutamine synthetase (GS) and Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1). These findings indicate that FAB acting via estrogen signaling stimulates production of neurons *in vitro* and enhances the neuroprotective properties of microglia and astrocytes to significantly ameliorate glutamate-mediated neurotoxicity.

**Keywords:** Anti-inflammatory; Flavonoid; Neuroprotection; Phytoestrogen.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

“ Cite

📖 Collections

SHARE



PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Similar articles

Cited by

Publication types

MeSH terms

Substances

Related information

LinkOut - more resources

> [Int Immunopharmacol.](#) 2018 Mar;56:51-57. doi: 10.1016/j.intimp.2018.01.012.  
Epub 2018 Jan 30.

## Th17 immune responses in Brazilian dyslipidemic patients with atherosclerosis

Mariana de Menezes Pereira <sup>1</sup>, Taciana Pereira Sant'Ana Santos <sup>1</sup>, Milena Santana Cabral <sup>1</sup>,  
Geraldo Pedral Sampaio <sup>1</sup>, Roque Aras Jr <sup>2</sup>, Paulo Ribeiro <sup>3</sup>, Ajax M Atta <sup>4</sup>

Affiliations + expand

PMID: 29353687 DOI: [10.1016/j.intimp.2018.01.012](#)

*No abstract available*

**Keywords:** Atherosclerosis; Cytokine; Dyslipidemia; Myocardial infarction; T lymphocytes; Th17 cells.

FULL TEXT LINKS



ACTIONS

“ Cite

📖 Collections

SHARE



PAGE NAVIGATION

---



## 7.3. Artigos publicados em 2019

> [Cytokine](#). 2019 Mar;115:24-31. doi: 10.1016/j.cyto.2018.12.005. Epub 2019 Feb 14.

### **Atherogenic cytokines and chemokines in chronic hepatitis C are not associated with the presence of cardiovascular diseases**

Taciana Pereira Sant'Ana Santos <sup>1</sup>, Mariana de Menezes Pereira <sup>1</sup>, Maria Isabel Schinoni <sup>2</sup>, Geraldo Pedral Sampaio <sup>1</sup>, Roque Aras Jr <sup>2</sup>, Maria Luiza Sousa Atta <sup>3</sup>, Ajax M Atta <sup>4</sup>

Affiliations + expand

PMID: 30771700 DOI: [10.1016/j.cyto.2018.12.005](#)

#### **Abstract**

There appears to be an associative link between chronic hepatitis C (CHC) and cardiovascular diseases (CVDs). However, the exact nature of the relationship between CHC and CVDs has not been elucidated. We investigated the presence of CVDs and the clinical and laboratory alterations associated with these diseases in CHC patients. Twenty-six CHC patients, 35 individuals with atherosclerosis (Athero) and 27 healthy individuals were examined for risk factors for CVD, lipid profile, atherogenic risk indexes, and insulin resistance (IR). Cardiac biomarkers and the chemokines and cytokines involved in atherosclerosis were also evaluated. A higher prevalence of prior acute myocardial infarction was found in the Athero group. Most CHC patients were infected with the hepatitis C virus genotype 1 and exhibited either no hepatic fibrosis or a mild to moderate liver fibrosis. The apolipoprotein B/apolipoprotein A-I and triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol ratios and C-reactive protein levels were lower in CHC patients than in the Athero group. Further, IR was elevated in the CHC group and associated with the waist circumference. High GDF-15 levels were observed in the CHC group, which were inversely correlated with APOB levels. Peripheral blood mononuclear cells from CHC patients produced more IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 than CAD PBMC but the production of IL-10 and IL-1 $\beta$  was similar. CHC and CAD groups presented similar levels of IL-8, MCP-1 and LAP-TGF- $\beta$ 1. Increased IR, elevated levels of GDF-15, and high production of atherogenic cytokines can be observed in Brazilian CHC patients without association with diabetes and clinical manifestation of cardiovascular diseases.

**Keywords:** Cardiac marker; Cardiovascular disease; Chronic hepatitis C; Cytokine; Insulin resistance.

Copyright © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## Padronização de técnicas por citometria de fluxo para avaliar *Corynebacterium pseudotuberculosis* células fagocitárias murinas

Geraldo Pedral Sampaio<sup>1\*</sup>, Vera Lucia Costa Vale<sup>2</sup>, Lília Ferreira de Moura Costa<sup>3</sup>, Ricardo Evangelista Fraga<sup>4</sup>, Herbert Henrique de Melo Santos<sup>5</sup>, Maria da Conceição Aquino de Sá<sup>6</sup>, Bruno Lopes Bastos<sup>4</sup>, José Tadeu Raynal Rocha Filho<sup>7</sup>, Soraya Castro Trindade<sup>8</sup>, Roberto José Meyer Nascimento<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Discente do Programa de pós-graduação em Imunologia- Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. <sup>2</sup>Professora plena, Universidade do Estado da Bahia, Campus II, Alagoinha, Brasil. <sup>3</sup>Professor Adjunto, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. <sup>4</sup>Professor Adjunto, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil. <sup>5</sup>Médico hematologista, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. <sup>6</sup>Pós-Doutoranda do Programa de pós-graduação em Imunologia – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. <sup>7</sup>Professor Substituto, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil. <sup>8</sup>Professora Titular, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil. <sup>9</sup>Professor Titular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil.  
\*Autor para correspondência, E-mail: geraldopedral@gmail.com

**Resumo.** Com o avanço no entendimento de bioprocessos, houve um significativo aumento de novas técnicas as interações celulares. Dentre elas, a citometria de fluxo (CF), uma importante ferramenta para contar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Os parâmetros analisados são conteúdos celulares de todas as origens, como a bactéria *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agente etiológico da linfadenite caseosa. Assim, objetivou-se padronizar técnicas, através da Citometria de fluxo para avaliar a contagem absoluta e os aspectos fisiológicos de *C. pseudotuberculosis* e células fagocitárias murinas. Foi cultivado o *C. pseudotuberculosis* em meio BHI – Tween 80 0,5%, seguido da marcação deste microrganismo com corantes fluorescentes, em diferentes períodos e diferentes estados fisiológicos ao longo do seu crescimento. No ensaio de fagocitose utilizaram-se células do peritônio de murinos de duas linhagens após peritonite induzida por Tioglicolato de Sódio. Após a adesão celular, foi feito o desafio com bactérias coradas e após 1h 30 min as células aderentes foram tripsinizadas, lavadas e centrifugadas para o ensaio por CF. Foi observado um período de crescimento similar a uma curva padrão de crescimento microbiano, além de permitir a distinção entres diferentes estados fisiológicos. Os dados obtidos na citometria evidenciam populações de células fagocíticas contendo bactérias no citoplasma. Observou-se uma população de baixa complexidade interna, similar à apresentada por linfócitos, e uma população com complexidade interna moderada similar a apresentada por células de origem monocítica. A técnica de citometria de fluxo com a marcação por fluorescência foi eficaz para a avaliação do crescimento e viabilidade de *C. pseudotuberculosis*, bem como da interação das células bacterianas com as células fagocitárias peritoneais murinas. A CF constitui-se, portanto, numa técnica eficiente para a avaliação da curva de crescimento desta bactéria, permitindo a distinção dos diferentes estados fisiológicos, inclusive podendo indicar um mecanismo de escape à fagocitose.

**Palavras-chave:** Citometria de fluxo, bioprocessos, microrganismo intracelular

## Standardization of flow cytometric techniques to evaluate *Corynebacterium pseudotuberculosis* murine phagocytic cells

**Abstract.** The understanding of bioprocesses has been allowed the increase of techniques to study cellular interactions, such as flow cytometry (FC). This technic is an important tool for counting and classifying microscopic particles suspended in flowing liquid medium, analyzing



GLOBAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH: F  
DISEASES

Volume 20 Issue 2 Version 1.0 Year 2019

Type: Double Blind Peer Reviewed International Research Journal

Publisher: Global Journals

Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888

## In Vitro Immunomodulatory Effect of Linalool on *P. gingivalis* Infection

By Santos, R. P. B., Carvalho-Filho, P. C., Sampaio, G. P., Silva, R. R., Falcão, M. M. L., Pimentel A. C. M., Oliveira, Y. A. Miranda, P. M., Santos, E. K. N., Meyer, R., Xavier, M. T. & Trindade, S. C.

*Federal University*

**Abstract- Introduction:** Periodontitis is a multifactorial disease, characterized by an inflammatory response of the periodontal tissues to a dysbiotic biofilm in the subgingival surface. The presence of keystone pathogens, such as *Porphyromonas gingivalis*, is one of the main causes of dysbiosis, although the host response is preponderant in the beginning and the progression of the disease. The periodontal treatment is based on the mechanic scaling of the biofilm but using of chemicals adjuvants has been preconized. However, there are many restrictions related to the antibiotics and other chemical adjuvants usage, which makes the use of herbal medicines for this purpose very promising. In addition, many herbal medicines have been used in the folk medicine, with various biologic effects.

**Objective:** To evaluate in vitro the effect of linalool in the periodontitis.

**Keywords:** *periodontal inflammation, porphyromonas gingivalis, linalool, periodontal treatment.*

**GJMR-F Classification:** NLMC Code: QW 920



## 7.4. Artigos publicados em 2020

> [PLoS One](#). 2020 Feb 21;15(2):e0224584. doi: 10.1371/journal.pone.0224584. eCollection 2020.

### Evaluation of systemic inflammatory response and lung injury induced by *Crotalus durissus cascavella* venom

Elen Azevedo <sup>1 2</sup>, Ricardo Gassmann Figueiredo <sup>3</sup>, Roberto Vieira Pinto <sup>4</sup>, Tarsila de Carvalho Freitas Ramos <sup>5</sup>, Geraldo Pedral Sampaio <sup>6</sup>, Rebeca Pereira Bulhosa Santos <sup>6</sup>, Marcos Lázaro da Silva Guerreiro <sup>1</sup>, Ilka Biondi <sup>1</sup>, Soraya Castro Trindade <sup>2 7</sup>

Affiliations [+](#) expand

PMID: 32084665 PMCID: [PMC7035002](#) DOI: [10.1371/journal.pone.0224584](#)

[Free PMC article](#)

#### Abstract

This study investigated the systemic inflammatory response and mechanism of pulmonary lesions induced by *Crotalus durissus cascavella* venom in murine in the state of Bahia. In order to investigate T helper Th1, Th2 and Th17 lymphocyte profiles, we measured interleukin (IL) -2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, tumor necrosis factor (TNF) and interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) levels in the peritoneal fluid and macerated lungs of mice and histopathological alterations at the specific time windows of 1h, 3h, 6h, 12h, 24h and 48h after inoculation with *Crotalus durissus cascavella* venom. The data demonstrated an increase of acute-phase cytokines (IL-6 and TNF) in the first hours after inoculation, with a subsequent increase in IL-10 and IL-4, suggesting immune response modulation for the Th2 profile. The histopathological analysis showed significant morphological alterations, compatible with acute pulmonary lesions, with polymorphonuclear leukocyte (PMN) infiltration, intra-alveolar edema, congestion, hemorrhage and atelectasis. These findings advance our understanding of the dynamics of envenomation and contribute to improve clinical management and antiophidic therapy for individuals exposed to venom.

#### Conflict of interest statement

The authors have declared that no competing interests exist.

#### Figures

#### FULL TEXT LINKS



#### ACTIONS



#### SHARE



#### PAGE NAVIGATION

< Title & authors

Abstract

Conflict of interest statement

Figures

Similar articles

Cited by

References

Publication types

## 7.4. Artigos publicados em 2021



ELSEVIER

Hematology, Transfusion and Cell Therapy

Volume 43, Supplement 1, October 2021, Pages S168-S169



# NEOPLASIA DE CÉLULAS BLÁSTICAS DENDRÍTICAS PLASMOCITOIDES: RELATO DE CASO

YCF Almeida <sup>a</sup>, GP Sampaio <sup>b</sup>, CCAP Campos <sup>b</sup>, PM Mendes <sup>b</sup>, KMC Dourado <sup>a</sup>

Show more 

 Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.10.287>

[Get rights and content](#)

Under a Creative Commons [license](#)

 [Open access](#)

## Introdução

A Neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitoides (NCBDP) é rara e representa 1% das neoplasias hematológicas (Wilson and Medeiros, 2015), afetando principalmente homens com idade mais avançada (Alsidawi et al., 2016). A NCBDP é caracterizada pela co-expressão dos marcadores CD4 e CD56, pelo menos um antígeno de células dendríticas e plasmocitoides e ausência de outros marcadores de linhagens hematopoiéticas (Pagano et al., 2016).