UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Sacha Krolow e Silva

# CD38 E CD73 EM LINFÓCITOS B MADUROS: POTENCIAIS MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B

Porto Alegre
2025

Sacha Krolow e Silva

# CD38 E CD73 EM LINFÓCITOS B MADUROS: POTENCIAIS MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2025

Sacha Krolow e Silva

# CD38 E CD73 EM LINFÓCITOS B MADUROS: POTENCIAIS MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências: Bioquímica, em nível de Mestrado Acadêmico da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 19/12/2025, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Rosane Souza da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Elizandra Braganhol
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Profa. Dra. Simone Martins de Castro
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

e Silva, Sacha Krolow
CD38 E CD73 EM LINFÓCITOS B MADUROS: POTENCIAIS MARCADORES PROGNÓSTICOS NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B / Sacha Krolow e Silva. -- 2025.
84 f.
Orientador: Fabrício Figueiró.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2025.

1. leucemia linfoblástica aguda. 2. CD38. 3. CD73. 4. via purinérgica. 5. prognóstico. I. Figueiró, Fabrício, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico este trabalho aos meus filhos,
João Vitor e Lorena.

# Agradecimento

Agradeço aos meus filhos, por serem minha maior motivação, por me apoiarem mesmo nos dias mais difíceis.

Aos meus pais Marcelo e Eliana, agradeço pelos valores transmitidos e pelo suporte incondicional para que eu pudesse seguir meus sonhos, sem vocês nada disso seria possível.

A minha família, em especial aos meus avós: Jacir, Marly e Ana por sempre perguntar "como ia os estudos". Aos meus tios, Laura, Leco, Márcio e Monize, e primos, Lucas e Pedro, que sempre estiveram presentes com palavras e apoio.

Ao meu orientador, Fabrício Figueiró, por abrir as portas do laboratório 22 para mim e por acreditar no meu potencial desde o TCC.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 22, Augusto, Ju, Alexia, Nati, Ari (do lab21.5), Tamires, que me acolheram desde a graduação, e aos novos colegas que entraram no lab, Raquel, Luísa, Rafa e Vini, que seja com uma conversa tomando café ou explicando como trabalhar com células, as trocas me levaram a ser uma cientista mais madura hoje.

À doutoranda Camila Kehl Dias que me ajuda desde o TCC com as análises no programa e na escrita, e me mostrou o valor deste trabalho.

A todos os professores que compartilharam comigo seus conhecimentos, em especial Sílvia Maria Spalding por ser a primeira a acreditar e me ensinar a importância da extensão e às professoras do SIAT, Lavinia Schüler Faccini e Maria Teresa Vieira Sanseverino, pelos ensinamentos e boas recordações dos últimos anos.

As minhas irmãs, Carolina Ritter e Júlia Krebs pela amizade e apoio desde a graduação, que mesmo seguindo caminhos diferentes, sempre encontramos um tempinho para conversarmos.

A todos os colaboradores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Mariela Granero Farias, Pâmela Portela da Silva, Fabiane Spagnol, Alessandra Aparecida Paz, Mariana Bohns Michalowski, Liane Esteves Daudt e Cláudia Caceres Astigarraga) que apoiam não apenas meu projeto, mas os demais projetos do grupo.

A todos os pacientes da oncologia e da hematologia pediátrica, não só aos que fizeram parte desse projeto, mas a todos aqueles que enfrentam ou que um dia irão enfrentar essa doença tão grave.

Agradeço à UFRGS por me acolher desde a graduação.

Por fim, agradeço aos componentes da banca, Profa. Dra. Rosane Souza da Silva, Profa. Dra. Simone Martins de Castro e Profa. Dra. Elizandra Braganhol, pela disponibilidade na

avaliação desse trabalho e às agências CAPES, CNPq e FAPERGS pelos auxílios financeiros que tornaram esse trabalho possível.

A todos que sempre torceram por mim, meus mais sinceros e eternos agradecimentos.

**SUMÁRIO**


**Resumo** **3**
**Abstract** **4**
**Lista de ilustrações** **5**
**Lista de abreviaturas** **6**
**1. INTRODUÇÃO** **8**
**2. REVISÃO DA LITERATURA** **8**
2.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA 8
**2.1.1 Aspectos históricos, epidemiologia e etiologia** **8**
**2.1.2 Apresentação clínica e diagnóstico** **10**
**2.1.3 Fatores prognósticos** **11**
2.1.3.1 Fatores clínicos e laboratoriais 11
2.1.3.2 Características imunofenotípicas 12
2.1.3.3 Citogenética e genética molecular 13
**2.1.4 Estratificação de risco** **14**
**2.1.5 Aspectos gerais do tratamento** **15**
2.2 VIA PURINÉRGICA 15
**3. OBJETIVOS** **16**
3.1 OBJETIVO GERAL 16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 17
**4. RESULTADOS** **19**
4.1 CAPÍTULO 1 **19**
**Prognostic impact of CD38 and CD73 expression in mature B lymphocytes across follow-up time points in pediatric B-ALL** **19**
**5. SUPLEMENTAR** **35**
**6. DISCUSSÃO** **44**
**7. REFERÊNCIAS** **57**
**8. ANEXOS** **67**
8.1 Todas as principais alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfóide aguda (LLA) descritas até o momento 67
8.2 Fase de indução do protocolo quimioterápico BFM2009 para tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B, utilizado para tratamento pediátrico. 71
8.3 Carta de aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327) 72
8.4 Parecer do Projeto de Mestrado do PPG – Bioquímica que foi associado ao projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327) 73
8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Meio Eletrônico do projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327) 74

# Parte I

## Resumo

A leucemia linfoblástica aguda de linhagem B (LLA-B) constitui a neoplasia maligna mais frequente na infância e caracteriza-se por elevada heterogeneidade biológica, que influencia a resposta ao tratamento e o prognóstico. Apesar dos avanços terapêuticos, as taxas de sobrevida no Brasil permanecem inferiores às observadas em países desenvolvidos. A via purinérgica, especialmente por meio das ectonucleotidases CD38 e CD73, apresenta papel relevante na modulação da resposta imune tumoral, favorecendo a produção de adenosina e a imunossupressão do microambiente. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de CD38 e CD73 nos linfócitos B da medula óssea de pacientes pediátricos com LLA-B atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, correlacionando esses marcadores com variáveis clínicas, laboratoriais, resposta ao tratamento e sobrevida.

Trata-se de um estudo retrospectivo, quantitativo e observacional, que incluiu 66 pacientes diagnosticados entre 2018 e 2023. A frequência de células $CD38^{high}$, $CD73^{+}$ e $CD38^{high}CD73^{+}$ foi avaliada por citometria de fluxo no momento do diagnóstico e nos dias 15 (D15) e 33 (D33) do tratamento, durante a avaliação da Doença Residual Mensurável (DRM). As análises estatísticas envolveram testes paramétricos e não paramétricos, análise de sobrevida por curvas de Kaplan–Meier e regressão de Cox.

A expressão de CD38 apresentou comportamento homogêneo entre os diferentes subgrupos clínicos e biológicos, sem associação independente com a sobrevida global (OS) ou sobrevida livre de progressão (PFS). Observou-se aumento transitório da expressão de $CD38^{high}$ no diagnóstico em pacientes com infecção viral e maior intensidade média de fluorescência em pacientes sem recaída. Quanto ao CD73, maior porcentagem de células B $CD73^{+}$ no D15 associou-se a melhor OS, especialmente em crianças de 1 a 9 anos. Em contraste, valores elevados da intensidade de expressão de CD73 no D33 correlacionaram-se com pior OS e PFS, mantendo-se como fator prognóstico independente na análise multivariada. Pacientes com infiltração do sistema nervoso central apresentaram maior intensidade de expressão de CD73 no D33. A população duplo-positiva $CD38^{high}CD73^{+}$ mostrou associação com a presença de DRM positiva no D78.

Conclui-se que a via purinérgica, particularmente mediada pelo CD73, apresenta relevância prognóstica na LLA-B pediátrica, podendo atuar como biomarcador complementar para a estratificação de risco e o monitoramento da resposta ao tratamento.

Palavras-chave: leucemia linfoblástica aguda; LLA-B; CD38; CD73; via purinérgica; citometria de fluxo; prognóstico.

## Abstract

B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) is the most common malignant neoplasm in childhood and is characterized by high biological heterogeneity, which influences treatment response and prognosis. Despite therapeutic advances, survival rates in Brazil remain lower than those observed in developed countries. The purinergic pathway, especially through CD38 and CD73 ectonucleotidases, plays an important role in modulating the tumor immune response, favoring adenosine production and immunosuppression of the microenvironment. The present study aimed to evaluate the expression of CD38 and CD73 in bone marrow B lymphocytes of pediatric patients with B-ALL treated at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, correlating these markers with clinical and laboratory variables, response to treatment, and survival.

This is a retrospective, quantitative, observational study that included 66 patients diagnosed between 2018 and 2023. The frequency of $CD38^{high}$, $CD73^{+}$, and $CD38^{high}CD73^{+}$ cells was evaluated by flow cytometry at the time of diagnosis and on days 15 (D15) and 33 (D33) of treatment, during the assessment of Measurable Residual Disease (MRD). Statistical analyses involved parametric and nonparametric tests, Kaplan–Meier survival analysis, and Cox regression.

CD38 expression showed homogeneous behavior among the different clinical and biological subgroups, with no independent association with overall survival (OS) or progression-free survival (PFS). A transient increase in $CD38^{high}$ expression was observed at diagnosis in patients with viral infection and higher mean fluorescence intensity in patients without relapse. Regarding CD73, a higher percentage of $CD73^{+}$ B cells on D15 was associated with better OS, especially in children aged 1 to 9 years. In contrast, high values of CD73 expression intensity on D33 correlated with worse OS and PFS, remaining an independent prognostic factor in the multivariate analysis. Patients with central nervous system infiltration had higher CD73 expression intensity on D33. The double-positive $CD38^{high}CD73^{+}$ population showed an association with the presence of positive MRD on D78.

It is concluded that the purinergic pathway, particularly mediated by CD73, has prognostic relevance in pediatric B-ALL and may act as a complementary biomarker for risk stratification and monitoring of treatment response.


Palavras-chave: acute lymphoblastic leukemia; ALL-B; CD38; CD73; purinergic pathway; flow cytometry; prognosis.

## Lista de ilustrações

Quadro 1: Subtipos imunofenotípicos da Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B (LLA-B), suas características e implicações prognósticas 13
Quadro 2: Alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfoide aguda (LLA) observadas no painel molecular utilizado para diagnóstico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) 13
Quadro 3: Alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfoide aguda (LLA) 67
Quadro 4: Principais alterações genéticas e sua relação com a estratificação de risco na Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) 14
Quadro 5: Representação da fase de indução do protocolo quimioterápico BFM2009 para tratamento de LLA-B 71

## Lista de abreviaturas

ADO – Adenosina

ADOe – Adenosina extracelular

ADPR – Adenosina difosfato ribose

AIA – Adultos e adolescentes jovens

APC – Aloficocianina

ATP – Adenosina trifosfato

BFM – Berlin-Frankfurt-Münster

Breg – Células B regulatórias

CD – Grupamento de diferenciação (Cluster of Differentiation)

cADPR – Adenosina difosfato ribose cíclica

cIgμ – Expressão da cadeia pesada de imunoglobulina M (IgM) no interior da célula

D15 – Dia 15 de tratamento

D33 – Dia 33 de tratamento

D78 – Dia 78 de tratamento

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DRM – Doença Residual Mensurável (MRD em inglês)

dx – Diagnóstico

ETV6 – Gene ETV6

FCS – Arquivo padrão de citometria de fluxo

FITC – Fluoresceína isotiocianato

FSC – Dispersão frontal (*Forward Scatter*)

GBTLI – Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia Linfoide Aguda na Infância

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HR – Razão de risco (Hazard Ratio)

IFN-γ – Interferon gama

IKZF1 – Gene IKZF1

IL-2 – Interleucina 2

INCA – Instituto Nacional de Câncer

iAMP21 – Amplificação intracromossômica do cromossomo 21

KMT2A – Gene KMT2A

LCR – Líquido Cefalorraquidiano

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL em inglês)

LLA-B – Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B (B-ALL em inglês)

LLA-T – Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem T

LLC – Leucemia Linfocítica Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

MLL – Gene da Leucemia de Linhagem Mista

MO – Medula Óssea

MTX – Metotrexato

MFI – Intensidade Média de Fluorescência

$NAD^+$ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NK – Células Natural Killer

OS – Sobrevida Global

PBX1 – Gene PBX1

PE – Ficoeritrina

PerCP – Proteína da Clorofila Peridinina

PFS – Sobrevida Livre de Progressão

Ph+ – Cromossomo Filadélfia positivo

RAS – Via de sinalização RAS

RUNX1 – Gene RUNX1

SARS-CoV-2 – Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2

SNC – Sistema Nervoso Central (CNS em inglês)

SSC – Dispersão lateral (*Side Scatter)*

TCF3 – Fator de Transcrição 3

Treg – Linfócitos T regulatórios

WBC – Contagem de leucócitos

WHO – Organização Mundial da Saúde

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer infantojuvenil é atualmente a principal causa de morte por doenças entre crianças e adolescentes no Brasil e acomete indivíduos de 0 a 19 anos. Apesar da evolução rápida, apresentam melhor resposta à quimioterapia, alcançando taxas de cura próximas a 80% em países desenvolvidos quando diagnosticado precocemente (Instituto do Câncer Infantil, 2022; Ministério da Saúde, 2022; MS/INCA/DVAS, 2024). Apesar disso, muitos casos no Brasil ainda são diagnosticados em estágios avançados (Ministério da Saúde, 2022).

A heterogeneidade tumoral corresponde à presença de subpopulações celulares distintas dentro de um mesmo tumor, influenciadas por fatores genéticos, epigenéticos e pelo microambiente tumoral (Tabassum & Polyak, 2015; Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Arnone *et al.*, 2020; Kanzaki & Pietras, 2020). Nesse contexto, a imunomodulação tem papel central no prognóstico da doença, e o sistema purinérgico vem sendo associado à supressão imune e a piores desfechos clínicos devido, principalmente, à produção de adenosina extracelular (ADOe) mediada pela via canônica (CD39/CD73) e não canônica (CD38/CD73) (da Silva Nunes *et al*., 2022; Nuñez-Rios *et al*., 2025; Xia *et al.*, 2021).

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA

### 2.1.1 Aspectos históricos, epidemiologia e etiologia

As leucemias, juntamente com os linfomas, correspondem a cerca de 40% das neoplasias pediátricas no Brasil, sendo o principal câncer infantojuvenil em meninos e o segundo em meninas (Instituto do Câncer Infantil, 2022; INCA, 2022; MS/INCA/DVAS, 2024). A distinção entre leucemia linfoblástica e linfoma linfoblástico baseia-se no local

primário da doença, sendo medula óssea e sistema linfático (baço e gânglios) respectivamente (Inaba *et al*., 2025). Sua etiologia é multifatorial, associada a fatores genéticos, ambientais e ocupacionais, com variação etária dos subtipos e a classificação definida pela velocidade de progressão e pela linhagem celular (INCA, 2022; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA) apresentam as maiores taxas de mortalidade no Brasil, com a LLA representando 75–80% das leucemias agudas em crianças entre 2022 e 2024 (TabNet Win32 3.3; RHC, 2022; Inaba *et al*., 2025; World Health Organization, 2007; Wild *et al.*, 2020). A LLA pode ser classificada em LLA de linhagem T (LLA-T) ou B (LLA-B), além de ser subclassificada pelo estágio de maturação dos blastos e anormalidades genéticas recorrentes, sendo a LLA-B a mais frequente (Basquiera *et al.*, 2023; Gökbuget *et al*., 2024; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017; INCA, 2022).

Desde o primeiro caso infantil descrito em 1860, houve grande avanço no conhecimento e no tratamento da LLA, e atualmente pode chegar a uma sobrevida de 90% em crianças e 60% em adolescentes e adultos jovens (AIA), embora permaneça baixa em adultos e com pior prognóstico em lactentes (Inaba *et al.*, 2025; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002). A estratificação por grupos de risco orienta terapias mais intensivas nos casos de maior risco (de Souza Silva, 2018).

Apesar de ainda não estar completamente definida, a etiologia da LLA é considerada multifatorial (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002; Brown *et al*., 2019; Mendes-de-Almeida *et al*., 2023; de Smith & Spector, 2024; Spector & de Smith, 2024; Ministério da Saúde, 2022; World Health Organization, 2007; de Souza Silva, 2018; Instituto do Câncer Infantil, 2022), envolvendo a interação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos como:

- Exposição à radiação ionizante e ao benzeno;
- Uso prévio de quimioterapia;
- Síndromes genéticas como: Bloom, Li-Fraumeni, Ataxia Telangiectasia e Anemia de Fanconi, e crianças com síndrome de Down apresentam risco 20 a 30 vezes maior de desenvolver LLA.

### 2.1.2 Apresentação clínica e diagnóstico

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) resulta da proliferação de linfoblastos imaturos na medula óssea (MO) e no sangue periférico, levando ao surgimento de sinais e sintomas inespecíficos associados à alta carga tumoral (de Souza Silva, 2018; Pizzo & Poplack, 2001; Rezayee, 2025; INCA, 2010). O diagnóstico é estabelecido pela presença de ≥20% de linfoblastos na MO, confirmada por exames morfológicos como a imunofenotipagem e imunohistoquímicos, sendo complementado por análises citogenéticas e testes moleculares para identificação de rearranjos gênicos e aberrações cromossômicas (Inaba *et al*., 2025; Rezayee, 2025).

O envolvimento extramedular pode ser identificado clinicamente ou por exames no momento do diagnóstico, acometendo órgãos como fígado, baço, rins, ossos e gânglios linfáticos (INCA, 2010). Os sítios de maior relevância clínica são os testículos e o sistema nervoso central (SNC), mas qualquer local do corpo pode ser acometido tanto no diagnóstico quanto na recaída (Rezayee, 2025; Rodriguez *et al*., 2023; Shahriari *et al*., 2020).

A classificação imunofenotípica da LLA é realizada por citometria de fluxo, identificando as linhagens B (cerca de 80% dos casos) ou T (10–15%) e suas subclassificações conforme o estágio de maturação celular (Basquiera *et al.*, 2023; Gökbuget *et al.*, 2024; INCA, 2022; Bene *et al*., 1995; Chauffaile & Yamamoto, 2013). A citometria também permite classificar a LLA de acordo com o conteúdo de DNA, como hiperplóide (bom prognóstico) ou hipoplóide (prognóstico desfavorável) (Chauffaile & Yamamoto, 2013;

INCA, 2010). A classificação e o tratamento da LLA são definidos com base em grupos de risco para recaída (baixo, intermediário e alto risco) determinados pela resposta inicial ao tratamento e por outras características do diagnóstico, como: idade, contagem leucocitária, sexo, raça, etnia, estado nutricional, imunofenótipo, alterações citogenéticas e moleculares e presença de infiltração extramedular (Inaba *et al*., 2025).

### 2.1.3 Fatores prognósticos

#### 2.1.3.1 Fatores clínicos e laboratoriais

A idade é um dos principais fatores prognósticos na leucemia linfoide aguda (LLA) infantil. Pacientes com menos de 1 ano e aqueles com 10 anos ou mais tendem a apresentar pior prognóstico quando comparados às crianças entre 1 e 9 anos (Neaga *et al*., 2021). Pacientes com altas contagens leucocitárias apresentam maior risco de falha terapêutica e recaída (≥20.000/mm³), e a presença da fusão gênica no cromossomo Filadélfia (Ph+) está associada a desfechos desfavoráveis (Leite *et al.*, 2007; The Trial Steering Committee, 2009; Inaba *et al.*, 2025). Já nos lactentes com menos de 12 meses de idade, é comum observar linfoblastos mais resistentes à quimioterapia, envolvimento frequente do SNC, contagens leucocitárias elevadas e presença de anomalias genéticas no gene MLL (11q23), associadas a fenótipos B muito imaturos e evolução clínica mais agressiva (Ibagy *et al*., 2013).

O envolvimento do SNC por blastos linfoides também é indicador de mau prognóstico, diagnosticado em menos de 5% das LLAs do tipo B, sendo classificado conforme o número de células e a presença de blastos no líquor: SNC1 (ausência de blastos), SNC2 (blastos presentes e <5 glóbulos brancos por mm³ em uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) e SNC3 (blastos com ≥5 glóbulos brancos por mm³ em LCR ou traumatismo grave), sendo que casos SNC3 têm maior risco de falha terapêutica e SNC2

maior risco de recidiva meníngea (Rodriguez *et al*., 2023). Embora o envolvimento testicular ocorra em cerca de 2% dos meninos, é raramente observado no momento do diagnóstico na LLA (principalmente LLA-T), porém, até 25% dos meninos podem não ser diagnosticados (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

Fatores adicionais também influenciam o prognóstico, como:

- Crianças com síndrome de Down costumam ter maior mortalidade relacionada ao tratamento e taxas mais altas de recaída;
- O sexo feminino apresenta maior toxicidade relacionada ao tratamento e maior predisposição a risco de efeitos neurocognitivos tardios e osteonecrose;
- Pessoas negras apresentam menores taxas de sobrevida;
- Desnutrição está associada à menor resposta terapêutica, maior toxicidade e aumento da mortalidade; enquanto a obesidade, especialmente em crianças acima de 10 anos, relaciona-se a maior risco de recaída e menor sobrevida.

Esses fatores reforçam a necessidade de considerar as condições de suporte e as particularidades biológicas no tratamento da LLA infantil (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002; de Souza Silva, 2018; Zhao *et al.*, 2018; Ansarian *et al*., 2025).

#### 2.1.3.2 Características imunofenotípicas

A imunofenotipagem permite identificar diferentes estágios de maturação das células B, cada estágio com implicações clínicas e prognósticas específicas (Quadro 1). Essas classificações imunofenotípicas permitem classificar os pacientes por risco, guiar decisões terapêuticas e prever a evolução clínica de cada paciente, sendo essenciais para a definição do tratamento mais adequado e para a otimização da sobrevida e da resposta à quimioterapia em crianças com LLA-B.

**Quadro 1: Subtipos imunofenotípicos da Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B (LLA-B), suas características e implicações prognósticas.**

| Imunofenótipo | Marcadores imunológicos | Frequência | Principais alterações genéticas | Características clínicas |
|---|---|---|---|---|
| **Pró-B** | $CD10^{-}$ / $cIg\mu^{-}$ | Mais comum em lactentes | Rearranjo *MLL* | Hiperleucocitose, envolvimento do SNC, alto risco de falha terapêutica |
| **Pré-B** | $CD10^{+}$ / $cIg\mu^{+}$ / $sIg\mu^{+/-}$ | ~25% dos casos | *TCF3-PBX1* | Geralmente boa resposta ao tratamento |
| **Pré-B $CD10^{-}$** | $CD10^{-}$ / $cIg\mu^{+}$ | Raro | Rearranjo *MLL* | Alta taxa de falha terapêutica (>80%) |
| **B comum** | $CD10^{+}$ / $cIg\mu^{-}$ | ~75% dos casos | *ETV6/RUNX1* | Boa resposta ao tratamento |

**Fonte: Baseado em informações retiradas de de Souza Silva, 2018; Silva, 2009; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002.**

2.1.3.3 Citogenética e genética molecular

A LLA apresenta um panorama genético altamente heterogêneo, no qual três categorias principais de alterações são observadas: aneuploidias (que envolvem variações no número de cromossomos), rearranjos cromossômicos estruturais e alterações genômicas que afetam a regulação gênica (Rezayee, 2025) (Quadro 2, completo no Quadro 3 em Anexo). Há mais de 200 alterações gênicas já relatadas, essenciais para a estratificação de risco, permitindo personalizar o tratamento e melhorar a sobrevida em crianças com LLA-B (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

**Quadro 2: Alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfoide aguda (LLA) observadas no painel molecular utilizado para diagnóstico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).**

| Alteração genética/citogenética | Frequência aproximada | Implicações prognósticas e terapêuticas |
|---|---|---|
| **KMT2A-rearranjado** | Predomina em lactentes (~80%) | Mau prognóstico |
| **BCR::ABL1 (Ph+)** | Raro em crianças | Mau prognóstico |
| **ETV6::RUNX1** | ~25% dos pacientes de risco baixo e 10% de alto risco | Prognóstico favorável |
| **TCF3::PBX1** | 4–5% dos casos pediátricos, ~25% das LLA pré-B | Prognóstico intermediário |

**Fonte: Baseado em informações retiradas de *Children's Oncology Group (COG)*; *St. Jude Total Therapy*; Zhang *et al*., 2022; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002; Rezayee, 2025; Ingegerd Ivanov, 2017; Yu *et al*,. 2023; Kruse *et al*., 2020; Carranza *et al.*, 2013.**

### 2.1.4 Estratificação de risco

Inicialmente a classificação da LLA baseava-se apenas em fatores clínicos, como idade e contagem de leucócitos (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002); mas agora, parâmetros citogenéticos e genômicos dos blastos ao diagnóstico, combinados com o imunofenótipo e a resposta precoce ao tratamento, permitem uma estratificação mais precisa (Quadro 4) (Inaba *et al.*, 2025), sendo utilizados por protocolos como os do grupo BFM (*Berlin-Frankfurt-Münster*) e do GBTLI (*Grupo Brasileiro de Tratamento das Leucemias da Infância*) para otimizar a estratificação de risco e individualizar o tratamento (Campbell *et al*., 2023; Horn *et al*., 2024).

**Quadro 4: Principais alterações genéticas e sua relação com a estratificação de risco na Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).**

| Estratificação de risco | Alterações genéticas | Características biológicas e clínicas | Implicações prognósticas |
|---|---|---|---|
| **Baixo risco** | Translocação t(12;21) com fusão *ETV6/RUNX1*; Hiperploidia (45–51 cromossomos) | Alterações frequentes em células hematopoiéticas do período fetal, associadas à rápida depuração da doença e a menores taxas de recaída. Modificações adicionais podem alterar a classificação de risco | Bom prognóstico, com alta resposta ao tratamento e menores índices de recidiva |
| **Risco intermediário** | Translocação t(1;19) com fusão *TCF3/PBX1*; Rearranjo intracromossômico iAMP21 | A t(1;19) está associada a comportamento mais agressivo que as alterações de baixo risco; o iAMP21 é uma alteração primária com elevado potencial de recidiva, podendo apresentar bom prognóstico com terapias adaptadas | Prognóstico depende da estratégia terapêutica |
| **Alto risco** | Hipodiploidia (<44 cromossomos); Rearranjos do gene *KMT2A* (11q23); Translocação t(9;22) com fusão *BCR/ABL1* | Associadas à resposta lenta ao tratamento, maior resistência terapêutica e maior probabilidade de recaída, exigindo monitoramento rigoroso e abordagens diferenciadas | Prognóstico ruim, com alto risco de recidiva |

**Fonte: Rezayee, 2025; Ingegerd Ivanov, 2017; Carranza *et al*., 2013; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002.**

Contudo, cerca de 25% dos pacientes com LLA não apresentam marcadores genéticos conhecidos, e marcadores de alto risco são raros, de modo que mais de 50% dos casos não possuem informações prognósticas claras no diagnóstico, dificultando a estratificação de

risco e a predição de recaídas. Considerando que 80% dos pacientes pode ser curado se diagnosticados precocemente (estimativa para câncer infanto-juvenil) (INCA, 2022) e que a resposta primária ao tratamento é preditiva do risco de remissão, isso evidencia a necessidade de novos marcadores e abordagens genômicas e imunofenotípicas mais abrangentes para melhorar o manejo da LLA infantil.

### 2.1.5 Aspectos gerais do tratamento

O tratamento da LLA é um dos mais complexos da oncologia, estruturado em fases sequenciais, sendo: indução (Quadro 5 em Anexo), consolidação, profilaxia do SNC e manutenção por 2 anos em adultos e de 2 a 3 anos em crianças, com ajustes conforme fatores clínicos, moleculares e a resposta ao tratamento avaliada pela Doença Residual Mensurável (DRM). A análise por DRM permite quantificar as células imaturas se presentes e sua negatividade ao final da indução (dia 33, D33) indica excelente prognóstico, enquanto que sua persistência após 10–12 semanas ou após a consolidação ou intensificação está associada a alto risco de recaída (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017). Nesse sentido, a resposta precoce ao tratamento é um dos principais determinantes prognósticos na LLA infantil.

## 2.2 VIA PURINÉRGICA

O metabolismo do ATP e de seus metabólitos é rigidamente regulado devido ao papel central do eixo ATP/adenosina (ADO) na sinalização celular, no metabolismo e na homeostase imunológica, influenciando tanto a resposta imune fisiológica quanto os mecanismos de imunomodulação no câncer (Jia *et al*., 2023; Allard *et al*., 2019). No contexto das leucemias, o ATP liberado por células tumorais ou lesadas atua inicialmente como sinal pró-inflamatório, promovendo a ativação imunológica, mas sua conversão em ADO por meio

das ectonucleotidases CD39 (via canônica), CD38 (via não canônica) e CD73 (presente em ambas as vias) gera um microambiente fortemente imunossupressor (Campos-Contreras *et al*., 2020; Kang *et al.*, 2023; Figueiró *et al.*, 2016b).

A ADO favorece a expansão de linfócitos T regulatórios (Treg) e células B regulatórias (Breg), contribuindo para a evasão imunológica tumoral (Campos-Contreras *et al*., 2020; Kang *et al*., 2023; Figueiró *et al*., 2016b). Além disso, a expressão das ectonucleotidases CD39, CD73 e CD38 varia conforme o tipo celular, seu estágio de maturação e as condições do microambiente tumoral, refletindo adaptações dinâmicas à sinalização imunológica (Allard *et al*., 2019; Figueiró *et al.*, 2016a).

A CD38, amplamente expressa em neoplasias hematológicas como leucemia linfocítica crônica (LLC) e no mieloma múltiplo, participa da produção não canônica de adenosina a partir do NAD+, gerando intermediários como ADPR e cADPR (Hogan *et al*., 2019). De forma complementar, a CD73, enzima limitante da via clássica de geração de ADO a partir do AMP, está significativamente associada à pior sobrevida global e maior incidência de metástases linfonodais, além de modular negativamente a atividade de linfócitos T $CD8^+$ e células NK por meio da ativação do receptor A2A (Jiang *et al.*, 2018; Allard *et al.*, 2016). O ATP extracelular também pode induzir morte celular por meio do receptor P2X7 ou inibir a ativação de linfócitos T CD4+ via P2Y11, enquanto a ADO atua sobre os receptores purinérgicos do tipo P1 (A1, A2A, A2B e A3), resultando em supressão da atividade citotóxica, da proliferação celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias (Geitgey *et al*., 2023; Kang *et al*., 2023).

## 3. OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de CD38 e CD73 nos linfócitos B maduros da medula óssea de

pacientes com LLA-B do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a fim de correlacionar com dados clínicos e laboratoriais.

## 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Analisar a expressão dos marcadores CD38 e CD73 nos linfócitos B no momento do Diagnóstico (dx) e nas avaliações de Doença Residual Mensurável (DRM).;
II. Relacionar as mudanças observadas na expressão de CD38 e CD73 nos linfócitos B com as características clínicas/evolução de cada paciente;
III. Relacionar a expressão dos marcadores CD38 e CD73 nos linfócitos B com a sobrevida.

# Parte II

# Parte III

## 6. DISCUSSÃO

A coorte analisada foi composta por crianças e adolescentes com LLA-B, com mediana de idade de 6 anos e discreto predomínio do sexo masculino, perfil semelhante ao descrito na literatura para leucemia linfoblástica aguda pediátrica. Devido a heterogeneidade clínica e biológica da LLA-B, apesar dos avanços terapêuticos terem elevado as taxas de sobrevida do grupo pediátrico acima de 80% em países desenvolvidos (National Cancer Institute, 2025; Inaba *et al*., 2025), ainda observamos uma taxa de sobrevida geral (OS) menor que 70% em 5 anos para os pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e sobrevida livre de eventos (PFS) menor ainda (57%), mas próxima do que já foi descrito em outros estudos brasileiros (Leite *et al*., 2007; de Souza Reis *et al*., 2011; Rodrigues, 2021; Faria Monteiro *et al*., 2025), o que pode refletir diferenças socioeconômicas, questões relacionadas ao acesso ao diagnóstico precoce e correto prognóstico (estratificação de risco), suporte ao tratamento e manejo de complicações.

A idade é considerada um fator de risco na LLA-B (Leite *et al.*, 2007; Lee & Cho, 2017). Dentro do grupo pediátrico, as faixas etárias apresentam características clínicas e biológicas diferentes, nas quais pacientes com idades entre 1 e 9 anos costumam ter resultados favoráveis quando comparados com aqueles entre 10 e 17 anos e com bebês com menos de 1 ano, como observado por Bonilha *et al*. e Testi *et al.*

Ao contrário da idade, que já está consolidada como fator de risco na LLA-B, não há um consenso sobre a influência do sexo biológico no prognóstico de LLA, séries históricas e estudos populacionais mostraram que pacientes do sexo masculino pareceram ter maior probabilidade de apresentar um índice de DNA não favorável, como hipoploidia (Pui, *et al*. 1999) e aumento das recidivas no SNC (Gupta *et al.*, 2022). No entanto, estudos populacionais como CONCORD-2 e NOPHO ALL2008 não identificaram o sexo como fator

prognóstico independente, o que está em concordância com os nossos achados (OS e PFS similares entre os sexos) (Bonaventure *et al*., 2017; Taalas *et al*., 2025).

A citometria de fluxo multiparamétrica desempenha um papel fundamental tanto no diagnóstico quanto no monitoramento terapêutico da LLA-B. No diagnóstico, a técnica permite reconhecer desvios do padrão normal de maturação do linfócito B na medula óssea, identificando fenótipos aberrantes, assincronias maturativas e marcadores de outras linhagens que não são observados na hematopoese fisiológica. Esses padrões, aliados à morfologia e aos achados citogenéticos-moleculares, sustentam a classificação da doença em subtipos pró-B, B comum, pré-B e B madura, além de possibilitar a suspeita de alterações genéticas de impacto prognóstico (Beltrame *et al*., 2021; Hoelzer *et al*., 2002). A definição precisa do fenótipo inicial é essencial, pois estabelece o "retrato imunofenotípico" a ser utilizado posteriormente na vigilância da doença.

Na fase pós-diagnóstica, o mesmo princípio imunofenotípico é aplicado à detecção da doença residual mensurável (DRM), em que pequenos contingentes de células leucêmicas devem ser identificados em meio à regeneração hematopoiética pós-quimioterapia. O uso de painéis enriquecidos em marcadores discriminativos, aliado ao estudo de milhões de eventos celulares, permite atingir sensibilidades próximas a 0,001%, aproximando a citometria do desempenho das metodologias moleculares (Cherian & Soma, 2021; Dworzak *et al*., 2018; Kruse *et al*., 2020). O reconhecimento das diferenças entre hematogônias normais e células leucêmicas remanescentes, bem como a adaptação das estratégias de análise em cenários de terapias-alvo anti-CD19, são fundamentais para evitar falsos negativos (Witkowski *et al*., 2020). Dessa forma, a detecção de DRM por citometria de fluxo constitui um dos mais robustos fatores prognósticos independentes na LLA-B, guiando decisões terapêuticas e a estratificação de risco ao longo de todo o tratamento (Ikoma-Colturato *et al*., 2021; Saygin *et al.*, 2022).

As células operam em um sistema altamente integrado e cooperativo que, em decorrência de alterações genéticas ou epigenéticas, pode perder a capacidade de suprimir a ativação de oncogenes, comprometendo os mecanismos de controle proliferativo e culminando na aquisição de um fenótipo maligno e no crescimento tumoral desregulado. Na LLA-B ocorre um acúmulo de células imaturas de origem linfoide na medula óssea, o que leva a um comprometimento hematopoético, levando a múltiplas interações entre fatores genéticos, epigenéticos e microambientais (Brum da Silva Nunes *et al.*, 2022; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002).

Os linfócitos B são cruciais para a imunidade humoral. No entanto, sua maturação, ativação, comportamento e função são diretamente influenciados pelo microambiente, como, por exemplo, a medula óssea e as glicoproteínas de membrana. Influências ambientais, como infecções e fatores externos, juntamente com o envelhecimento celular, podem levar a alterações na composição e nos fenótipos das células B, afetando a distribuição e a funcionalidade das células B (Ma *et al*., 2019; de Mol *et al*., 2021). Nesse contexto, a imunofenotipagem revela que a maturação das células B na medula óssea ocorre por estágios sequenciais caracterizados por perfis específicos de marcadores e mesmo após sua ativação, surgem fenótipos distintos, como células B de memória, incluindo múltiplos subtipos definidos pelos isotipos de Ig (Moreira *et al*., 2021; Orfao *et a*l., 2019). Estudos recentes também apontam vias paralelas de maturação, influenciadas por padrões alternativos de marcadores, ampliando a heterogeneidade imunofenotípica das populações precursoras (Orfao *et al*,. 2019).

A heterogeneidade tumoral pode afetar a formação da memória imunológica, resultando em diferentes perfis moleculares e proteômicos (Tabassum & Polyak, 2015; Dagogo-Jack & Shaw, 2018). Embora algumas células tumorais possam ser eliminadas pela

resposta imunológica inicial das células efetoras, subpopulações resistentes ou latentes podem persistir, levando à evasão imunológica e à recidiva do tumor posteriormente.

Na membrana dos linfócitos B, o CD38 atua tanto na maturação e ativação das células B, quanto na metabolização de $NAD^+$ na via purinérgica não canônica, levando à formação de adenosina imunossupressora (Hogan *et al*., 2019; Allard *et al*., 2019; Camponeschi *et al*., 2022; Stolpa *et al*., 2023). Estudos em leucemias e mielomas mostram que CD38 elevado pode refletir um estado mais diferenciado e proliferativo, mas, ao mesmo tempo, aumenta o catabolismo de NAD+, contribuindo para a imunossupressão local (Geitgey *et al*., 2023). Em LLA pediátrica, o CD38 tem sido explorado como marcador de diferenciação entre blastos e linfócitos B normais (Sędek *et al*., 2014) e como alvo terapêutico (ex.: anticorpo daratumumabe como tratamento em LLA-T e LLA-B recidivada; Hiramatsu *et al*., 2023; Bisht *et al*., 2023).

Neste estudo, a presença de células $CD38^{high}$ mostrou-se amplamente homogênea entre os diferentes subgrupos clínicos e biológicos, sem associação significativa com fatores prognósticos clássicos, resposta à indução ou recaída. Esse achado sugere que o CD38, apesar de amplamente expresso em células linfoides, pode não atuar como marcador prognóstico robusto na LLA-B pediátrica em condições basais. O aumento transitório da expressão de $CD38^{high}$ no diagnóstico em pacientes com infecção viral respiratória reforça o papel desse marcador como indicador de ativação imunológica aguda, mais do que de agressividade tumoral.

Os níveis de expressão de CD38 no momento do diagnóstico (dx) foram significativamente maiores em pacientes que não apresentaram recaída, assim como nos pacientes com contagem de glóbulos brancos abaixo de 20 mil. Apesar da expressão elevada de CD38 ser um marcador prognóstico negativo para pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) (Calabretta & Carlo-Stella, 2020), esse marcador tem sido considerado um

preditor independente de prognóstico associado a OS mais longa em alguns tipos de leucemia mieloide aguda (LMA) e LLA Ph+ (AlKahiry *et al*., 2023; Bocuzzi *et al*., 2024), sugerindo que a carga leucocitária inicial possa se relacionar com o perfil fenotípico das células B. Além disso, a associação entre maior MFI de $CD38^{high}$ no diagnóstico e ausência de recaída pode indicar um possível papel indireto da ativação celular inicial no controle da doença, embora esse achado não tenha se mantido ao longo do tratamento.

Não houve associação significativa dos níveis de CD38 com a sobrevida global (OS) ou com a sobrevida livre de progressão (PFS). Além disso, considerando a nossa coorte, onde 14 (22%) pacientes tiveram DRM(+) detectada no dia 78, segundo a expressão das células B no momento do diagnóstico, o MFI $CD38^{high}$ foi maior em pacientes que viriam a atingir a remissão se comparados aos DRM(+) no D78 ($p$ = 0,0283). Tais achados indicam que níveis mais altos de CD38 no diagnóstico podem associar-se à diferenciação celular e melhor resposta imune ao tratamento, enquanto sua persistência ou reexpressão durante o tratamento (D33) pode indicar adaptação fenotípica com expansão de subclones mais imaturos ou resistentes, refletindo um papel adaptativo da via purinérgica com a pressão quimioterápica.

De acordo com as diretrizes da EuroFlow, os antígenos CD304 e CD73 estão combinados na posição PE na avaliação de DRM da LLA-B para facilitar a identificação das aberrâncias nas células leucêmicas (EuroFlow, 2022). A expressão de CD73 e CD304 pode variar dependendo do tecido e do estado de ativação das células, com CD304 sendo expresso em células T reguladoras, células NK e células dendríticas, além de ser um marcador de células B imaturas (Chatterjee *et al*., 2021; Gudapati *et al*., 2020); enquanto CD73 é predominantemente expresso em células B (Brum da Silva Nunes *et al*. 2022; Baldzhieva *et al*. 2025; Meyerson *et al*. 2012). Desde 2018, o HCPA adotou o uso do painel Euroflow para análise dos blastos para acompanhamento (avaliações de DRM) da LLA-B.

A alta expressão de CD73 tem sido descrita na literatura como associada a fatores prognósticos desfavoráveis e à redução da sobrevida livre de eventos em pacientes com LLA (Li, 2022; NIH Clinical Center, 2025). Considerando que o CD73 regula parte da resposta imunológica no microambiente tumoral (Gao, Huan *et al*., 2025), por meio da produção de adenosina (ADO), assim como está relacionado com a sobrevivência e proliferação dos linfoblastos na MO (Bach, *et al*., 2023; Minor, *et al*., 2019), compreender como o CD73 pode influenciar as células B saudáveis no contexto da LLA-B pode fornecer informações valiosas para o acompanhamento e tratamento desta leucemia.

A análise da expressão de CD73 em células B revelou diferença estatisticamente significativa no D15 entre os grupos de raça/cor, com maior MFI de $CD73^{+}$ entre pacientes negros ou pardos, efeito que não se manteve no D33 nem se refletiu nas frequências celulares em nenhum dos dois momentos avaliados, sugerindo que se trata de um fenômeno transitório durante a indução. Esse achado deve ser interpretado com cautela no contexto brasileiro, uma vez que a autodeclaração de raça/cor apresenta baixa correlação com ancestralidade genética devido à intensa miscigenação populacional, além de estar fortemente associada a desigualdades socioeconômicas que impactam diretamente o acesso aos serviços de saúde, o estágio da doença ao diagnóstico e as condições clínicas iniciais (Pimenta *et al.*, 2006). Estudos nacionais demonstram que a distribuição dos casos de leucemias acompanha majoritariamente o perfil demográfico regional: em Porto Alegre, onde predomina a população branca, 90,6% dos casos de leucemia aguda ocorreram nesse grupo, enquanto apenas 1% foi observado entre indivíduos negros; em contrapartida, capitais do Nordeste, como Aracaju, Salvador e Natal, apresentam maior proporção de casos entre pessoas negras e pardas (de Souza Reis *et al*., 2011). De forma convergente, Rodrigues (2021) observou 90,2% de pacientes autodeclarados brancos no Rio Grande do Sul, em consonância com a composição populacional do estado. Em âmbito internacional, dados do National Cancer

Institute (2025) indicam que crianças brancas apresentam incidência significativamente maior de LLA quando comparadas às negras; entretanto, múltiplos estudos demonstram que populações negras e pardas apresentam piores desfechos clínicos, com menores taxas de sobrevida e maior risco de recaída (Zhao *et al*., 2018; Bispo *et al*., 2020). Assim, a maior intensidade de expressão de $CD73^{+}$ observada no D15 entre pacientes negros ou pardos em nossa coorte provavelmente reflete não apenas possíveis diferenças biológicas individuais, mas, sobretudo, a influência de determinantes sociais da saúde, desigualdades de acesso, não configurando um padrão biológico estável dependente de raça/cor.

O aumento progressivo na expressão de $CD73^{+}$ com aumento do risco clínico é consistente com o que já foi observado pelo grupo (Brum da Silva Nunes *et al.*, 2022), em que o aumento de CD73 foi evidente em células Tregs e $CD4^{+}$ no grupo de alto risco. Nesta coorte, o MFI mais elevado no D33 em pacientes de risco alto quando comparados com risco baixo, que ficou evidenciado ao dicotomizar conforme estratificação para tratamento até indução (D33) em risco baixo *versus* risco intermediário e alto, sugere que CD73 acompanha a estratificação de risco, sendo mais elevado em pacientes com maior risco clínico, o que pode justificar sua associação com piores desfechos (Jiang *et al*., 2018).

Estudos em tumores sólidos demonstraram que CD73 aumenta de forma consistente a capacidade invasiva, migratória e de remodelação de matriz das células tumorais, além de promover um microambiente imunossuprimido por meio da via adenosinérgica. Esses mecanismos, descritos por Jiang *et al*., vão ao encontro aos nossos achados de que pacientes com envolvimento do sistema nervoso central (SNC) apresentaram maior MFI de CD73 no D33, reforçando o envolvimento da via purinérgica na disseminação extramedular da doença, como também já descrito em modelos experimentais que a adenosina extracelular (ADOe) pode facilitar supressão imune desencadeada por linfócitos B (Figueiró *et al*., 2016a).

Em tumores sólidos e hematológicos, a expressão elevada de CD73 está associada à resistência à quimioterapia, à evasão imune e a pior prognóstico (Allard *et al*., 2019). Contudo, se observou uma dualidade no comportamento da expressão deste marcador nos dias D15 e D33 em relação à sobrevida, sugerindo um papel favorável da expressão de CD73 nos linfócitos B no início do tratamento (D15) e um desfecho desfavorável quando altos níveis de CD73 são encontrados na membrana dos linfócitos no dia 33 após a indução..

Sędek *et al*. e Słota *et al*. demonstraram a estabilidade e até aumento da expressão de CD73 em blastos na LLA-B durante a indução, principalmente entre dx e D15 e de acordo com a literatura, a expressão elevada de CD73 está associada a uma redução da OS e PFS (da Silva Nunes *et al*., 2022; Bach *et al*., 2023; Shen *et al.*, 2025). Na avaliação do dia 15 (D15), observou-se que pacientes com maior porcentagem de células B $CD73^{+}$ apresentaram melhor OS. Entretanto, no D33, valores elevados de MFI de $CD73^{+}$ associaram-se a pior OS e PFS. Ambas as análises foram observadas principalmente na faixa etária de 1 a 9 anos, condizente com estudos de RNA-seq em que foi observado que a expressão de CD73 diminuiu com a idade (Crooke *et al.*, 2017; Fang *et al*., 2021). Esses achados indicam que o aumento da expressão de CD73 ao longo do tratamento pode representar uma possível reprogramação imune, em que o aumento tardio de expressão pode estar relacionado ao acúmulo de adenosina e, como consequência, a efeitos imunossupressores, passando a se comportar como marcador de pior prognóstico.

Os protocolos BFM (Berlin-Frankfurt-Münster) são considerados referência no tratamento da LLA entre outros tipos de câncer. Atualmente, o HCPA utiliza o protocolo de 2009 para o tratamento da LLA-B no grupo pediátrico, cujas doses são adaptadas conforme a estratificação de risco e o envolvimento do SNC (The Trial Steering Committee, 2009).

A fase inicial do tratamento (do primeiro dia ao 15º, D1→D15) BFM2009 combina agentes que induzem a liberação de ATP extracelular, remodelação metabólica e intensa

ativação do sistema imune. A análise dos principais quimioterápicos utilizados durante a indução demonstrou que a expressão de CD73 não foi diretamente modificada pelo uso de metotrexato (MTX) apesar de estudos do nosso grupo demonstrarem que o MTX pode aumentar a expressão de CD73 em células tumorais de glioblastoma e em linfócitos infiltrantes (Figueiró *et al*. 2016b; Lopes *et al*. 2021). Já as variações observadas em relação à daunorrubicina refletiram, provavelmente, a estratificação de risco dos pacientes, e não um efeito farmacológico direto sobre a expressão do marcador. Esses achados reforçam a ideia de que a expressão de CD73 está mais relacionada às características biológicas da doença do que à exposição ao tratamento.

Assim, a elevação precoce de $CD73^{+}$ em D15 pode refletir um estado inicial efetor dos linfócitos B, favorável ao prognóstico, com adaptação celular ao estresse metabólico e à morte celular induzida pela quimioterapia. Isso explica por que a maior porcentagem de células B $CD73^{+}$ no D15 se associa a melhor OS, especialmente na faixa etária de 1–9 anos, que costuma apresentar melhor resposta biológica à quimioterapia convencional. Contudo, no D33, o contexto fisiológico é completamente diferente, esses linfócitos supostamente anti-tumorais no D15 já perderam sua funcionalidade e se tornam supressores, onde a maioria dos pacientes responsivos já atingiu remissão morfológica e qualquer expressão persistente de CD73 pode ser usada por células tumorais para criar um microambiente imunossupressor, promovendo supressão das células T efetoras e NK e aumento de Treg e Breg, o que favorece a evasão imune e a resistência ao tratamento quimioterápico, favorecendo a sobrevivência de blastos residuais (de Andrade Mello *et al.*, 2017; Allard *et al.*, 2019; Campos-Contreras *et al*., 2020; Kang *et al*., 2023). Obviamente, essa especulação no shift imune dos linfócitos B precisa ser confirmada em estudo prospectivo com um amplo painel de anticorpos para diferenciar fenótipos efetores, de memória e supressores de linfócitos B, uma das principais perspectivas do trabalho e do grupo de pesquisa.

CD38 e CD73 atuam sinergicamente na produção de adenosina pela via não canônica de geração de ADO, na qual o CD38 converte $NAD^+$ em intermediários (ADPR/cADPR) que alimentam a conversão subsequente em ADO mediada por CD73 (Hogan *et al*., 2019). Essa colaboração metabólica resulta no acúmulo de ADO no microambiente tumoral, aumentando a imunossupressão e promovendo resistência terapêutica, como já descrito em linfomas e mielomas (Allard *et al*., 2019; Campos-Contreras *et a*l., 2020; Geitgey *et al*., 2023).

O alto MFI de CD73 na população duplo-positiva $CD38^{high}CD73^+$ no D15 associou-se à pior OS, indicando que, mesmo no dia 15, já existe uma subpopulação de linfócitos B supressores ($CD38^{high}$) associada a pior prognóstico. Somado à ausência de associação significativa com a PFS, a análise combinada dos marcadores demonstrou que, embora a coexpressão purinérgica CD38/CD73 não se associe à maioria das variáveis clínicas iniciais, pacientes que permaneceram com DRM(+) ao final da consolidação em D78 apresentaram maior porcentagem de células $CD38^{high}CD73^+$ no D33, um fenótipo sabidamente supressor (Figueiró *et al*., 2016a) sugerindo que a ativação da via purinérgica pode atuar como um mecanismo de evasão precoce durante a indução quimioterápica, potencialmente contribuindo para resistência ao tratamento e imunossupressão na LLA-B pediátrica, podendo estar mais relacionado à mortalidade do que diretamente à recidiva. Em contrapartida, o elevado MFI de $CD38^{high}$ em pacientes que entraram em remissão na mesma avaliação reforça que a expressão de CD38 e sua relação com DRM(+) e remissão é complexa e multifacetada (Tembhare *et al.*, 2020; da Silva Nunes *et al*., 2022), uma vez que já foi descrita a associação entre MFI elevado de CD38 e prognóstico favorável em leucemias agudas (Jiang *et al.*, 2016; Keyhani *et al.*, 2000).

Crianças de 1–9 anos apresentaram melhores taxas de sobrevida (OS) e de resposta terapêutica, enquanto adolescentes (10–17 anos) mostraram resultados menos favoráveis, mesmo com perfis de expressão semelhantes. Esse padrão é coerente com estudos que

indicam diferenças biológicas significativas entre as faixas etárias, tanto em termos de mutações recorrentes quanto de resposta imune e metabólica (Neaga *et al*., 2021; Rezayee, 2025).

Na análise de regressão de Cox multivariada, ajustada para idade e sexo, a expressão de $CD38^{high}$, avaliada tanto em frequência quanto por MFI, assim como a população duplo-positiva $CD38^{high}CD73^{+}$, não demonstraram impacto independente sobre a OS ou a PFS nos diferentes tempos avaliados. Esses achados indicam que, apesar da relevância biológica desses marcadores como componentes da via purinérgica, sua expressão, isolada ou combinada, não foi suficiente para predizer, de forma independente, a evolução clínica na coorte estudada. Em contrapartida, o elevado MFI de $CD73^{+}$ no D33 manteve-se como fator prognóstico independente para pior OS e PFS.

A persistência do impacto prognóstico de CD73 após a fase de indução (D33) sugere que esse marcador esteja envolvido não apenas nos processos iniciais de ativação celular, mas também em mecanismos ativos de resistência terapêutica, adaptação celular ao microambiente e imunossupressão mediada pela produção de ADO, amplamente descritos na literatura como vias promotoras de escape imune. Nas fases iniciais do tratamento, a expressão de CD73 pode refletir um estado transitório de ativação imunológica; entretanto, sua superexpressão persistente, de forma isolada ou em associação ao CD38, passa a se correlacionar com a manutenção da doença residual mínima, maior imunossupressão tumoral e pior sobrevida. Esse padrão sugere uma transição funcional do CD73, que deixa de atuar apenas como marcador de ativação para desempenhar papel efetivo como mediador de escape imunológico, em consonância com o conceito de “immunometabolic shift”, no qual alterações no metabolismo purinérgico sustentam a progressão tumoral e a evasão da resposta imune (Gao *et al.*, 2025). Nesse contexto, a avaliação da intensidade de expressão de CD73 nos linfócitos B no D33 pode representar uma variável adicional de valor à estratificação de

risco convencional, atualmente baseada principalmente em idade, resposta precoce ao tratamento e níveis de blastos na DRM, contribuindo para a identificação mais precisa de subgrupos de pacientes com maior risco de progressão da doença ou óbito.

Apesar do curto intervalo desde o início do tratamento, já foi demonstrado na literatura o valor prognóstico da avaliação de marcadores imunológicos e genéticos nos D15 e D33 como preditores de resposta precoce (Basso *et al*. 2009; Coustan-Smith *et al*. 2011; Šálek *et al*., 2016; Słota *et al*. 2022; Yu *et al*. 2023; Dubravčić *et al*. 2025; Inaba *et al*., 2025). Assim, compreender as características biológicas das células leucêmicas e sua resposta inicial à quimioterapia pode contribuir para refinar a estratificação de risco, otimizar protocolos terapêuticos e fortalecer abordagens personalizadas no manejo da LLA pediátrica principalmente em crianças pequenas (1–9 anos) que aparentam ter resposta imune mais sensível ao eixo ATP/ADO.

Considerando o tamanho amostral relativamente pequeno e a falta de dados sobre a atividade dos marcadores em linfócitos B na LLA, ressaltamos que mais estudos são necessários, principalmente para avaliar longitudinalmente a atividade purinérgica (enzimática e gênica), além de investigar o perfil imune regulatório (Treg/Breg) e níveis de adenosina no microambiente medular. Mesmo diante de desfechos clínicos distintos, em conjunto, os resultados deste estudo indicam que a via purinérgica, especialmente a expressão de CD73, nos linfócitos B, por citometria de fluxo, surge como um potencial biomarcador adicional de risco, capaz de complementar a análise das DRMs e os parâmetros da estratificação prognóstica. Além disso, por se tratar de uma análise de fácil implementação em centros que já utilizam as diretrizes EuroFlow, a incorporação desses marcadores na rotina laboratorial apresenta alta viabilidade e potencial aplicabilidade clínica. Desta forma, destacamos que a avaliação de CD73 e CD38 nos linfócitos B representa uma ferramenta

adicional promissora para a predição da resposta precoce ao tratamento na LLA-B pediátrica, com potencial impacto na prática clínica.

## 7. REFERÊNCIAS


AlKahiry, W.M.A., Abdelsalam, H.S.T., Alhadi, A.M., 2023. Cluster of Differentiation 38 Protein Significantly Adds to the Prognostic Value of Cytogenetic Risk in Patients with Acute Myeloid Leukemia. Oman Med. J. 38, e551. https://doi.org/10.5001/omj.2023.106.

Allard, B., Longhi, M.S., Robson, S.C., Stagg, J., 2017. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. Immunol. Rev. 276, 121–144. https://doi.org/10.1111/imr.12528.

Allard, D., Chrobak, P., Allard, B., Messaoudi, N., Stagg, J., 2019. Targeting the CD73-adenosine axis in immuno-oncology. Immunol. Lett. 205, 31–39. https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.05.001.

Ansarian, M.A., Fatahichegeni, M., Ren, J., Wang, X., 2025. Sex and gender in myeloid and lymphoblastic leukemias and multiple myeloma: from molecular mechanisms to clinical outcomes. Curr. Oncol. 32. https://doi.org/10.3390/curroncol32040204.

Arnone, M., Konantz, M., Hanns, P., Paczulla Stanger, A.M., Bertels, S., Godavarthy, P.S., Christopeit, M., Lengerke, C., Acute myeloid leukemia stem cells: the challenges of phenotypic heterogeneity., *Cancers*, 12 (12) (2020),. https://doi.org/10.3390/cancers12123742.

Asselin, B., Rizzari, C., 2015. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. Leuk. Lymphoma 56, 2273–2280. https://doi.org/10.3109/10428194.2014.1003056.

Bach, N., Winzer, R., Tolosa, E., Fiedler, W., Brauneck, F., 2023. The clinical significance of CD73 in cancer. Int. J. Mol. Sci. 24. https://doi.org/10.3390/ijms241411759.

Baldzhieva, A., Burnusuzov, H., Andreeva, H., Kalfova, T., Petrov, S., Dudova, D., Vaseva, K., Murdjeva, M., Taskov, H., 2025. Advancing Measurable Residual Disease Detection in Pediatric BCP-ALL: Insights from Novel Immunophenotypic Markers. Int. J. Mol. Sci. 26. https://doi.org/10.3390/ijms26094282.

Basso, G., Veltroni, M., Valsecchi, M.G., Dworzak, M.N., Ratei, R., Silvestri, D., Benetello, A., Buldini, B., Maglia, O., Masera, G., Conter, V., Arico, M., Biondi, A., Gaipa, G., 2009. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. J. Clin. Oncol. 27, 5168–5174. https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.8934.

Basquiera, A. L. et al. Expert Recommendations for the Diagnosis, Treatment, and Management of Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Latin America. **JCO global oncology**, v. 9, p. e2200292, May 2023.

Beltrame, M.P., Souto, E.X., Yamamoto, M., Furtado, F.M., da Costa, E.S., Sandes, A.F., Pimenta, G., Cavalcanti Júnior, G.B., Santos-Silva, M.C., Lorand-Metze, I., Ikoma-Colturato, M.R.V., 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, 499–506. https://doi.org/10.1016/j.htct.2021.04.001.

Bisht, K., Fukao, T., Chiron, M., Richardson, P., Atanackovic, D., Chini, E., Chng, W.J., Van

De Velde, H., Malavasi, F., 2023. Immunomodulatory properties of CD38 antibodies and their effect on anticancer efficacy in multiple myeloma. Cancer Med. 12, 20332–20352. https://doi.org/10.1002/cam4.6619.

Bocuzzi, V., Bridoux, J., Pirotte, M., Withofs, N., Hustinx, R., D'Huyvetter, M., Caers, J., Marcion, G., 2024. CD38 as theranostic target in oncology. J. Transl. Med. 22, 998. https://doi.org/10.1186/s12967-024-05768-6.

Bonaventure, A., Harewood, R., Stiller, C.A., Gatta, G., Clavel, J., Stefan, D.C., Carreira, H., Spika, D., Marcos-Gragera, R., Peris-Bonet, R., Piñeros, M., Sant, M., Kuehni, C.E., Murphy, M.F.G., Coleman, M.P., Allemani, C., CONCORD Working Group, 2017. Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995-2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. Lancet Haematol. 4, e202–e217. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30052-2.

Bonilha, T.A., Obadia, D.D.A., Valveson, A.C., Land, M.G.P., 2022. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia treatment in a single center in Brazil: A survival analysis study. Cancer Rep (Hoboken) 5, e1452. https://doi.org/10.1002/cnr2.1452.

Brum da Silva Nunes, V., Kehl Dias, C., Nathali Scholl, J., Nedel Sant'Ana, A., de Fraga Dias, A., Granero Farias, M., Alegretti, A.P., Sosnoski, M., Esteves Daudt, L., Bohns Michalowski, M., Oliveira Battastini, A.M., Paz, A.A., Figueiró, F., 2022. Lymphocytes from B-acute lymphoblastic leukemia patients present differential regulation of the adenosinergic axis depending on risk stratification. Discov. Oncol. 13, 143. https://doi.org/10.1007/s12672-022-00602-1.

Brunton, L.L., Knollmann, B.C., 2023. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 14th ed. McGraw-Hill Education, Minion Pro by KnowledgeWorks Global Ltd.

Calabretta, E., Carlo-Stella, C., 2020. The Many Facets of CD38 in Lymphoma: From Tumor-Microenvironment Cell Interactions to Acquired Resistance to Immunotherapy. Cells 9. https://doi.org/10.3390/cells9040802.

Campbell, M., Kiss, C., Zimmermann, M., Riccheri, C., Kowalczyk, J., Felice, M.S., Kuzmanovic, M., Kovacs, G., Kosmidis, H., Gonzalez, A., Bilic, E., Castillo, L., Kolenova, A., Jazbec, J., Popa, A., Konstantinov, D., Kappelmayer, J., Szczepanski, T., Dworzak, M., Buldini, B., Schrappe, M., 2023. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Results of the Randomized Acute Lymphoblastic Leukemia Intercontinental-Berlin-Frankfurt-Münster 2009 Trial. J. Clin. Oncol. 41, 3499–3511. https://doi.org/10.1200/JCO.22.01760.

Campos-Contreras ADR, Díaz-Muñoz M, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic signaling in the hallmarks of cancer. *Cells* 2020; **9**. DOI:10.3390/cells9071612.

Carranza, C., Granados, L., Morales, O., Jo, W., Villagran, S., Tinti, D., Villegas, M., Antillón, F., Torselli, S., Silva, G., 2013. Frequency of the ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, TCF3-PBX1, and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations. Cancer Genet. 206, 227–232. https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2013.05.017.

Cekic, C., Linden, J., 2016. Purinergic regulation of the immune system. Nat. Rev. Immunol. 16, 177–192. https://doi.org/10.1038/nri.2016.4.

Chan, L.Y., Yim, E.K.F., Choo, A.B.H., 2013. Normalized median fluorescence: an alternative flow cytometry analysis method for tracking human embryonic stem cell states during differentiation. Tissue Eng. Part C Methods 19, 156–165. https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0150.

Chatterjee, G., Dudakia, V., Ghogale, S., Deshpande, N., Girase, K., Chaturvedi, A., Shetty, D., Senger, M., Jain, H., Bagal, B., Bonda, A., Punatar, S., Gokarn, A., Khattry, N., Patkar, N.V., Gujral, S., Subramanian, P.G., Tembhare, P.R., 2021. Expression of CD304/neuropilin-1 in adult b-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and its utility for the measurable residual disease assessment. Int. J. Lab. Hematol. 43, 990–999. https://doi.org/10.1111/ijlh.13456.

Cherian, S., Soma, L.A., 2021. How I diagnose minimal/measurable residual disease in B lymphoblastic leukemia/lymphoma by flow cytometry. Am. J. Clin. Pathol. 155, 38–54. https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa242.

Coustan-Smith, E., Song, G., Clark, C., Key, L., Liu, P., Mehrpooya, M., Stow, P., Su, X., Shurtleff, S., Pui, C.-H., Downing, J.R., Campana, D., 2011. New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Blood 117, 6267–6276. https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324004.

Crooke, A., Martínez-Henández, J., Martínez-López, J., Cruz-Jentoft, A., Huete-Toral, F., Pintor, J., 2017. Low expression of CD39 and CD73 genes in centenarians compared with octogenarians. Immun. Ageing 14, 11. https://doi.org/10.1186/s12979-017-0094-3.

da Silva Nunes, V.B., Dias, C.K., De Bastiani, M.A., Farias, M.G., Spagnol, F., Alegretti, A.P., Daudt, L.E., Michalowski, M.B., Battastini, A.M.O., Paz, A.A., Figueiró, F., 2022. NT5E gene and CD38 protein as potential prognostic biomarkers for childhood B-acute lymphoblastic leukemia. Purinergic Signal. 18, 211–222. https://doi.org/10.1007/s11302-022-09841-x.

Dagogo-Jack, I., Shaw, A.T., 2018. Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. Nat. Rev. Clin. Oncol. 15, 81–94. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.166.

de Andrade Mello, P., Coutinho-Silva, R., Savio, L.E.B., 2017. Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor-Host Interaction and Therapeutic Perspectives. Front. Immunol. 8, 1526. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01526.

de Mol, J., Kuiper, J., Tsiantoulas, D., Foks, A.C., 2021. The dynamics of B cell aging in health and disease. Front. Immunol. 12, 733566. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.733566.

de Souza Reis, R., de Camargo, B., de Oliveira Santos, M., de Oliveira, J.M., Azevedo Silva, F., Pombo-de-Oliveira, M.S., 2011. Childhood leukemia incidence in Brazil according to different geographical regions. Pediatr. Blood Cancer 56, 58–64. https://doi.org/10.1002/pbc.22736.

de Souza Silva, K.A., 2018. Impacto da variação de fatores de estratificação de risco entre os protocolos de tratamento de leucemias linfoides agudas da infância (Master thesis). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto Alegre, BR-RS,.

Dubravčić, K., Lasan Trčić, R., Bilić, E., Konja, J., Rajić, L., Femenić, R., Pavlović, M., Gjadrov Kuveždić, K., Ries, S., Sučić, M., Franić Šimić, I., Zadro, R., Radić Antolic, M.,

Horvat, I., Jakovljević, G., Roganović, J., Čulić, S., Kuljiš, D., Armanda, V., Malić Tudor, K., Batinić, D., 2025. Disease characteristics and outcomes of Croatian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: pretreatment immunophenotypic predictors of high bone marrow minimal residual disease on day 15 of treatment. Croat. Med. J. 66, 100–114. https://doi.org/10.3325/cmj.2025.66.100.

Dworzak, M.N., Buldini, B., Gaipa, G., Ratei, R., Hrusak, O., Luria, D., Rosenthal, E., Bourquin, J.-P., Sartor, M., Schumich, A., Karawajew, L., Mejstrikova, E., Maglia, O., Mann, G., Ludwig, W.-D., Biondi, A., Schrappe, M., Basso, G., International-BFM-FLOW-network, 2018. AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of Pediatric acute lymphoblastic leukemia. Cytometry B Clin. Cytom. 94, 82–93. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21518.

EuroFlow, 2022. Composition and technical info of EuroFlow panels for hematological malignancies [WWW Document]. URL https://app.euroflow.org/downloads/public#:~:text=Composition%20and%20technical%20info%20of%20EuroFlow%20panels%20for%20hematological%20malignancies%20Version%201.10%20%2D%209%20September%202022 (accessed 11.11.25).

Fang, F., Cao, W., Zhu, W., Lam, N., Li, L., Gaddam, S., Wang, Y., Kim, C., Lambert, S., Zhang, H., Hu, B., Farber, D.L., Weyand, C.M., Goronzy, J.J., 2021. The cell-surface 5'-nucleotidase CD73 defines a functional T memory cell subset that declines with age. Cell Rep. 37, 109981. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109981.

Faria Monteiro, J., De Oliveira Rego, C.I., Maria Rosa, V., Kalistenys Bento Silva, W., Andrade Brandão, A., Ávila Fernandes, J.P., Curi, P., Pereira de Sá, H., Lemes Fernandes, V.F., Martini, G., Leite Nascimento, N., Hamida Casale, M., Almeida Japiassu de Freitas Queiro, L., Balthazar Curi, M.G., Oliveira Peres, P.V., 2025. Análise de mortalidade relacionada ao tratamento e à doença infantojuvenil por Leucemia Linfoblástica Aguda em um hospital do Brasil. RSC 8, 943–967. https://doi.org/10.61411/rsc202582818.

Figueiró F, Muller L, Funk S, Jackson EK, Battastini AM, Whiteside TL. Phenotypic and functional characteristics of CD39high human regulatory B cells (Breg). Oncoimmunology. 2016;5(2):e1082703. Published 2016 Feb 26. doi:10.1080/2162402X.2015.1082703

Figueiró, F., de Oliveira, C.P., Bergamin, L.S., Rockenbach, L., Mendes, F.B., Jandrey, E.H.F., Moritz, C.E.J., Pettenuzzo, L.F., Sévigny, J., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Battastini, A.M.O., 2016. Methotrexate up-regulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 and reduces the frequency of T lymphocytes in the glioblastoma microenvironment. Purinergic Signal. 12, 303–312. https://doi.org/10.1007/s11302-016-9505-8.

Gao, H., Zhang, T., Li, K., Li, X., CD73: a new immune checkpoint for leukemia treatment., *Frontiers in Immunology*, 16 (2025), 1486868. https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1486868.

Garg, N., Farhat, J., Dhankhar, S., Chauhan, S., Bala, R., Madaan, R., Sharma, H., Saini, M., Singh, T.G., Aldahish, A.A., Almarhoon, Z., Al-Omari, B., Sharifi-Rad, J., 2024. Vincristine in cancer therapy: mechanisms, efficacy, and future perspectives. Curr. Med. Chem. https://doi.org/10.2174/0109298673319496240911060138.

Geitgey, D.K., Melendez, A.J., Caldeira-Botelho, R., Kemp, M.L., Henry, C.J., Purinergic

signaling and purine base metabolism at the crossroads between immunity, metabolism, and cancer: A review, *ImmunoMedicine*, 3 (1–2) (2023),. https://doi.org/10.1002/imed.1044.

Gökbuget, N., Boissel, N., Chiaretti, S., Dombret, H., Doubek, M., Fielding, A., Foà, R., Giebel, S., Hoelzer, D., Hunault, M., Marks, D.I., Martinelli, G., Ottmann, O., Rijneveld, A., Rousselot, P., Ribera, J., Bassan, R., Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel., *Blood*, 143 (19) (2024), 1891–1902. https://doi.org/10.1182/blood.2023020794.

Gudapati, P., Khanka, T., Chatterjee, G., Ghogale, S., Badrinath, Y., Deshpande, N., Patil, J., Narula, G., Shetty, D., Banavali, S., Patkar, N.V., Gujral, S., Subramanian, P.G., Tembhare, P.R., 2020. CD304/neuropilin-1 is a very useful and dependable marker for the measurable residual disease assessment of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Cytometry B Clin. Cytom. 98, 328–335. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21866.

Gupta, S., Teachey, D.T., Chen, Z., Rabin, K.R., Dunsmore, K.P., Larsen, E.C., Maloney, K.W., Mattano, L.A., Winter, S.S., Carroll, A.J., Heerema, N.A., Borowitz, M.J., Wood, B.L., Carroll, W.L., Raetz, E.A., Winick, N.J., Loh, M.L., Hunger, S.P., Devidas, M., 2022. Sex-based disparities in outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group report. Cancer 128, 1863–1870. https://doi.org/10.1002/cncr.34150.

Hoelzer, D., 2002. Acute Lymphoblastic Leukemia. Hematology 2002, 162–192. https://doi.org/10.1182/asheducation-2002.1.162.

Hogan, K.A., Chini, C.C.S., Chini, E.N., The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases., *Frontiers in Immunology*, 10 (2019), 1187. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187.

Horn, P.R.C.B., Ribeiro-Carvalho, M. de M., Azevedo, A.M.B. de, Sousa, A.M. de, Faria, S., Wiggers, C., Rouxinol, S., Schramm, M.T., Sanches, B.S., Duarte, N.L., Seixas, T. de S.F., Gomes, B.E., Oliveira, E. de, Arcuri, L.J., Costa, E.S. da, Land, M.G.P., Souza, M.H.F.O. de, 2024. Long-Term Outcomes of Childhood Acute Lymphocytic Leukemia Treated with Adapted Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Protocols: A Multicentric Analysis from a Developing Country. Cancers (Basel) 16. https://doi.org/10.3390/cancers16162898.

Ibagy, A., Silva, D.B., Seiben, J., Winneshoffer, A.P.F.F., Costa, T.E.J.B., Dacoregio, J.S., Costa, I., Faraco, D., 2013. Acute lymphoblastic leukemia in infants: 20 years of experience. J Pediatr (Rio J) 89, 64–69. https://doi.org/10.1016/j.jped.2013.02.010.

Ikoma-Colturato, M.R.V., Beltrame, M.P., Furtado, F.M., Pimenta, G., da Costa, E.S., Azambuja, A.P., Malvezzi, M., Yamamoto, M., SBTMO MRD working group, 2021. Minimal residual disease assessment in acute lymphoblastic leukemia by 4-color flow cytometry: Recommendations from the MRD Working Group of the Brazilian Society of Bone Marrow Transplantation. Hematology, Transfusion and Cell Therapy 43, 332–340. https://doi.org/10.1016/j.htct.2020.09.148.

Inaba, H., Teachey, D., Annesley, C., Batra, S., Beck, J., Colace, S., Cooper, S., Dallas, M., Oliveira, S.D., Kelly, K., Kitko, C., Kohorst, M., Kutny, M., Lacayo, N., Lee-Miller, C., Ludwig, K., Madden, L., Maloney, K., Mangum, D., Massaro, S., Stehman, K., 2025. Pediatric acute lymphoblastic leukemia, version 2.2025, NCCN clinical practice

guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw 23, 41–62. https://doi.org/10.6004/jnccn.2025.0006.

Ingegerd Ivanov, Ö., 2017. Identification and evaluation of novel prognostic genetic markers for childhood acute lymphoblastic leukemia (Doctoral dissertation). Karolinska Institutet.

Instituto Nacional de Câncer (BR). **Câncer infantojuvenil** [Internet]. Rio de Janeiro: INCA. Disponível em: https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/infantojuvenil

Jiang, T., Xu, X., Qiao, M., Li, X., Zhao, C., Zhou, F., Gao, G., Wu, F., Chen, X., Su, C., Ren, S., Zhai, C., Zhou, C., 2018. Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. BMC Cancer 18, 267. https://doi.org/10.1186/s12885-018-4073-7.

Jiang, Z., Wu, D., Lin, S., Li, P., CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia., *Biomarker Research*, 4 (2016), 23. https://doi.org/10.1186/s40364-016-0080-5.

Kang C, Liu L, Wu C, *et al.* The adenosinergic machinery in cancer: In-tandem insights from basic mechanisms to therapy. *Front Immunol* 2023; **14**: 1111369.

Kanzaki, R., Pietras, K., Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: Opportunities for precision medicine., *Cancer Science*, 111 (8) (2020), 2708–2717. https://doi.org/10.1111/cas.14537.

Keyhani, A., Huh, Y.O., Jendiroba, D., Pagliaro, L., Cortez, J., Pierce, S., Pearlman, M., Estey, E., Kantarjian, H., Freireich, E.J., Increased CD38 expression is associated with favorable prognosis in adult acute leukemia., *Leukemia Research*, 24 (2) (2000), 153–159. https://doi.org/10.1016/s0145-2126(99)00147-2.

Kotur, N., Lazic, J., Ristivojevic, B., Stankovic, B., Gasic, V., Dokmanovic, L., Krstovski, N., Milosevic, G., Janic, D., Zukic, B., Pavlovic, S., 2020. Pharmacogenomic markers of methotrexate response in the consolidation phase of pediatric acute lymphoblastic leukemia treatment. Genes 11. https://doi.org/10.3390/genes11040468.

Kruse, A., Abdel-Azim, N., Kim, H.N., Ruan, Y., Phan, V., Ogana, H., Wang, W., Lee, R., Gang, E.J., Khazal, S., Kim, Y.-M., 2020. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. Int. J. Mol. Sci. 21. https://doi.org/10.3390/ijms21031054.

Lee, J.W., Cho, B., 2017. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Korean J. Pediatr. 60, 129–137. https://doi.org/10.3345/kjp.2017.60.5.129.

Leite, E.P., Muniz, M.T.C., Azevedo, A. da C.A.C. de, Souto, F.R., Maia, Â.C.L., Gondim, C.M. da F., Bandeira, F.M.G.C., Melo, R.A.M., 2007. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda. Rev. Bras. Saude Mater. Infant. 7, 413–421. https://doi.org/10.1590/S1519-38292007000400009.

Liao, C., Shen, D.-Y., Xu, X.-J., Song, H., Xu, W.-Q., Zhao, F.-Y., Yang, S.-L., Tang, Y.-M., 2020. High CD38 expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia is not associated with prognosis. Cancer Biomark. 27, 277–284. https://doi.org/10.3233/CBM-190946.

Li, W., 2022. Measurable residual disease testing in acute leukemia: technology and clinical significance, in: Li, W. (Ed.), Leukemia. Exon Publications, Brisbane (AU). https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-measurable-residual-disease.

Lopes, D.V., de Fraga Dias, A., Silva, L.F.L., Scholl, J.N., Sévigny, J., Battastini, A.M.O.,

Figueiró, F., 2021. Influence of NSAIDs and methotrexate on CD73 expression and glioma cell growth. Purinergic Signal. 17, 273–284. https://doi.org/10.1007/s11302-021-09775-w.

Ma, S., Wang, C., Mao, X., Hao, Y., 2019. B cell dysfunction associated with aging and autoimmune diseases. Front. Immunol. 10, 318. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00318.

Métayer, L.E., Brown, R.D., Carlebur, S., Burke, G.A.A., Brown, G.C., 2019. Mechanisms of cell death induced by arginase and asparaginase in precursor B-cell lymphoblasts. Apoptosis 24, 145–156. https://doi.org/10.1007/s10495-018-1506-3.

Meyerson, H.J., Blidaru, G., Edinger, A., Osei, E., Schweitzer, K., Fu, P., Ho, L., 2012. NRP-1/CD304 expression in acute leukemia: a potential marker for minimal residual disease detection in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. Am. J. Clin. Pathol. 137, 39–50. https://doi.org/10.1309/AJCP6VDBL4BRXRQA.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (Brasil), I., Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil, (2022), 160.

Morandi, F., Horenstein, A.L., Costa, F., Giuliani, N., Pistoia, V., Malavasi, F., 2018. CD38: A target for immunotherapeutic approaches in multiple myeloma. Front. Immunol. 9, 2722. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02722.

Moreira, F.L., Pereira Ferreira, I.R., Rosário, W.R., Santos Pereira, D.M., Casarin, J.N., Silva Figueiredo, C.S.S. e, 2021. Avaliação dos aspectos citológicos e laboratoriais da leucemia linfoide aguda. Acervo Saúde 13, e7171. https://doi.org/10.25248/reas.e7171.2021.

National Cancer Institute, 2025. National Childhood Cancer Registry Explorer (NCCR*Explorer) [WWW Document] Statistics in NCCR*Explorer. URL https://nccrexplorer.ccdi.cancer.gov/ (accessed 11.14.25).

Neaga, A., Jimbu, L., Mesaros, O., Bota, M., Lazar, D., Cainap, S., Blag, C., Zdrenghea, M., 2021. Why Do Children with Acute Lymphoblastic Leukemia Fare Better Than Adults? Cancers (Basel) 13. https://doi.org/10.3390/cancers13153886.

NIH Clinical Center, 2025. Gene ID: 4907 [WWW Document] NT5E 5'-nucleotidase ecto [Homo sapiens (human)]. URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=4907.

Nuñez-Rios JD, Ulrich H, Díaz-Muñoz M, Lameu C, Vázquez-Cuevas FG. Purinergic system in cancer stem cells. *Purinergic Signal* 2025; **21**: 23–38.

Oliveira, E., Costa, E.S., Ciudad, J., Gaipa, G., Sedek, Ł., Barrena, S., Szczepanski, T., Buracchi, C., Silvestri, D., Siqueira, P.F.R., Mello, F.V., Torres, R.C., Oliveira, L.M.R., Fay-Neves, I.V.C., Sonneveld, E., van der Velden, V.H.J., Mejstrikova, E., Ribera, J.-M., Conter, V., Schrappe, M., EuroFlow Consortium, 2022. Bone Marrow Stromal Cell Regeneration Profile in Treated B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia Patients: Association with MRD Status and Patient Outcome. Cancers (Basel) 14. https://doi.org/10.3390/cancers14133088.

Orfao, A., Matarraz, S., Pérez-Andrés, M., Almeida, J., Teodosio, C., Berkowska, M.A., van Dongen, J.J.M., EuroFlow, 2019. Immunophenotypic dissection of normal hematopoiesis. J. Immunol. Methods 475, 112684. https://doi.org/10.1016/j.jim.2019.112684.

PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002. Childhood acute lymphoblastic leukemia

treatment (PDQ®): health professional version, in: PDQ Cancer Information Summaries. National Cancer Institute (US), Bethesda (MD).

Pierce, E., Mautner, B., Mort, J., Blewett, A., Morris, A., Keng, M., El Chaer, F., MRD in ALL: optimization and innovations., *Current Hematologic Malignancy Reports*, 17 (4) (2022), 69–81. https://doi.org/10.1007/s11899-022-00664-6.

Pui, C.-H., Yang, J.J., Hunger, S.P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., Vora, A., Baruchel, A., Silverman, L.B., Schmiegelow, K., Escherich, G., Horibe, K., Benoit, Y.C.M., Izraeli, S., Yeoh, A.E.J., Liang, D.-C., Downing, J.R., Evans, W.E., Relling, M.V., Mullighan, C.G., 2015. Childhood acute lymphoblastic leukemia: progress through collaboration. J. Clin. Oncol. 33, 2938–2948. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.1636.

Pui, C.H., Boyett, J.M., Relling, M.V., Harrison, P.L., Rivera, G.K., Behm, F.G., Sandlund, J.T., Ribeiro, R.C., Rubnitz, J.E., Gajjar, A., Evans, W.E., 1999. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. J. Clin. Oncol. 17, 818–824. https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.3.818.

Rezayee, F., 2025. Whole genome sequencing in pediatric ALL - a tool for understanding chromosomal aberrations and improving diagnostic procedures. Karolinska Institutet. https://doi.org/10.69622/28444694.v1.

Rodrigues, L.T., 2021. Avaliação dos Atrasos de Diagnóstico e Tratamento deLeucemias nas Regiões de Saúde do Rio Grande do Sul (Master thesis). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Administração. Curso de Especialização em Gestão em Saúde.

Rodriguez, A., Wengyn, M., Vu, M.H., Doan, A., Raca, G., Bhojwani, D., Gaynon, P.S., Kovach, A.E., 2023. Impact of Central Nervous System (CNS) Leukemia Status-Based Therapeutic Protocol Change on the Incidence of CNS2 Diagnosis in Pediatric B-Lymphoblastic Acute Leukemia. Blood 142, 1457–1457. https://doi.org/10.1182/blood-2023-190743.

Rojas, M., Casado, M., Portugal, J., Piña, B., 2008. Selective inhibition of yeast regulons by daunorubicin: a transcriptome-wide analysis. BMC Genomics 9, 358. https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-358.

Šálek, C., Folber, F., Froňková, E., Procházka, B., Marinov, I., Cetkovský, P., Mayer, J., Doubek, M., Czech Leukemia Study Group - for Life, 2016. Early MRD response as a prognostic factor in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Eur. J. Haematol. 96, 276–284. https://doi.org/10.1111/ejh.12587.

Saygin, C., Cannova, J., Stock, W., Muffly, L., 2022. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. Haematologica 107, 2783–2793. https://doi.org/10.3324/haematol.2022.280638.

Sędek, Ł., Bulsa, J., Sonsala, A., Twardoch, M., Wieczorek, M., Malinowska, I., Derwich, K., Niedźwiecki, M., Sobol-Milejska, G., Kowalczyk, J.R., Mazur, B., Szczepański, T., 2014. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: how different are they from their normal counterparts? Cytometry B Clin. Cytom. 86, 329–339. https://doi.org/10.1002/cyto.b.21176.

Sędek, Ł., Theunissen, P., Sobral da Costa, E., van der Sluijs-Gelling, A., Mejstrikova, E., Gaipa, G., Sonsala, A., Twardoch, M., Oliveira, E., Novakova, M., Buracchi, C., van Dongen, J.J.M., Orfao, A., van der Velden, V.H.J., Szczepański, T., EuroFlow Consortium, Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. leukemic

B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia., *Journal of Immunological Methods*, 475 (2019), 112429. https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.005.

Shen, J., Liao, B., Gong, L., Li, S., Zhao, J., Yang, H., Gong, Y., Li, Y., 2025. CD39 and CD73: biological functions, diseases and therapy. Mol. Biomed. 6, 97. https://doi.org/10.1186/s43556-025-00345-9.

Silva, F.A., 2009. Avaliação epidemiológica das leucemias linfoblásticas em criançasbrasileiras e implicações das infecções em sua patogênese (Doctoral dissertation). Instituto Nacional de Câncer. Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer (INCA-RJ).

Słota, Ł., Sędek, Ł., Kulis, J., Perkowski, B., Malinowska, I., Zawitkowska, J., Kazanowska, B., Derwich, K., Niedźwiecki, M., Mizia-Malarz, A., Muszyńska-Rosłan, K., Kołtan, A., Karolczyk, G., Machnik, K., Urasiński, T., Lejman, M., Badowska, W., Młynarski, W., Kowalczyk, J., Szczepański, T., 2022. Expression of CD73 on leukemic blasts increases during follow-up - a promising candidate marker for minimal residual disease detection in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Cent. Eur. J. Immunol. 47, 84–91. https://doi.org/10.5114/ceji.2022.114530.

Taalas, T.L., Oskarsson, T., Heyman, M., Lund, B., Lepik, K., Vaitkevičiene, G., Jonsson, O.G., Eriksson, J., Toft, N., Griškevičius, L., Hallbook, H., Palk, K., Wartiovaara-Kautto, U., Quist-Paulsen, P., Noren-Nystrom, U., Vettenranta, K., Abrahamsson, J., Schmiegelow, K., Lahteenmaki, P.M., 2025. Impact of age and sex on survival outcomes in patients aged 1-45 years with acute lymphoblastic leukemia treated according to the stratification used in the NOPHO ALL2008 trial. Haematologica 110, 1723–1735. https://doi.org/10.3324/haematol.2024.286043.

Tabassum, D.P., Polyak, K., 2015. Tumorigenesis: it takes a village. Nat. Rev. Cancer 15, 473–483. https://doi.org/10.1038/nrc3971.

Terwilliger, T., Abdul-Hay, M., 2017. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. Blood Cancer J. 7, e577. https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53.

Testi, A.M., Attarbaschi, A., Valsecchi, M.G., Möricke, A., Cario, G., Niggli, F., Silvestri, D., Bader, P., Kuhlen, M., Parasole, R., Putti, M.C., Lang, P., Flotho, C., Mann, G., Rizzari, C., Barisone, E., Locatelli, F., Linderkamp, C., Lauten, M., Suttorp, M., AIEOP-BFM (Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica & Berlin-Frankfurt-Münster) Study Group, 2019. Outcome of adolescent patients with acute lymphoblastic leukaemia aged 10-14 years as compared with those aged 15-17 years: Long-term results of 1094 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. Eur. J. Cancer 122, 61–71. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2019.09.004.

The Trial Steering Committee, 2009. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia.

van Dongen, J.J.M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V.H.J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécrevisse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A.W., Mendonça, A., Macintyre, E., Martin-Ayuso, M., Hrusak, O., Vidriales, M.B., Orfao, A., EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708), EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of

normal, reactive and malignant leukocytes., *Leukemia*, 26 (9) (2012), 1908–1975. https://doi.org/10.1038/leu.2012.120.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Early Detection. n. ISBN 92 4 154733 8, 2007.

Wieten, E., van der Linden-Schrever, B.E.M., Sonneveld, E., Veerman, A.J., Pieters, R., 2011. CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 25, 1374–1376. https://doi.org/10.1038/leu.2011.174.

Witkowski, M.T., Dolgalev, I., Evensen, N.A., Ma, C., Chambers, T., Roberts, K.G., Sreeram, S., Dai, Y., Tikhonova, A.N., Lasry, A., Qu, C., Pei, D., Cheng, C., Robbins, G.A., Pierro, J., Selvaraj, S., Mezzano, V., Daves, M., Lupo, P.J., Scheurer, M.E., Aifantis, I., 2020. Extensive remodeling of the immune microenvironment in B cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cell 37, 867-882.e12. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.015.

Xia, L., Oyang, L., Lin, J., Tan, S., Han, Y., Wu, N., Yi, P., Tang, L., Pan, Q., Rao, S., Liang, J., Tang, Y., Su, M., Luo, X., Yang, Y., Shi, Y., Wang, H., Zhou, Y., Liao, Q., The cancer metabolic reprogramming and immune response., *Molecular Cancer*, 20 (1) (2021), 28. https://doi.org/10.1186/s12943-021-01316-8.

Yu, C.-H., Jou, S.-T., Su, Y.-H., Coustan-Smith, E., Wu, G., Cheng, C.-N., Lu, M.-Y., Lin, K.-H., Wu, K.-H., Chen, S.-H., Huang, F.-L., Chang, H.-H., Wang, J.-L., Yen, H.-J., Li, M.-J., Chou, S.-W., Ho, W.-L., Liu, Y.-L., Chang, C.-C., Lin, Z.-S., Yang, Y.-L., 2023. Clinical impact of minimal residual disease and genetic subtypes on the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer 129, 790–802. https://doi.org/10.1002/cncr.34606.

Zhang, L., Habeebu, S.S.M., Li, W., 2022. Prognostic and Predictive Biomarkers in Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia, in: Li, W. (Ed.), Leukemia. Exon Publications, Brisbane (AU). https://doi.org/10.36255/exon-publications-leukemia-biomarkers-lymphoblastic-leukemia.

Zhao, Y., Wang, Y., Ma, S., 2018. Racial differences in four leukemia subtypes: comprehensive descriptive epidemiology. Sci. Rep. 8, 548. https://doi.org/10.1038/s41598-017-19081-4.

Zhuang, Y., Wu, K., Zhu, X., Cai, J., Hu, S., Gao, J., Jiang, Hua, Zhai, X., Tian, X., Fang, Y., Jin, R., Hu, Q., Jiang, Hui, Wang, N., Sun, L., Leung, W.K., Yang, M., Pan, K., Wu, X., Liang, C., Ju, X., 2022. Reduced Dose Intensity of Daunorubicin During Remission Induction for Low-Risk Patients With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Retrospective Cohort Study of the Chinese Children's Cancer Group. Front. Oncol. 12, 911567. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.911567.

# 8. ANEXOS

## 8.1 Todas as principais alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfóide aguda (LLA) descritas até o momento

**Quadro 3: Alterações citogenéticas e genômicas associadas à leucemia linfoide aguda (LLA)**

| Alteração genética/citogenética | Características principais | Frequência aproximada | Implicações prognósticas e terapêuticas |
|---|---|---|---|
| **iAMP21 (Amplificação intracromossômica do cromossomo 21)** | Amplificação de segmentos do cromossomo 21; inicialmente associada a mau prognóstico | ~2% dos casos de LLA-B | Mau prognóstico em pacientes de risco baixo; quimioterapia intensiva pode neutralizar o impacto adverso, dispensando TCTH na primeira remissão.<br>**associada a idade mais avançada, baixa contagem leucocitária e maior risco de doença residual mensurável (DRM)*<br>***nos casos pediátricos está relacionada a maior risco de recaída* |
| **PAX5alt (alterações no gene PAX5, fator de transcrição; regula genes específicos da linhagem B nos estágios iniciais)** | Inclui rearranjos (ex.: *PAX5::ETV6*), variantes de sequência e amplificações intragênicas; microdeleção 9p13 | ~1% dos casos de LLA-B | Prognóstico relativamente desfavorável, principalmente em adultos; considerado LLA de alto risco. Perfil de expressão gênica distinto, com mais de 20 parceiros de fusão, incluindo *ETV6*, etc. |
| **PAX5 p.P80R** | Mutação em ponto crítico (mutação PAX5 p.Pro80Arg); microdeleção 9p13 | Mais comum em adolescentes e jovens adultos (AYA) | Prognóstico intermediário, discordância quanto a prognóstico no grupo pediátrico, Em todos os casos, houve inativação do segundo alelo *PAX5* (semelhante a *PAX5alt)* |
| **CRLF2** | Alterações genômicas (translocações *IGH::CRLF2* ou Xp22.33 e Yp11.2 ou fusão *P2RY8::CRLF2*) | 5–10% dos casos de LLA-B; até 60% em LLA associada à síndrome de Down | Frequente em pacientes com ancestralidade hispânica; associada a mutações em JAK e deleções de *IKZF1* e prognóstico variável conforme expressão |
| **IKZF1** | Deleções completas ou parciais do gene *IKZF1, que codifica o fator de transcrição IKAROS*<br>**frequentemente em associação com LLA Ph+ ou fenótipo* ***Ph-like*** | 70–80%, ~15% dos casos pediátricos de LLA-B | Indicador independente de mau prognóstico; mais comum em pacientes de alto risco e com contagem leucocitária elevada, fortemente associado a recaídas e menor sobrevida livre de eventos (PFS) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **EBF1** | Fusão gênica EBF1-PDGFRB | <1% dos casos deLLA-B | Ocorre junto com **BCR::ABL1-like (*Ph-like*)**, respondem lentamente a quimioterapia e demora a negativar DRM, mas protocolo intensivo, tem remissão duradoura |
| **MYC (8q24)** | Rearranjos do gene *MYC* em células precursoras B | Raro | Prognóstico incerto; tratamento ideal ainda indefinido |
| **KMT2A-rearranjado (t(v;11q23.3))** | Fator de transcrição; regula a expressão gênica durante a hematopoiese, fusão *KMT2A::AFF1* e outras (>100 possibilidades de parceiros possíveis) | Predomina em lactentes (~80%) | Prognóstico desfavorável; resposta inicial pobre e envolvimento frequente do SNC, associação com recaída precoce (CD10 negativo, CD15, CD33 e CD68 positivos) |
| **BCR::ABL1 (Ph+)** | Fusão *BCR::ABL1* (t(9;22)(q34.1;q11.2)) | ~25% dos adultos jovens; raro em crianças pequenas | Historicamente de mau prognóstico, associado com pacientes de alto risco; TCTH é considerado em primeira remissão; uso de inibidores de tirosina-quinase melhora resultados; 80% com deleção de *IKZF1* |
| **BCR::ABL1-like (*Ph-like*)** | Perfil de expressão semelhante ao *BCR::ABL1*, mas sem fusão detectável | 3–10% dos casos pediátricos | Apresenta mutações ativadoras em genes de tirosina quinase (*ABL1, CRLF2, PDGFRB e JAK2) e costuma estar associado à resistência ao tratamento, sendo associado a prognóstico* desfavorável e alta carga de DRM, risco mitigado por tratamento guiado por MRD |
| **ETV6::RUNX1 (t(12;21)(p13.2;q22.1))** | Fusão entre *ETV6* e *RUNX1* | ~25% dos pacientes de risco baixo e 10% de alto risco | Prognóstico favorável, mas há maior risco de recidivas tardias; possível persistência de clones pré-leucêmicos |
| **ETV6::RUNX1 like** | Translocação | | Prognóstico não favorável, mais de 80% ocorrem em crianças. Alterações em *ETV6* e *IKZF1.* |
| **TCF3::PBX1 (t(1;19)(q23.3;p13.3))** | Fusão de *TCF3* e *PBX1 (regula muitos processos embrionários, incluindo a hematopoiese)* | 4–5% dos casos pediátricos, ~25% das LLA pré-B | Prognóstico intermediário a excelente; associado a mutações em genes da via RAS, alto risco de infiltração no SNC e recidiva, mas desfechos favoráveis quando tratadas com quimioterapia intensiva (LLA risco intermediário). Expressa cadeia pesada μ de imunoglobulina citoplasmática. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **TCF3::HLF (t(17;19)(q22;p13.3))** | Fusão rara com manifestações clínicas graves (*TCF3*: relacionado a linfopoiese; necessário para o desenvolvimento de células B e T, enquanto *HLF* é um ativador transcricional) | <1% dos casos | Prognóstico reservado; pode cursar com coagulação intravascular disseminada e hipercalcemia, considerado LLA de alto risco, pode levar a deleção do gene *PAX5* e mutações nos genes da via RAS. |
| **DUX4-rearranjado / ERG-deletado** | Superexpressão de *DUX4 (Ativador transcricional)*, frequentemente com deleção de *ERG (Regulador transcricional da hematopoiese)* | 3–6% dos casos | Excelente prognóstico, com sobrevida global >90%. O parceiro mais frequente é *IGH*, CD2 e CD371 positivos |
| **MEF2D-rearranjado** | Fusão envolvendo *MEF2D* (microdeleção 1q22), controle do crescimento celular dos linfócitos B, sobrevivência e apoptose | 0,3–3% dos casos | Prognóstico inferior; sobrevida em 5 anos ~72%; deleção de *IKZF1* e *CDKN2A/B* (CD10 negativo, CD38 positivo) |
| **ZNF384-rearranjado** | Microdeleção no braço curto (p) do cromossomo 12 (12p12), fusão de *ZNF384* com diferentes parceiros | 0,3–2,7% dos casos | Prognóstico variável conforme fusão, perfil de expressão distinto (CD13 e CD33 positivos, CD10 negativo ou fraco) |
| **NUTM1-rearranjado** | Alteração recorrente em lactentes sem *KMT2A* rearranjado; microdeleção 15q14 | 3–5% dos casos infantis. | Associado a prognóstico favorável |
| **IGH::IL3 (t(5;14)(q31.1;q32.3))** | Fusão associada à hipereosinofilia reativa | Raro | Implica regulação anômala de *IL3*; prognóstico variável, ausência de blastos periféricos<br>**envolvem genes como **BCL2**, **CEBP**, **EPOR**, **ID4** e **CRLF2**, tendem a ocorrer em pacientes mais velhos e a associar-se a piores desfecho* |
| **CDKN2A (9p21.3)** | Deleção/hipermetilação na região 21.3 do braço curto (p) do cromossomo 9 | - | Regulação do ciclo celular, supressão tumoral, associado a prognóstico ruim |
| **Hiperdiploidia (51–65 cromossomos)** | Ganho de cromossomos, frequentemente envolvendo vias *RTK/RAS* | 20-25% dos casos | Bom prognóstico, associado a mutações em genes que codificam modificadores de histonas (ex.: *CREBBP* ) e na via RTK-RAS (ex.: *FLT3* ); eventos genéticos precoces na patogênese<br>***Hiperdiploidia baixa (47–50 cromossomos) possui prognóstico não favorável** |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **Quase haploidia (24–29 cromossomos)** | Inibidores de Bcl2 | | Prognóstico muito ruim, pode estar associado a alterações em *NF1, NRAS, KRAS, FLT3* , etc. |
| **Hipodiploidia (<44 cromossomos)** | Padrões próximo à haplóide ou hipoploidia | 2–4% dos casos | Prognóstico desfavorável; associação com variantes germinativas de *TP53* (>90%) |
| **Genômica da LLA em síndrome de Down** | 50–60% com rearranjos *CRLF2*; 3% com *IGH::IGF2BP1* | 5–10% de todas as LLA infantis | Prognóstico intermediário; *IGH::IGF2BP1* associado a melhor sobrevida; *BCR::ABL1-like* piora o desfecho |

**Fonte: Adaptado de *Children's Oncology Group (COG)*; *St. Jude Total Therapy*; Zhang *et al*., 2022; PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002; Rezayee, 2025; Ingegerd Ivanov, 2017; Yu *et al*,. 2023; Kruse *et al*., 2020; Carranza *et al*., 2013.**

8.2 Fase de indução do protocolo quimioterápico BFM2009 para tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda do tipo B, utilizado para tratamento pediátrico.

**Quadro 5: Representação da fase de indução do protocolo quimioterápico BFM2009 para tratamento de LLA-B.**

| **Característica** | **Prednisolona** | **Vincristina** | **Daunorrubicina** | **Metotrexato** | **L-Asparaginase** |
|---|---|---|---|---|---|
| Tratamento | **3 doses por dia D1 à D33** | **1 dose por dia D8, D15, D22, D29** | **2x dia: D8, D15 4x dia*: D8, D15, D22, D29** | **1 dose dia#: D1, D12, D33 CNS(+): D1, D12, D18, D27, D33** | **1 dose dia: D12, D15, D18, D21, D24, D27, D30, D33** |
| Classe | Glicocorticoide | Alcaloide da vinca | Antraciclina | Antimetabólito (antifolato) | Enzima bacteriana (antimetabólito indireto) |
| Alvo celular | Receptor nuclear | Microtúbulos | DNA / topoisomerase II | DHFR (síntese de DNA) | Asparagina extracelular |
| Modo de ação | Modulação gênica | Bloqueio da mitose | Dano ao DNA + ROS | Bloqueio da síntese de nucleotídeos | Degradação da asparagina plasmática |
| Fase do ciclo celular | Não específica | Fase M | Fases S e G2 | Fase S | Não específica (metabólica) |
| Tipo de efeito | Antiinflamatório, imunossupressor (apoptose) | Quimioterápico (efeito citotóxico direto) | Antibiótico citotóxico direto | Quimioterápico, imunossupressor antiproliferativo direto | Depleção metabólica / apoptose seletiva meio |
| Toxicidade principal | Imunossupressão, hiperglicemia | Neuropatia periférica | Cardiotoxicidade | Mielossupressão, hepatotoxicidade | Pancreatite, hepatotoxicidade, reações alérgicas |

**Legenda: * indica se paciente estratificado em risco intermediário ou alto; # indica ajuste de dose conforme idade, sendo: <1 ano=6mg, ≥ 1 < 2=8mg, ≥ 2 < 3=10mg, ≥ 3=12mg**

**Fonte: Rojas *et al*., 2008; The Trial Steering Committee, 2009; Asselin & Rizzari, 2015; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017; Métayer *et al*., 2019; Kotur *et al.,* 2020; Zhuang *et al*., 2022; Brunton & Knollmann, 2023; Garg *et al*., 2024**

8.3 Carta de aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327)

UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

HOSPITAL DE CLÍNICAS
PORTO ALEGRE RS

**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**Grupo de Pesquisa e Pós Graduação**

**Carta de Aprovação**

**Projeto**

2022/0094

**Pesquisadores:**

**ALESSANDRA APARECIDA PAZ**

| | | |
|---|---|---|
| VITÓRIA BRUM DA SILVA NUNES | MARIANA BOHNS MICHALOWSKI | JULIETE NATHALI SCHOLL |
| ANA PAULA ALEGRETTI | FABRÍCIO FIGUEIRÓ | MONALISA SOSNOSKI |
| LIANE ESTEVES DAUDT | MARIELA GRANERO FARIAS | CAMILA KEHL DIAS |
| ALEXIA NEDEL SANTANA | | |

**Número de Participantes:** 594

**Título:** Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda e sua relação com a imunomodulação

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avalição de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).

04/08/2022

Assinado digitalmente por:
**PATRICIA ASHTON PROLLA**
DIRETORIA DE PESQUISA
04/08/2022 11:27:36

Impresso do sistema AGHUse-Pesquisa por CRISTIAN FIDALGO CABRAL em 04/08/2022 09:29:17

8.4 Parecer do Projeto de Mestrado do PPG – Bioquímica que foi associado ao projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327)

PPG Ciências Biológicas Bioquimica

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

O projeto de pesquisa intitulado **"REPOSICIONAMENTO DE ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DA CD73 E CD38 NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B** " da aluna **Sacha Krolow e Silva** sob a orientação da Prof. Fabrício Figueiró, vinculado ao PPG Ciências Biológicas – Bioquímica desta Universidade, apresentado para apreciação da Comissão de Pós-Graduação, apresenta:

- Um tema relevante e com mérito científico uma vez que propõe -estudar o perfil de expressão de CD73 e CD 38 nos linfócitos B e medula óssea de pacientes com LLA-B e a sua potencial relação com desfechos clínicos de longo prazo.
- Uma introdução fundamentada e com objetivos adequados ao estudo proposto. A metodologia é coerente para que os objetivos sejam alcançados, e a colaboração já em andamento com o HCPA proporciona a infraestrutura adequada para a execução do projeto.
- Um cronograma de execução que prevê o período de 21 meses para a realização do projeto.

O projeto atende as exigências do "n" amostral, do detalhamento dos procedimentos experimentais e do tratamento dos rejeitos.

Sendo assim, somos de parecer favorável à aprovação do presente projeto.

Parecer aprovado em 05 de Dezembro de 2023

_____Prof Dr. Luis Valmor C Portela_

FÁTIMA T. C. R. GUMA
COORDENADORA DO
PPG BIOQUÍMICA
SIAPE - 3523322

## 8.5 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Meio Eletrônico do projeto 2022/0094 (CAAE: 60106922000005327)

ANEXO: TCLE MEIO ELETRÔNICO

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Nº do projeto GPPG ou CAAE: 60106922000005327**

Título do Projeto: AVALIAÇÃO DE CD38 COMO POSSÍVEL BIOMARCADOR PURINÉRGICO PARA LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA E SUA RELAÇÃO COM A IMUNOMODULAÇÃO

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender o comportamento e características de uma proteína, CD38, presente em células imunes da medula óssea e sangue periférico que parece ter um papel importante na progressão da Leucemia Linfocítica Aguda. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você autorizar, a participação na pesquisa envolverá a análise de dados provenientes de exames já realizados e do prontuário da pessoa pela qual você é responsável. Estes dados estão armazenados confidencialmente no sistema do HCPA, e serão utilizados apenas para correlacionar a presença do grupo de células imunes em questão e os dados do prontuário.

A participação na pesquisa não confere riscos ou desconfortos, uma vez que não haverá coleta de sangue ou qualquer outro material biológico além das coletas que a pessoa pela qual você é responsável já realizou.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são contribuir para o melhor entendimento de como se comportam as células imunes no contexto da Leucemia Linfocítica Aguda. Desta forma é possível encontrar novos alvos para auxiliar na melhora do tratamento desta doença. Além disso, a participação na pesquisa estará contribuindo no entendimento das diferenças que o tratamento pode ocasionar nas características e quantidade dessas células. Todas estas informações poderão auxiliar pacientes que apresentarem Leucemia Linfocítica Aguda no futuro.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar, ou ainda, desistir da participação e retirar a autorização, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que a pessoa pela qual você é responsável recebe ou poderá vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da participação na pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem

nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome ou da pessoa pela qual você é responsável não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fabrício Figueiró, pelo telefone (51) 3308-5554, ou com a pesquisadora Vitória Brum da Silva Nunes pelo telefone (51) 3308-5553, ou com a pesquisadora Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51) 3359-8317 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, pelo telefone (51) 3359-7640, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 5º andar do Bloco C do HCPA, Avenida Protásio Alves, 211 - Portão 4, de segunda à sexta, das 8h às 17h. O CEP é um órgão colegiado, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, cuja finalidade é avaliar, emitir parecer e acompanhar os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, em seus aspectos éticos e metodológicos, realizados no âmbito da instituição.

Este Termo foi enviado aos participantes por meio eletrônico. Os pesquisadores armazenarão registro eletrônico (arquivo, imagem ou áudio) da concordância em participar do estudo. Sugere-se que os participantes armazenem este arquivo eletrônico (salvar imagem ou arquivo em pdf) ou ainda imprimam este Termo.

_____
Nome do responsável

_____
Assinatura

_____
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

_____
Assinatura

Local e Data: _____

8.6 Roteiro de Ligação Telefônica do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327).

**Roteiro de ligação telefônica: REPOSICIONAMENTO DE ANÁLISE IMUNOFENOTÍPICA DA CD73 E CD38 NA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DO TIPO B**

Projeto número GPPG ou CAAE: 60106922.0.0000.5327

Bom dia/Boa tarde, o meu nome é Sacha Krolow e Silva, sou pesquisadora do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Gostaria de falar com o responsável do(a) paciente _____.

(Caso paciente tenha falecido, prestar condolências).

Estou ligando para convidar o(a) senhor(a) a participar da minha pesquisa, pois verificamos que pessoa pela qual você é responsável [nome do paciente] realizou tratamento e acompanhamento no Hospital de Clínicas após o diagnóstico de Leucemia Linfóide Aguda.

Se tiver interesse em participar, você ou a pessoa pela qual você é responsável não precisará responder nenhuma pergunta, apenas estará dando permissão para termos acesso aos exames realizados no período de acompanhamento pelo Serviço de Hematologia e ao prontuário (falar do ano que foi diagnosticado).

O objetivo do projeto é entender o comportamento e características de algumas células presentes na medula óssea e sangue que parecem ter um papel importante na progressão da LLA-B.

Ressaltamos que caso não tenha interesse em participar, isto não interfere em nada [só se ainda estiver em acompanhamento] no **seu** atendimento **ou** da pessoa pela qual você é responsável, ou em consultas e exames já agendados.

Se estiver de acordo, perguntar em qual contato de preferência gostaria de receber o Termo de Compromisso Livre e Esclarecido do projeto, onde constam as informações detalhadas.

Contato para envio do TCLE (email/Whatsapp/mensagem): _____

Gostaria de participar: ( ) Sim
( ) Não

Se não aceitar, agradecer pelo tempo e atenção.

Perguntar se a pessoa possui mais alguma dúvida e ressaltar que os contatos dos pesquisadores e do CEP estão no Termo enviado.

Pesquisador responsável: Fabrício Figueiró

Contato disponibilizado: (51) 3308-5554

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação:
Participante:
Dia da ligação:
Hora da ligação:
Gravação da ligação (  ) Sim (  ) Não
Pesquisador que realizou a ligação:
Assinatura do Pesquisador:

Paciente:

Contato para envio do TCLE (email/Whatsapp/mensagem): _____

Gostaria de participar: (  ) Sim
(  ) Não

Pesquisador responsável: Fabrício Figueiró.

Contato disponibilizado: (51) 3308-5554

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação:
Participante:
Dia da ligação:
Hora da ligação:
Gravação da ligação (  ) Sim ( x  ) Não
Pesquisador que realizou a ligação:
Assinatura do Pesquisador: