

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

Vitória Brum da Silva Nunes

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E PURINÉRGICOS NA  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO B**

Porto Alegre

2020

Vitória Brum da Silva Nunes

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNOLÓGICOS E PURINÉRGICOS EM  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA 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

2020

### CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Vitória Brum da Silva  
Avaliação de marcadores imunológicos e purinérgicos  
na leucemia linfocítica aguda do tipo B / Vitória Brum  
da Silva Nunes. -- 2020.  
126 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, 2020.

1. Leucemia linfocítica aguda. 2. Imunomodulação.  
3. Linfócitos regulatórios. 4. Sistema purinérgico. 5.  
Ectonucleotidases. I. Figueiró, Fabrício, orient. II.  
Título.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus queridos pais, Carlos e Debora, por tanto apoio, dedicação e, principalmente, amor. Sem vocês nada disso seria possível, por isso, essa e todas as vitórias da minha vida dedico a vocês. Amo vocês mais do que tudo no mundo! Aos meus irmãos, Leonardo e Ícaro, obrigado por serem meus parceiros de vida, a mana estará sempre aqui para/por vocês.

A minha família, em especial aos meus queridos avós: Darcy, Gilberto, Eronita e Sirley. Vô Darcy, obrigada pelo teu apoio ao longo dessa minha caminhada, sei que o senhor tem muito orgulho de mim, e eu, de ti. Vô Beto, já não estamos no mesmo plano espiritual a alguns anos, mas tenho certeza que acompanhas minhas vitórias e batalhas e, sempre, torce e cuida de mim aí de cima. Minhas amadas vózinhas: Vó Nita e Vó Jane, obrigada por me amarem tanto. Amo vocês!

Ao meu amado namorado, Bruno, obrigada pelo entendimento, amizade, parceria e por tanto respeito e amor. Que possamos trilhar juntos essa jornada da vida, sempre em sintonia. Que possamos acompanhar o crescimento um do outro e que, um dia, sejamos os cientistas que almejamos ser. Eu te amo!

Ao meu querido orientador, Fabrício Figueiró, obrigada pela confiança e por acreditar no meu potencial. Fostes amigo, professor e um excelente orientador. À Profa. Ana Maria Battastini, por me acolher em seu laboratório e pelos ensinamentos. A todos os professores que passaram pela minha vida ao longo desses anos, desde o colégio, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 22, obrigada por tudo, vocês tornaram essa caminhada mais leve. Sou uma cientista melhor hoje, pois tive vocês como professores. Meninas do Setor de Diagnóstico Especializado do Hospital de Clínicas, obrigada pela amizade, pela paciência e pelo apoio ao longo dessa caminhada. Agradecimento especial a Dra. Alessandra Paz, a Fabiane Spagnol e a Mariela Granero. Mari, acreditastes no meu potencial e me fizestes amar a citometria de fluxo, obrigada por tanto.

Obrigada aos meus queridos amigos, que tornam meus dias mais coloridos e leves, que me ensinam a ser uma pessoa melhor, que acreditam no meu potencial e torcem pelas minhas vitórias e, principalmente, pela minha felicidade. Agradecimento especial as minhas amigas, presentes do Rondon, que são parceiras de vida: Flavia, Francyne e Maria Luiza.

Por fim, agradeço aos componentes da banca pela disponibilidade na avaliação desse trabalho, aos funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao apoio financeiro das instituições: CAPES, CNPq, FAPERGS, PROPESQ e UFRGS.

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

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”*

*(Carl Jung)*

# SUMÁRIO

## PARTE I

RESUMO .....	9
ABSTRACT .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
1.1 Leucemia Linfóide Aguda (LLA).....	12
1.1.1 Grupos de risco na leucemia linfóide aguda .....	15
1.2 Sistema purinérgico e modulação do sistema imune nas neoplasias hematológicas .....	17
1.3 Linfócitos B regulatórios (Breg) e T regulatórios (Treg) .....	19
2 OBJETIVOS .....	24
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2. Objetivos Específicos.....	24

## PARTE II

Capítulo I: Manuscrito a ser submetido para publicação .....	25
Capítulo II: Resultados <i>in vivo</i> .....	52
1 METODOLOGIA.....	53
1.1 Amostras.....	53
1.1.1 Critérios de Inclusão .....	54
1.1.2 Critérios de Exclusão .....	54
1.2 Pacientes .....	54
1.3 Imunofenotipagem.....	55
1.3.1 Análise das populações celulares por citometria de fluxo .....	56
1.4 Análise estatística dos resultados .....	57
2 RESULTADOS .....	57
2.1 Aspectos fenotípicos de linfócitos com ênfase em CD38+, CD39+ e CD73+ no grupo LLA-Medula Óssea .....	59
2.2 Aspectos fenotípicos de linfócitos e frequência de linfócitos CD38+, CD39+ e CD73+ no grupo sangue periférico .....	64
2.3 Aspectos fenotípicos de linfócitos no grupo sangue periférico – Risco padrão (baixo).....	70
2.4 Aspectos fenotípicos de linfócitos no grupo sangue periférico – Risco alto.....	72
2.5 Frequência de linfócitos CD38+, CD39+ e CD73+ no grupo sangue periférico, risco padrão (baixo) e risco alto.....	75
3 DISCUSSÃO .....	82
PARTE III.....	91
DISCUSSÃO .....	92

<b>CONCLUSÃO</b> .....	101
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	102
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	103
ANEXO A: Carta de aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.....	114
ANEXO B: Parecer do projeto de mestrado do PPG – Ciências Biológicas: Bioquímica .....	115
ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle .....	117
ANEXO D: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle: responsáveis.....	119
ANEXO E: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo pacientes LLA .....	122
ANEXO F: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo pacientes LLA: responsáveis .....	124

## **PARTE I**



## RESUMO

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna resultante da proliferação clonal de células associadas aos estágios precoces de maturação linfoide. O sistema purinérgico está envolvido na imunomodulação, porém não se sabe se a expressão e função das enzimas purinérgicas estão alteradas na LLA-B. Além disso, parece que os linfócitos regulatórios (Bregs e Tregs) estão envolvidos com a produção de nucleotídeos extracelulares do sistema purinérgico; esses fatores podem ser responsáveis pela criação de microambientes imunossupressores nos pacientes com LLA-B. O objetivo do trabalho foi correlacionar a expressão dos genes purinérgicos com a sobrevida e caracterizar o sistema imune com ênfase no sistema purinérgico em pacientes com LLA-B. Dessa forma, para as análises *in silico*, utilizamos dados transcriptômicos. Pacientes LLA foram separados em: LLA recorrente e LLA não-recorrente; e, após, separados em sangue periférico (SP) ou medula óssea (MO). E para as análises *in vivo*, amostras foram marcadas com CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD45, CD38, CD39 e CD73, sendo as populações celulares analisadas por citometria de fluxo. Observamos que o aumento da expressão do gene CD38 em amostras de MO LLA recorrente/LLA não-recorrente têm impacto negativo na probabilidade de sobrevida global dos pacientes, aumentando o risco de morte. Em amostras de sangue periférico, observamos uma menor quantidade de células CD73+, no grupo LLA, em subpopulações de células T CD4+ e Bregs. Ainda, cada célula T CD8+ expressa mais CD38 em sua membrana celular, ao passo que está menos expressa na membrana das células B e Bregs. Além disso, vimos uma correlação positiva entre CD38 e CD39 na subpopulação de Tregs no grupo LLA, quando avaliada pela frequência. Em amostras de medula óssea, observamos uma maior porcentagem de células CD38+ em subpopulações de células T CD4+ e CD8+, e de células CD39+ na população de Tregs e células CD73+ em subpopulações de células B e Bregs e uma correlação positiva entre CD38 e CD73 na população de células T CD4+ e entre CD38 e CD39 na população de células Bregs no grupo LLA, quando avaliado pelo MFI. No grupo risco padrão (baixo), observamos que cada célula T CD8+ expressa mais CD38 em sua membrana celular no grupo LLA, ao passo que expressa menos nas células B e Bregs. Ainda no grupo risco baixo, as células Treg expressam menos CD39 em sua membrana celular no grupo LLA. No grupo risco alto, há menos células T CD4+CD73+, porém verificamos uma maior expressão de CD73 nas células Bregs, bem como CD39 nas células T CD8+. Ainda, cada célula TCD8+ expressa mais CD38 em sua membrana celular no grupo LLA, e menos na das células B e Bregs. Vimos uma correlação negativa entre CD38 e CD39 na população de Tregs no grupo LLA, quando avaliado pela frequência. CD38 pode estar envolvido no desenvolvimento e progressão da LLA-B. Podemos sugerir que o perfil da frequência de linfócitos pode influenciar o resultado do tratamento em nichos e grupos de risco diferentes, bem como o perfil de expressão e correlação das ectonucleotidases. Faz-se necessário mais pesquisas a respeito das ectonucleotidases, principalmente da CD38, na LLA-B. O entendimento do sistema imune no contexto purinérgico abre perspectivas interessantes como ferramenta para prognóstico e terapia para pacientes com LLA-B.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica aguda, Imunomodulação, Linfócitos regulatórios, Sistema purinérgico, Ectonucleotidases.

## ABSTRACT

Acute Lymphocytic Leukemia (ALL) is a malignant neoplasm resulting from the clonal proliferation of cells associated with the early stages of lymphoid maturation. The purinergic system is involved in immunomodulation, but it is not yet known whether the expression and function of enzymes in the purine pathway are altered in ALL-B. In addition it appears that regulatory lymphocytes (Breg and Treg) are involved in production of extracellular nucleotides in the purinergic system; the factors may be responsible for the creation of immunosuppressive profile in patients with ALL-B. The objective of the work was to correlate the expression of purinergic genes with survival and to characterize the immune system with an emphasis on the purinergic system in patients with ALL-B. Thus, for *in silico* analyses, we use transcriptomic data. ALL patients were separated as following: recurrent ALL and non-recurrent ALL; and, afterwards, separated into peripheral blood (PB) or bone marrow (BM). For *in vivo* analyses, samples were stained with CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD25, CD45, CD38, CD39 and CD73, with cell populations analyzed by flow cytometry. We observed that the increased expression of the CD38 gene in BM recurrent ALL/non-recurrent ALL samples has a negative impact on the patients overall survival probability, increasing the risk of death. In peripheral blood samples, we observed a smaller amount of CD73+ cells, in the ALL group, in subpopulations of CD4+ T cells and Bregs. In addition, each CD8+ T cell expresses more CD38 in its cell membrane, whereas is less expressed in B and Breg cells membrane. In addition, we observed a positive correlation between CD38 and CD39 in the Treg subpopulation in the ALL group, when assessed by frequency. In bone marrow samples, we observed greater frequency of CD38+ cells in subpopulations of CD4+ and CD8+ T cells, and greater frequency of CD39+ cell in the Treg subset as well as greater frequency of CD73+ cells in B and Breg cells. We also observed a positive correlation between CD38 and CD73 in the population of CD4+ T cells and between CD38 and CD39 in the population of Breg cells in the ALL group, when assessed by MFI. In the standard (low) risk group, we observed that each CD8+ cell expresses more CD38 on cells membrane in the ALL group, whereas expresses less in B and Breg cells. Tregs cells express less CD39 on their cell membrane in the ALL group. In the high risk group, there are fewer CD4+ CD73+ T cells, but we found a greater expression of CD73 in Bregs cells, as well as CD39 in CD8+ T cells. In addition, each CD8+ T cell expresses more CD38 on cells membrane in the ALL group, and less in B and Breg cells. We also observed a negative correlation between CD38 and CD39 in the Treg population in the ALL group, when assessed by cells frequency. CD38 may be involved in the development and progression of ALL-B. We can suggest that the lymphocyte frequency profile may influence the outcome of treatment in different niches and risk groups, as well as the expression and correlation profile of ectonucleotidases. More research is needed regarding ectonucleotidases, especially CD38, in ALL-B. Understanding the immune system in the purinergic context opens interesting perspectives as a tool for prognosis and therapy for patients with ALL-B.

Keywords: Acute lymphocytic leukemia, Immunomodulation, Regulatory lymphocytes, Purinergic system, Ectonucleotidases.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADO:Adenosina

ADPR:Adenosina Difosfato Ribose

AMP:Adenosina Monofosfato

APC:*Antigen – Presenting Cell*

ATP:Adenosina Trifosfato

Breg:Linfócitos B Regulatórios

CD39:NTPDase/ENTPD1

CD73:Ecto-5'-nucleotidase

LLA:Leucemia Linfocítica Aguda

LLA-B:Leucemia Linfocítica Aguda do tipo B

LLC:Leucemia Linfoide Crônica

LMA:Leucemia Mielóide Aguda

MFI:*Mean Fluorescence Intensity*

NKT:*Natural Killer T Cells*

OMS:Organização Mundial da Saúde

SNC:Sistema Nervoso Central

TCLE:Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCR:*T Cell Receptor*

Teff:Linfócitos T efetores

Treg:Linfócitos T regulatórios

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemia Linfoide Aguda (LLA)

A Leucemia linfoide (ou linfocítica/linfoblástica) aguda (LLA) é uma doença maligna derivada das células linfoides indiferenciadas (linfoblastos) que estão presentes em grande número na medula óssea, no timo e nos gânglios linfáticos. Nesta doença, há o acúmulo de linfoblastos em diferentes etapas da maturação, pois os mesmo mantêm capacidade de multiplicação, mas não de diferenciação até formas maduras e imunocompetentes (Farias e Castro 2004).

Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos, numa porcentagem de cerca de 70%. Entre adolescentes e adultos jovens, a incidência das leucemias agudas é de 20% (Farias e Castro 2004). A incidência da LLA volta a crescer após os 60 anos de idade (Falcão e Rego 2002).

A etiologia da LLA permanece desconhecida, porém alguns fatores de risco têm sido associados a esta patologia. A radiação ionizante é um dos fatores ambientais relacionados ao elevado número de leucemias em algumas regiões geográficas, principalmente quando a exposição ocorre durante a vida intrauterina ou durante a primeira infância. Os produtos químicos diversos e imunodeficiências também são fatores leucemogênicos (Schumacher et al. 2002). Além dos fatores ambientais, algumas anormalidades cromossômicas congênitas (fatores genéticos) estão associadas a uma maior susceptibilidade à LLA, como Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi e Ataxia-telangiectasia (German 1995). Polimorfismos genéticos também estão envolvidos na susceptibilidade às leucemias (Pui, Robison e Look 2008).

Baseado no curto tempo de latência, na presença de translocações associadas à LLA no sangue de recém-nascidos com leucemia, nos estudos em gêmeos com

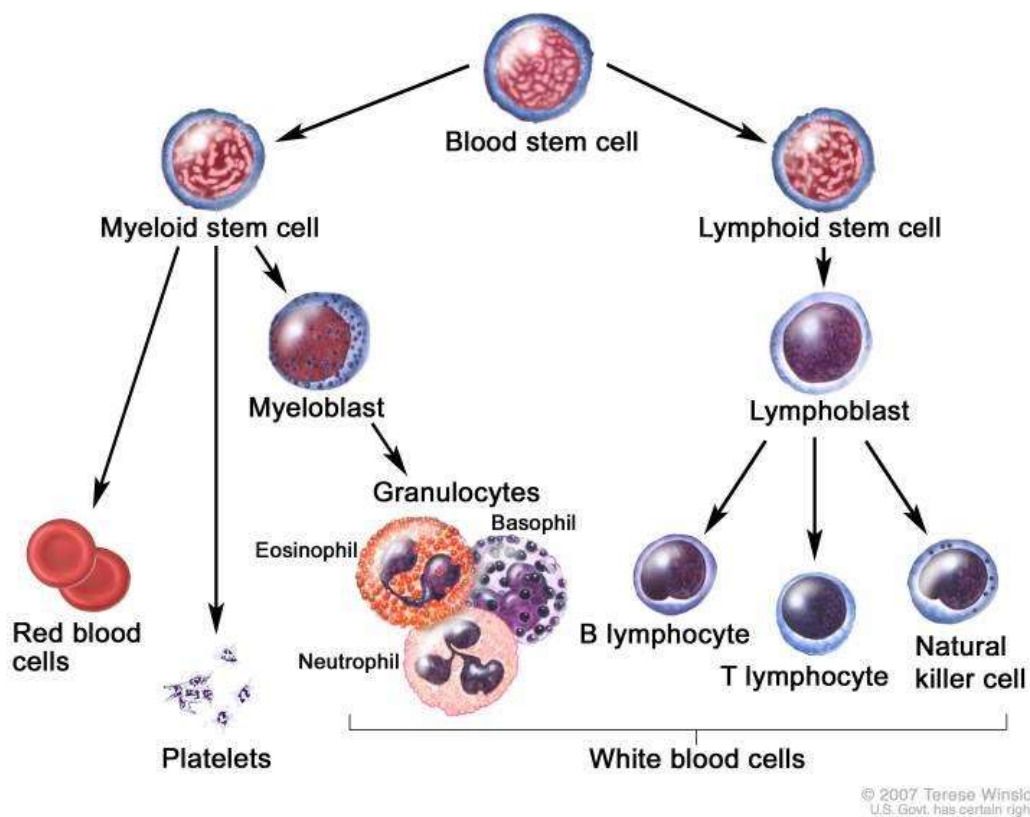
leucemia, foi postulado que o evento inicial na patogênese da LLA ocorreria durante a vida intrauterina (Mori et al. 2002; Ford et al. 1993). Em alguns subtipos de LLA é necessário um novo evento mutagênico para que a doença se desenvolva. Este segundo evento na patogênese da LLA de células precursoras B possivelmente está relacionado a resposta imunológica a um ou vários patógenos (Greaves 2005). Evidências em estudos populacionais demonstram que o influxo de novas pessoas em comunidades isoladas causa um aumento no número de casos de LLA (Silva 2009). De maneira similar, uma resposta imunológica anormal a infecções virais ou bacterianas também seria uma possível causa de LLA (Greaves 2006). Houve o surgimento da hipótese adrenal, que sugere que crianças em países em desenvolvimento estariam sujeitas a infecções de repetição que causariam a liberação de cortisol endógeno em doses equivalentes aquelas utilizadas para tratamento da LLA. Estes picos de cortisol seriam capazes de eliminar o clone leucêmico (Schmiegelow et al. 2008).

Até a década de 70 as leucemias agudas eram divididas em leucemias linfoides, não linfoides e monocíticas. Em 1976, foi lançada a classificação FAB (*French – American – British*) baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e atualizada em 2008, que estratificou as doenças em diferentes categorias e as definiu de acordo com a combinação da morfologia, imunofenotipo, aspectos genético-moleculares e síndromes clínicas (Swerdlow et al. 2008).

Hoje, o diagnóstico e a classificação das leucemias agudas apoiam-se, em grande parte, nos estudos imunofenotípicos por citometria de fluxo. Houve também muitos avanços no campo da biologia molecular, ajudando a compreender melhor a doença e definindo com mais rigor os grupos de risco (Okuda et al. 1995).

A OMS faz a classificação imunológica da LLA de acordo com a expressão de antígenos específicos, podendo, inicialmente, essa leucemia ser classificada em linhagem T ou B, de acordo com as características imunofenóticas dos linfoblastos, com denominação de leucemia linfoblástica/linfoma linfoblástico do tipo T ou B (Junior et al. 1997) (Figura A).

Figura A: Desenvolvimento de células sanguíneas. Diferentes linhagens de células sanguíneas e imunes, incluindo linfócitos T e B, diferenciam-se de uma célula-tronco sanguínea comum. A LLA se origina nos linfoblastos T ou B na medula óssea.



Fonte: PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002.

As leucemias de linhagem B foram divididas de acordo com os estágios de diferenciação normal dos progenitores B na medula óssea, classificando-se em: pró-B, comum, pré-B e B-maduro. As células do tipo pró-B expressam: HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22(c). A LLA do tipo comum (Calla) expressa CD10, CD22(c), CD19 e/ou CD20. A leucemia pré-B expressa cadeia

$\mu$  citoplasmática, em adição a CD19, CD20 e CD10. Por fim, a LLA do tipo B maduro apresenta um fenótipo incomum, caracterizando-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (SmIg). Os blastos apresentam as mesmas características morfológicas e translocações cromossômicas associadas a célula maligna do linfoma de Burkitt (Farias e Castro 2004). Esse tipo de leucemia apresenta prognóstico desfavorável, pois há elevada incidência de envolvimento do sistema nervoso central (SNC), resposta deficiente a terapia e sobrevida abreviada (Santos 2019).

As leucemias de linhagem T dividem-se em três subgrupos, de acordo com os antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal: LLA pré-T, T-intermediário e maduro. Na LLA pré-T, as células expressam CD3 no citoplasma, mas não na superfície celular, expressando caracteristicamente CD7, CD2, CD5 e TdT. No tipo T-intermediário, as células passam a expressar fortemente CD3c, CD2, CD1a e podem co-expressar CD4 e CD8. A LLA do terceiro grupo corresponde aos timócitos medulares, expressando CD2, CD5, CD7, CD3, sendo duplamente positivas para CD4 e CD8 (Junior et al. 1997). O fenótipo T está associado a elevada leucometria por ocasião do diagnóstico, massa mediastínica e envolvimento do SNC (Farias e Castro 2004). Na LLA, grupos de risco são usados para planejar o tratamento dos pacientes, dentre os fatores que afetam o grupo de risco, destaca-se se as células leucêmicas começaram a partir de linfócitos B ou T (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002).

### **1.1.1 Grupos de risco na Leucemia Linfóide Aguda**

Na LLA, grupos de risco são usados para planejar o tratamento. Existem três grupos de risco na infância e eles são descritos como: risco padrão (baixo), que inclui

crianças de 1 a menos de 10 anos que tenham uma contagem de glóbulos brancos menor que 50.000/ $\mu$ L no momento do diagnóstico; alto risco, que inclui crianças de 10 anos ou mais e/ou crianças com contagem de glóbulos brancos de 50.000/ $\mu$ L ou mais no momento do diagnóstico; e risco muito alto, que inclui crianças com menos de 1 ano de idade, crianças com certas alterações nos genes, crianças que respondem lentamente ao tratamento inicial e crianças que apresentam sinais de leucemia após as primeiras 4 semanas de tratamento (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002).

Outros fatores que afetam o grupo de risco incluem: se as células leucêmicas começaram a partir de linfócitos B ou T; se há alterações nos cromossomos ou nos genes dos linfócitos; com que rapidez e quão baixa a contagem de células leucêmicas cai após o tratamento inicial; se as células leucêmicas são encontradas no líquido cefalorraquidiano no momento do diagnóstico. É importante conhecer o grupo de risco para planejar o tratamento, visto que pacientes com LLA de alto risco geralmente recebem mais fármacos anticâncer e/ou doses maiores de fármacos anticâncer do que pacientes com LLA de risco padrão (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002).

Crianças têm 95% de probabilidade de alcançar uma remissão bem-sucedida após 4 semanas de início do tratamento, porém estima-se que 60% dos adultos submetidos a quimioterapia de indução alcancem remissão completa após 4 semanas, e aqueles com mais de 70 anos de idade tem uma taxa de cura de 5% (Hoffbrand, Moss e Pettit 2006). A modulação do sistema imune é um fator que influencia a probabilidade de o paciente alcançar uma remissão bem-sucedida e já foi visto que o sistema purinérgico pode estar envolvido nesse processo (Di Virgilio, Boeynaems e Robson 2009; Sitkovsky e Lukashev 2005; S. Deaglio et al. 2007), porém ainda não se sabe se a expressão e a função das enzimas na via das purinas estão alteradas na LLA-B.



## **1.2 Sistema purinérgico e modulação do sistema imune nas neoplasias hematológicas**

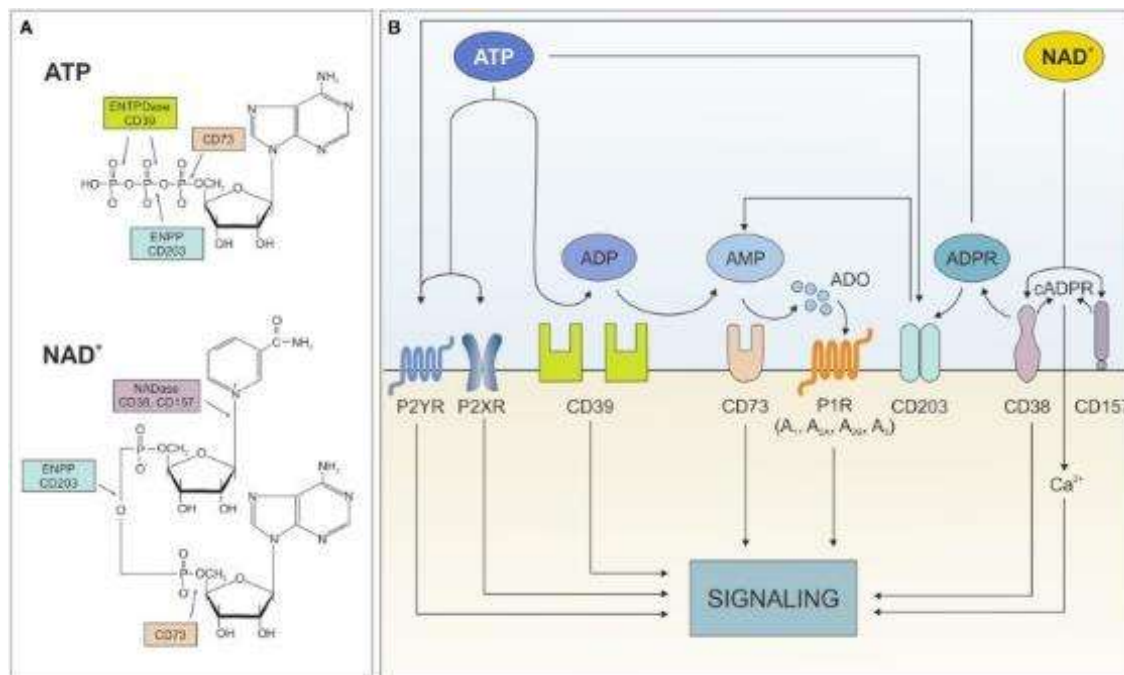
O metabolismo do ATP (adenosina trifosfato) nos seus metabólitos ADP, AMP, adenosina (ADO) e inosina é um processo rigorosamente regulado, devido ao importante papel do eixo ATP/adenosina no metabolismo celular, sinalização e homeostase imune. O AMP é gerado pelo catabolismo de ATP/ADP, que é posteriormente convertido em ADO. Estas reações são catalisadas por ectoenzimas da família das ectonucleotidasas. Em células imunes, a conversão de ATP em AMP é predominantemente catalisada pela CD39 (NTPDase 1), enquanto a CD73 (ecto-5'-nucleotidase) catalisa a conversão de AMP a ADO. Assim, a CD73 e CD39 atuam conjuntamente na conversão de ATP à adenosina (Zimmermann 1996).

A conversão de AMP em ADO no meio extracelular é irreversível, podendo apenas ser fosforilada após o transporte de ADO para o meio intracelular, onde pode ser convertida em AMP pela adenosina quinase. Isso coloca a enzima CD73 em um ponto crucial no controle intra- e extracelular de nucleosídeos e nucleotídeos da adenina (Yegutkin et al. 2002).

Existe ainda, uma via alternativa não canônica de produção de ADO, onde a molécula CD203a/PC-1 converte ADPR (gerado a partir de NAD<sup>+</sup> por CD38) ou ATP em AMP, que é posteriormente metabolizado em ADO pela CD73 (Alberto L. Horenstein et al. 2013). Esse eixo CD38/CD203a/CD73 pode exibir operação bimodal, ou seja, podem funcionar de acordo com seu arranjo espacial como parte de (i) caminhos contínuos (moléculas na mesma célula) ou (ii) caminhos descontínuos (moléculas em células diferentes). O principal participante responsável pela conversão de nucleotídeos extracelular é a CD38, como esperado devido às suas características

topológicas (ou seja, acessibilidade ao NAD<sup>+</sup> exógeno) e função enzimática conhecida como regulador primário dos níveis extracelulares de NAD<sup>+</sup> (Iqbal e Zaidi 2006).

Figura B: Rede das ectonucleotidases. (A) Estrutura do ATP e NAD<sup>+</sup> com indicação dos locais de clivagem pelas diferentes ectonucleotidases. (B) Representação esquemática do destino do ATP e NAD<sup>+</sup> extracelulares operados pelas diferentes ectonucleotidases e as consequências funcionais dos metabólitos gerados.



Fonte: Vaisitti et al. 2019

Nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares, como ATP e ADO, respectivamente, podem participar na criação de condições favoráveis que promovem o crescimento e a sobrevivência tumoral, enquanto suprimem as respostas imunes do hospedeiro (Di Virgilio, Boeynaems e Robson 2009). O ATP extracelular se liga a múltiplos receptores purinérgicos tipo P2 (P2Y e P2X), influenciando o metabolismo celular, migração, proliferação e apoptose (Burnstock e Verkhratsky 2009). A ADO pode ser captada pelas células para reconstituir o pool de nucleotídeos, ou pode provocar potentes respostas imunossupressoras e anti-inflamatórias, mediadas através da interação com uma família de receptores purinérgicos do tipo P1 acoplados a proteína G (A1, A2A, A2B e A3) (Sitkovsky e Lukashev 2005). A produção de ADO é um componente integral da maquinaria supressora de células T regulatórias (Treg) e

B regulatórias (Breg), diminuindo a proliferação de células T efetoras e a secreção de citocinas de resposta T helper 1 (S. Deaglio et al. 2007).

O modelo de ectonucleotidases presente na via não canônica de produção de adenosina é centrado em torno do eixo NAD<sup>+</sup>/ADO, um ponto de verificação que determina se o ambiente extracelular é pró-inflamatório (respostas mediadas por nucleotídeos) ou anti-inflamatório (respostas mediadas por nucleosídeos). Por outro lado, o substrato NAD<sup>+</sup> que desencadeia a via CD38/CD203a/CD73 pode influenciar o sistema imunológico ao mudar a balança de sinais ativadores (mediados por P2) para supressores (mediados por P1) (Horenstein et al. 2013).

Várias linhas de pesquisa sugerem que o microambiente tumoral é marcado pelo aumento do *turnover* de nucleotídeos extracelulares (Pellegatti et al. 2008; Deaglio et al. 2007) e nucleosídeos (Ohta et al. 2006; Ohta et al. 2001), bem como pelo aumento da expressão de ectoenzimas que os metabolizem. CD38 é expresso em várias neoplasias hematológicas, incluindo LLA do tipo B (Keyhani et al. 2000a) e T (Wang et al. 2015), leucemia mielóide aguda (LMA) (Keyhani et al. 2000b) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (Malavasi et al. 2011). Sabe-se que o aumento da expressão de ectoenzimas pode atuar indiretamente na imunomodulação de pacientes com neoplasias (Di Virgilio, Boeynaems e Robson 2009). Estudos demonstram que os linfócitos regulatórios (Bregs e Tregs) estão envolvidos com a produção de nucleotídeos extracelulares do sistema purinérgico (Deaglio et al. 2007; Saze et al. 2013; Figueiró et al. 2016).

### **1.3 Linfócitos B regulatórios (Breg) e T regulatórios (Treg)**

Os linfócitos Treg fazem parte de uma subpopulação de linfócitos CD4 e atuam na supressão das respostas imunológicas. Existem dois tipos de linfócitos Treg, as

células Treg naturais (ou constitutivas) e as células Treg induzíveis (ou adaptativas). Os linfócitos Treg naturais se desenvolvem no timo sob influência indireta de células reticulares epiteliais que liberam a linfopoietina estroma tímica, uma citocina que faz com que células dendríticas nas imediações induzam linfócitos T virgens a expressar as moléculas CD25 e FoxP3, desta forma convertendo células T virgens a linfócitos Treg naturais. Estes linfócitos Treg naturais saem do timo, e quando seus TCR (*T cell receptor*) se ligam a uma APC (célula apresentadora de antígeno) ou a um linfócito T efetor, eles suprimem a resposta imunológica através, principalmente, da secreção de IL-10 e TGF- $\beta$ . Usualmente, os linfócitos Treg naturais realizam suas funções para resolução de uma infecção ou para evitar resposta contra algum elemento próprio do organismo. Os linfócitos Treg induzíveis também são derivados de linfócitos T virgens, mas se originam fora do timo, onde aumentam a expressão dos marcadores CD25 e FoxP3 e secretam citocinas, tais como IL-10 e TGF- $\beta$ , que inibem a formação de linfócitos Th1, conseqüentemente suprimindo a resposta imunológica. É possível que os dois tipos de linfócitos Treg tenham funções sobrepostas e que eles atuem em conjunto para suprimir a resposta autoimune a moléculas do próprio organismo (Gartner 2017).

A ADO é capaz de operar por meio do receptor A2A, desempenhando papéis críticos, não redundantes, autônomos e autóctones na inibição das funções efectoras das células T ativadas (Huang et al. 1997). A modulação da inflamação por mecanismos adenosinérgicos foi rigorosamente testada em modelos de hepatite autoimune e viral dependente de células T (Ohta e Sitkovsky 2001) e na imunidade antitumoral de células T (Ohta et al. 2006). Além disso, a estimulação de respostas mediadas por A2A modula o controle da colite mediada por células T em modelos experimentais de camundongos, suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias de maneira independente de IL-

10 e TGF- $\beta$  (Naganuma et al. 2006). Foi visto que a expressão de CD39/ENTPD1 em conjunto com CD73 distingue células Treg CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> de outras células T. A expressão coordenada de CD39/CD73 nas células Treg e o receptor de adenosina A2A nas células T efetoras ativadas geram *loops* imunossupressores, indicando papéis na função inibitória das células Tregs (Deaglio et al. 2007).

A diferenciação das Bregs parece ser independente do balanço Th1/Th2 (Dalwadi et al. 2003). Alguns autores afirmam que CD40 é essencial para a geração de Bregs (Fillatreau et al. 2002). Entretanto, outros estudos sugerem que a interação de CD40 em células B depende do estágio de maturação e da duração e força dos sinais entre células T e B, os quais ditam a diferenciação de linfócitos B em Bregs, células de memória ou células plasmáticas (Lee et al. 2002). As Bregs suprimem a ativação e diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> e células NKT (*Natural Killer T cells*), primariamente, por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ . São capazes de reduzir a imunidade patogênica das células Th1 promovendo a apoptose destas células e/ou inibindo a apresentação de antígenos pelas células APCs por meio da secreção de TGF- $\beta$  (Tian et al. 2001). Podem também regular negativamente a inflamação, favorecendo a geração de células Treg ou células NKT (Bouaziz, Yanaba e Tedder 2008). Além disso, promovem a remoção de corpos apoptóticos, evitando que estes desencadeiem respostas inflamatórias (Mauri e Ehrenstein 2008).

Os linfócitos Bregs suprimem células imunes. Geralmente, as células B são vistas como promotores de ativação e proliferação de células T. No entanto, estudos recentes identificaram que linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> apresentam ação imunossupressora sobre células imunes efetoras (De Andrés et al. 2014) e linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD38<sup>high</sup> mostraram capacidade supressiva sobre linfócitos T efetores

(Teff) (Blair et al. 2010). Citocinas secretadas por linfócitos Bregs podem modular diferentes células imunes tanto em indivíduos saudáveis como em estados patológicos, embora o entendimento desse processo esteja iniciando em comparação, por exemplo, a compreensão sobre linfócitos Tregs (Stanic et al. 2015). Células Bregs suprimem diretamente a proliferação de células TCD4<sup>+</sup> produzindo IL-10 ou TGF- $\beta$  ou agindo indiretamente, promovendo expansão e funções de Tregs (Kessel et al. 2012).

Em humanos, linfócitos B ativados são capazes de produzir AMP e consequentemente ADO, pela presença de CD39 e CD73 na membrana plasmática, que por sua vez é capaz de inibir a proliferação de Teff e a produção de citocinas por um mecanismo presumivelmente acionado pela sinalização de 5'-AMP (Saze et al. 2013). Recentemente, mostramos que linfócitos Bregs, que superexpressam a enzima CD39, são capazes de suprimir o crescimento e ativação de linfócitos T (Figueiró et al. 2016).

Os linfócitos regulatórios suprimem respostas imunológicas através da secreção de citocinas e expressão de marcadores celulares específicos, como as ectonucleotidases. Linfócitos Treg suprimem linfócitos Th1 e linfócitos Breg suprimem a ativação e diferenciação de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células NKT, entre outros tipos celulares. Os linfócitos regulatórios também são capazes de modular as respostas inflamatórias.

No que diz respeito à LLA, os linfócitos Tregs são mais bem estudados que os Bregs. O mecanismo pelos quais os linfócitos B são capazes de modular o sistema imune parece estar envolvido com a produção de nucleotídeos extracelulares do sistema purinérgico, possivelmente responsáveis pela criação de microambientes imunossupressores nos pacientes com LLA, sendo favoráveis para o crescimento e sobrevivência das células neoplásicas (Saze et al. 2013), porém esse mecanismo ainda

carece de estudos. Ainda faz-se necessário desvendar o papel da ADO na supressão direta, além do seu papel via linfócitos regulatórios nessa patologia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Caracterizar o sistema imunológico com ênfase na expressão das ectonucleotidases (CD38, CD39 e CD73) em amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA do tipo B.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a frequência dos linfócitos totais e suas subpopulações em amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA-B.
- Analisar a frequência dos linfócitos CD38+, CD39+ e CD73+ totais e suas subpopulações em amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA-B.
- Analisar o nível de expressão de CD38, CD39 e CD73 nos linfócitos totais e suas subpopulações em amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA-B.
- Realizar correlações entre a expressão de CD38, CD39 e CD73 nos linfócitos totais e suas subpopulações em amostras de medula óssea e de sangue periférico de pacientes com LLA-B.
- Estratificar a coorte de pacientes que apresentavam amostras de sangue periférico em duas categorias: risco padrão (baixo) e risco alto, analisando as mesmas variáveis descritas acima.



## **PARTE II**

### **Capítulo I: Manuscrito a ser submetido para publicação**

## **Capítulo II: Resultados *in vivo***

## **1.METODOLOGIA**

### **1.1 Amostras**

Todos os experimentos seguiram as recomendações da declaração de Helsinque, conjunto de princípios éticos que regem a pesquisa com seres humanos, sendo previamente aprovados pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo B); submetido ao sistema CEP-CONEP por meio da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registro das pesquisas envolvendo seres humanos, sendo aprovado dia 18 de outubro de 2018 (Número do parecer: 2.968.192 e CAAE: 93973218.1.1001.5327) e tendo uma emenda aprovada dia 20 de agosto de 2019 (Número do parecer: 3.553.413); e submetido aos Comitês de Ética, Grupo de Pesquisa e Pós Graduação e ao Serviço de Gestão em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sendo aprovado em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros (Número do Projeto: 2018/0401) (Anexo A).

Foram analisadas amostras de sangue periférico e de medula óssea de pacientes com LLA-B atendidos pela Unidade de Diagnóstico Especializado – Serviço de Diagnóstico Laboratorial do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que foram encaminhadas a unidade para realização do diagnóstico de LLA-B pela técnica de imunofenotipagem (método: citometria de fluxo). Foi feita comparação direta do grupo LLA com amostras de sujeitos saudáveis.

A amostra foi não probabilística voluntária, sendo composta por pacientes do sexo masculino e feminino diagnosticados com LLA-B, sem idade mínima estabelecida. Os pacientes diagnosticados com LLA foram convidados a participar do estudo; caso fossem menores de idade, entrávamos em contato com seus responsáveis

legais. Os voluntários que aceitaram participar do estudo, ou representando/responsável legal, assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos C, D, E e F) em duas vias, sendo uma para o participante/responsável e outra para os pesquisadores.

As amostras foram provenientes do material biológico descartado pela Unidade, portanto, a obtenção destes materiais não ocasionou alterações na rotina de exames ou procedimentos envolvidos e foi utilizado exclusivamente para a finalidade prevista no projeto. A utilização das amostras seguiu a Resolução Normativa do GPPG sobre utilização de material biológico descartado. Além disso, foram acessados os prontuários para coleta de outros dados, sendo garantida a privacidade dos dados coletados.

### **1.1.1 Critérios de Inclusão**

- 1) Homens ou mulheres, sem idade mínima estabelecida;
- 2) Diagnóstico de LLA-B pela Unidade de Diagnóstico Especializado do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### **1.1.2 Critérios de Exclusão**

- 1) Presença de déficit cognitivo que incapacite a compreensão do TCLE nos voluntários maiores de idade ou, quando os pacientes forem menores de idade, nos seus responsáveis legais.

## **1.2 Pacientes**

Entre novembro de 2018 e dezembro de 2019, 19 pacientes com LLA-B foram incluídos no estudo, sendo 6 pacientes com amostras de medula óssea e 13 com amostras de sangue periférico e analisados quanto as características clínicas e biológicas: idade ao diagnóstico, sexo e descrição da população celular normal (para as

amostras de medula óssea). Para cada paciente, o diagnóstico morfológico de LLA do tipo B foi confirmado por citometria de fluxo, sendo os marcadores CD19, CD20, CD22, CD24 e CD79a os mais importantes para essa classificação.

### 1.3 Imunofenotipagem

As amostras de sangue periférico e medula óssea foram marcadas com anticorpos monoclonais, todos antígenos de superfície ligados à membrana, marcados com fluorocromos. As características dos marcadores de superfície estão sumarizadas na Tabela 1.

*Tabela 1. Painel de anticorpos monoclonais de marcação de superfície.*

<b>Anticorpo (Clone)</b>	<b>Fluorescência</b>	<b>Marca</b>	<b>Quantidade</b>
CD8 (RPA-T8)	PE-Cy <sup>TM</sup> 7	BD	1 µL
CD19 (SJ25C1)	PE-Cy <sup>TM</sup> 7	BD	1 µL
CD20 (L27)	V450	BD	1 µL
CD25 (M-A251)	PerCP-Cy <sup>TM</sup> 5.5	BD	2,5 µL
CD38 (HIT2)	FITC	BD	5 µL
CD39 (TU66)	APC	BD	5 µL
CD45 (HI30)	V500	BD	2,5 µL
CD4 (RPA-T4)	PB <sup>TM</sup>	BD	0,5 µL
CD3 (SK7)	APC-H7	BD	3 µL
CD73 (AD2)	PE	BD	6 µL

Foram adicionados os anticorpos, nos volumes validados, em um tubo. Posteriormente foram colocados 100µL de amostra, procedendo à homogeneização com auxílio do vórtex. Incubamos o tubo por 30 minutos a temperatura ambiente e com proteção a luz. Após, foram adicionados 2mL de solução de lise (FACSLYSE), procedendo a homogeneização com auxílio do vórtex. Incubamos o tubo por mais 10 minutos a temperatura ambiente e com proteção a luz. Para finalizar, foram realizadas

duas etapas de lavagem com adição de 2mL de PBS entre elas e centrifugação por 5 minutos a 540g. Por fim, o sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuspendido com 250µL de PBS e homogeneizado com auxílio do vórtex. A aquisição das amostras foi realizada por um citometro de fluxo – FACSCanto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), utilizando o software CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e a análise dos dados com o programa Infinicyt™.

### 1.3.1 Análise das populações celulares por citometria de fluxo

Primeiramente, o gráfico FSC/SSC foi usado para eliminar detritos e células mortas. As células foram selecionadas por tamanho e complexidade celular dentro da população de linfócitos. Em seguida, todas as populações celulares foram selecionadas por sua expressão de CD45, marcador pan leucocitário (*gate* de células CD45+). A porcentagem de linfócitos T CD4+ ou CD8+ foi observada dentro do *gate* de células CD3+. A expressão por porcentagem e a intensidade média de fluorescência (do inglês MFI) de CD38, CD39 e CD73 foi avaliada dentro dessas subpopulações de células T (CD4+ e CD8+). As células T reguladoras (Tregs) foram selecionadas a partir do *gate* de CD4+. Dentro dessa população celular foram selecionadas as células que expressam CD25, dessa forma essas células são CD4+CD25<sup>high</sup>. A expressão de CD38, CD39 e CD73 foi avaliada dentro da população de células Tregs.

Os linfócitos B foram definidos como a população CD19+CD20+, e desta população avaliamos também a expressão de CD38, CD39 e CD73. As células B regulatórias (Bregs) foram selecionadas a partir do *gate* CD19+. Dentro dessa população celular foram selecionadas as células que expressam CD38, dessa forma essas células são CD19+CD38+. A expressão de CD39 e CD73 foi avaliada dentro da população de células Bregs.

#### **1.4 Análise estatística dos resultados**

Os resultados em porcentagem e MFI obtidos para cada população de células, foram comparados a proporção total de linfócitos do sangue periférico/medula óssea de cada indivíduo participante do estudo. Foi avaliada a distribuição de todas as variáveis para a verificação do pressuposto de normalidade, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Devido a distribuição da maior parte das variáveis não corresponder ao padrão de normalidade, foram utilizados métodos não paramétricos de análise. Para cada subpopulação de células, bem como para a quantificação de CD38, CD39 e CD73 foram utilizados valores de média, desvio padrão, mediana, intervalo de confiança (95%) e mínimo/máximo. As análises estatísticas entre os dois grupos analisados (Controle e LLA) foram realizados através do programa SPSS® software para Windows, versão 17.0.0. (SPSS Inc, EUA) utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os gráficos de citometria de fluxo foram feitos no Software GraphPad Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, EUA).

A correlação entre a expressão de CD38, CD39 e CD73 nas células não leucêmicas foi realizada pelo teste de correlação de Spearman com nível de significância de 5%.

## **2. RESULTADOS**

O presente estudo analisou uma população de 6 pacientes com LLA que apresentavam amostras de medula óssea. No momento do diagnóstico, estes pacientes apresentavam uma média de idade de 33,5 anos. Dos 6 pacientes estudados, 4 eram do sexo feminino (66,7%) e 2 do sexo masculino (33,3%) (Tabela 2).

### 3. DISCUSSÃO

A malignidade não é meramente um acúmulo de células neoplásicas, mas constitui um microambiente que contém células endoteliais, fibroblastos, componentes estruturais e infiltrado de células imunes que afetam o desenvolvimento do câncer, invasão e metástase (Bremnes et al. 2016). Muitos estudos recentes lançaram nova luz sobre essa complexa interação entre células imunes proveniente do tumor, moduladas para não atacar as células neoplásicas, e não provenientes do tumor, responsável pelo ataque as células neoplásicas, e a resposta imune em tumores sólidos (X. Yu et al. 2016; Bieńkowski e Preusser 2015). Esses estudos afirmaram que altos valores de linfócitos infiltrantes no microambiente tumoral podem prever o resultado do tratamento e podem ser um potencial indicador prognóstico, mesmo que não esteja correlacionado com características clínico-patológicas dos pacientes (Santoiemma e Powell 2015; Geiger e Rubnitz 2015). A partir disso, acreditamos que altos valores de linfócitos infiltrantes no microambiente da LLA possa ser, assim como em tumores sólidos, um potencial indicador prognóstico, podendo a manipulação do sistema imunológico vir a ser uma terapia interessante e promissora para pacientes com LLA-B. Um dos objetivos do presente estudo foi caracterizar o sistema imunológico de pacientes com LLA-B, destacando a relevância clínica dos linfócitos totais e subpopulações na medula óssea e no sangue periférico, visto que pouco se sabe sobre essa complexa interação entre células imunes do câncer e do hospedeiro e a resposta imune em cânceres hematológicos, como a LLA-B.

Apesar de ser uma forma fisiológica de prevenir inflamação excessiva e dano tecidual, na biologia tumoral as ectonucleotidases podem contribuir para gerar condições imunossupressoras através da produção de ADO (Antonioli et al. 2013). Semelhante a outros mecanismos que são sequestrados para servir a propósitos pró-



tumorais, as células tumorais podem se beneficiar da expressão das ectonucleotidases, principalmente CD38, CD39 e CD73. Os níveis de nucleotídeos extracelulares aumentam em respostas à hipóxia e isquemia, duas características marcantes do ambiente tumoral (Kumar 2013). No câncer, incluindo neoplasias hematológicas como a LLA-B, a superexpressão de ectonucleotidases tem sido associada ao aumento da sobrevivência e proliferação, bem como modulação das respostas imunes à tolerância (Vaisitti et al. 2019). Portanto, um dos objetivos deste trabalho foi avaliar a expressão das ectonucleotidases (CD38, CD39 e CD73) em linfócitos totais e suas subpopulações na medula óssea e no sangue periférico de pacientes com LLA-B, a fim de ampliar os conhecimentos sobre marcadores para monitorar a doença e estratificar subconjuntos de pacientes, ou ainda, descobrir alvos moleculares para novas estratégias de tratamento.

Wu e colaboradores exploraram o fenótipo, a porcentagem de Tregs e a expressão de citocinas em pacientes adultos com LLA-B. Eles observaram que o percentual de Tregs foi elevado em amostras de sangue periférico de pacientes com LLA e que o número elevado de Tregs se correlaciona com níveis alterados das citocinas IL-2, IL-10 e TGF- $\beta$ , sendo indicativo de um mecanismo supressor na patogênese da LLA (Wu et al. 2012). Bhattacharya e colaboradores, observaram ainda que a capacidade supressora do número elevado de células regulatórias na LLA aumenta com a gravidade da doença (Bhattacharya, Chandra e Mandal 2014). Em contraste aos estudos prévios, nós observamos um aumento não significativo nas células Tregs no grupo LLA se comparado com o grupo controle nas amostras de sangue periférico.

Além disso, nós observamos uma menor quantidade de células CD73<sup>+</sup> no grupo LLA se comparado com o grupo controle em subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e Bregs,

em amostras de sangue periférico. Ainda, cada célula T CD8<sup>+</sup> expressa mais CD38 em sua membrana celular no grupo LLA, ao passo que expressa menos CD38 na membrana celular das células B e Bregs, se comparado com o grupo controle. Já foi visto que a CD73 é regulada nos precursores de células B de pacientes com LLA, porém em amostras de medula óssea(W. Wang et al. 2016). Tinhofer e colaboradores observaram uma maior expressão de CD38 em células T CD8<sup>+</sup> de pacientes com LLC-B. Células T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> aumentam a produção de citocinas que podem contribuir para a progressão da LLC-B(R. W. Huang, Tsuda e Takatsuki 1993). Zupo e colaboradores estudaram a expressão de CD38 nas células B do sangue periférico de pacientes com LLC-B. Algumas células expressaram CD38 em abundância, enquanto que a expressão foi baixa a ausente em outro grupo de pacientes, tendo estas células propriedades funcionais distintas, principalmente no que se refere a propensão a sofrer apoptose(Zupo et al. 1996). Os resultados de Tinhofer e Zupo e seus colaboradores estão corroborando com os nossos resultados. Além disso, vimos uma correlação positiva entre as ectonucleotidases CD38 e CD39 na subpopulação de Tregs no grupo LLA, quando avaliado pela frequência (%). Foi visto que células Tregs CD39<sup>+</sup> circulantes exibem alta expressão de CD38 e PD-1 em pacientes com sepse(H. Huang et al. 2015). Podemos inferir que na LLA-B essa correlação pode existir para promover uma alta produção de adenosina, o que pode tornar as células Treg mais ativas e as células T efetoras menos ativas, favorecendo a progressão das células neoplásicas em LLA-B.

A coleta de biopsia de medula óssea é um procedimento altamente invasivo, portanto, não obtivemos grupo controle para comparar com o grupo medula óssea, obtendo a frequência das subpopulações de linfócitos apenas para o grupo LLA-B. Clark e colaboradores avaliaram a porcentagem total de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e

B em amostras de medula óssea de sujeitos saudáveis, encontrando aproximadamente 46% de células T totais, sendo 24% CD4+ e 24% CD8+ e 12% de células B totais. Em comparação com o estudo de Clark e colaboradores (Clark, Phillips e Miller 1976), encontramos frequências maiores em todas as subpopulações. Semelhante aos nossos achados, Le Jeune e Bar e colaboradores demonstraram associação entre alta contagem absoluta de linfócitos no momento do diagnóstico e piores resultados na LMA (Bar et al. 2015; Jeune et al. 2014). Ismail e colaboradores avaliaram a porcentagem total de linfócitos e subpopulações em amostras de medula óssea em pacientes com LMA. Eles viram  $37,9 \pm 13,1$  de células T helper e  $37,2 \pm 12,0$  de células T citotóxicas. Observamos em nossa coorte 29,95% células T CD4+ (T helper) e 38,94% células T CD8+ (T citotóxicas). Mesmo que a LLA e a LMA, leucemia linfocítica e mieloblástica, respectivamente, sejam diferentes quando a célula de origem, ambas são agudas, o que significa que compartilham algumas características, como surgimento de sintomas e progressão rápida e presença de leucócitos imaturos. Comparando a porcentagem de linfócitos e subpopulações em ambas as patologias, observamos frequências muito semelhantes para as populações de células T e B, porém na LMA há mais células T helper que células T citotóxicas, o contrário visto para a LLA. Na LLA, encontramos uma porcentagem maior de células T CD8+. Foi observado uma frequência significativamente aumentada de células T CD8+ que expressam PD-1 na medula óssea em comparação com amostras de sangue periférico. PD-1 pode estar, então, mediando a exaustão das células T na LLA-B, gerando um ambiente supressor na medula óssea desses pacientes (Jia et al. 2018).

Nossos dados apontam uma maior quantidade de células CD38+ em subpopulações de células T CD4+ e CD8+, em amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B. Ainda, uma maior quantidade de células CD39+ na população de Tregs e

células CD73<sup>+</sup> em subpopulações de células B e Bregs foram observadas. Cabe destacar, que até o momento não foi visto na literatura a expressão de CD38 em células T CD4<sup>+</sup>, porém células T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> são capazes de suprimir a proliferação de células T efectoras CD4<sup>+</sup> de maneira não específica ao antígeno via IFN- $\gamma$ . A IL-15 potencializa a atividade supressora das células T CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> e controla sua sobrevivência e expansão (Bahri et al. 2012). Nesse contexto, a ectonucleotidase CD38 pode estar se correlacionando positivamente com as funções supressoras e identificando essas células como inibidores potenciais de respostas imunes excessivas ou ainda, inibindo as células que combateriam as células neoplásicas favorecendo a progressão da LLA-B. Nesse sentido, vimos uma correlação positiva entre a densidade de expressão de CD38 e CD73 na população de células T CD4<sup>+</sup>, bem como correlação positiva entre CD38 e CD39 na população de células Bregs, quando avaliado pela MFI. O eixo CD38/CD39/CD73 produz adenosina pela via canônica e não canônica, sendo a ADO imunossupressora, podendo esta levar a progressão da LLA-B.

Comparando as coortes que apresentaram amostras de medula óssea e amostras de sangue periférico, observamos que a frequência de células T totais diminui nas amostras de sangue se comparado com as amostras de medula óssea, alterando a proporção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> entre os grupos. Na coorte de amostras de medula óssea há mais células T CD8<sup>+</sup>, ao contrário da coorte de amostras de sangue periférico que apresenta mais células T CD4<sup>+</sup>. A coorte de amostras de sangue periférico apresenta mais células B, incluindo Bregs, se comparado a coorte de amostras de medula óssea.

Decidimos estratificar a coorte de pacientes que apresentavam amostras de sangue periférico em duas categorias: risco padrão (baixo) e risco alto. Dependendo do grupo na qual o paciente se encontra, o prognóstico torna-se diferente, sendo mais

favorável aos pacientes que se encontram no grupo risco padrão (baixo). A partir disso, caracterizamos o sistema imunológico de pacientes com LLA-B em categorias de risco diferentes, a fim de verificar se essa complexa interação entre células imunes do câncer e do hospedeiro e a resposta imune são diferentes para os grupos, novamente destacando a relevância clínica dos linfócitos totais e subpopulações.

No grupo risco padrão (baixo), observamos uma maior frequência, embora não significativa, de células de linhagem T (linfócitos T, células T CD4+, células T CD8+ e células Treg) no grupo LLA se comparado com o grupo controle. Igualmente não significativa, observamos uma maior frequência de linfócitos T totais, Treg e B no grupo LLA se comparado com o grupo controle. Esses valores demonstram a heterogeneidade dos diferentes grupos de pacientes que pode representar o escape à resposta imune do hospedeiro e as diferentes respostas dos pacientes quando utilizados protocolos padrões de tratamentos quimioterápicos e/ou imunoterápicos. A presença de células T CD4+ e CD8+ pode estar sendo benéfica para o grupo risco padrão (baixo), se comparado com o grupo risco alto. Já foi visto que a expansão de células T CD8+ dentro de tumores pode ser uma maneira de criar um ambiente pró-inflamatório dominante, levando a rejeição do tumor em sítios locais e distais (P. Yu et al. 2004), já as células T CD4+ estão envolvidas na ativação de células T CD8+ para combater o câncer. Temos que ter cuidado para avaliar os resultados obtidos para os grupos risco padrão (baixo) e alto, visto que apresentam tamanho amostral diferentes; o grupo risco alto apresenta um tamanho amostral maior, dando maior poder estatístico para as análises nesse grupo. Gostaríamos de ressaltar que a única população de linfócitos que difere quanto à frequência, quando comparamos a coorte completa de amostras de sangue periférico com o grupo risco alto, é que o grupo risco alto apresenta uma maior frequência de células T totais no grupo LLA se comparado com o grupo controle.

No grupo risco padrão (baixo), observamos que cada célula T CD8<sup>+</sup> expressa mais CD38 em sua membrana celular no grupo LLA, ao passo que expressa menos CD38 na membrana celular das células B e Bregs se comparado com o grupo controle, resultado semelhante encontrado na coorte completa de amostras de sangue periférico. Ainda, vimos que nesse grupo as células Treg expressam menos CD39 na superfície celular no grupo LLA se comparado com o grupo controle. Menos CD39 significa menos ADO, os linfócitos Treg ficam menos ativos, visto que ADO estimula os linfócitos Treg via receptores A2A, ao passo que as células efetoras ficam mais ativas, visto que ADO inibe as células efetoras via receptores A2A. Não foi vista nenhuma correlação significativa entre a expressão das ectonucleotidases para esse grupo.

No grupo risco alto, assim como na coorte de amostras de sangue periférico, há menos células T CD4<sup>+</sup>CD73<sup>+</sup> no grupo LLA se comparado com o grupo controle, porém também verificamos uma maior expressão de CD73 na população de células Breg no grupo LLA, bem como de CD39 na população de células T CD8<sup>+</sup>, se comparado com o grupo controle. Foi visto que linfócitos B1 que superexpressam CD73 geram mais ADO e inibem a colite experimental, representando um novo mecanismo de Breg para o efeito anti-inflamatório mediado pelas células B (Kaku et al. 2014). Estudos recentes destacaram a expressão de CD39 em células T CD8<sup>+</sup> infiltradas em tumores como marcador de exaustão e reatividade de antígeno tumoral (Y. Lee et al. 2019), ademais isso poderia ser um indicativo de que células Treg CD8<sup>+</sup> são CD8<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3 e podem, ainda, ser CD39<sup>+</sup> (Parodi et al. 2013).

Ainda no grupo risco alto, cada célula T CD8<sup>+</sup> expressa mais CD38 em sua membrana celular no grupo LLA, ao passo que expressa menos CD38 na membrana celular das células B e Bregs se comparado com o grupo controle, assim como visto para a coorte completa de amostras de sangue periférico e no grupo risco padrão

(baixo). Ainda, vimos uma correlação negativa entre as ectonucleotidasas CD38 e CD39 na subpopulação de Tregs no grupo LLA, quando avaliado pela frequência, ou seja, as duas variáveis movem-se em direções opostas, portanto quanto mais CD38 na subpopulação de Tregs, menos CD39 será encontrada.

A única diferença encontrada quanto ao nível de expressão das ectonucleotidasas entre os grupos risco padrão (baixo) e risco alto, é que no grupo LLA com risco padrão baixo as células Tregs apresentam uma menor expressão de CD39 em sua membrana se comparado ao grupo controle. No grupo risco padrão (baixo) pode estar sendo produzido menos ADO pela via canônica, visto que há menos CD39 para converter ATP em AMP, substrato da enzima CD73 para a produção de ADO. Menor produção de ADO leva a menor imunossupressão no microambiente neoplásico, favorecendo o prognóstico desse grupo de pacientes.

Caracterizamos o sistema imunológico de pacientes com LLA-B quanto a frequência de linfócitos totais e subpopulações e a expressão das ectonucleotidasas em coortes de amostras de medula óssea e de sangue periférico, além de correlacionar a expressão dessas ectonucleotidasas. Concluímos que o perfil de expressão, frequência e correlação de ambas as coortes pode estar favorecendo a progressão das células neoplásicas na LLA-B, porém o perfil da frequência de linfócitos em ambas as coortes parece ser diferente, sugerindo que os grupos têm características definidas que os diferenciam, com interações complexas entre células imunes e suas respostas na LLA-B. Ainda, estratificamos a coorte de amostras de sangue periférico em risco padrão (baixo) e risco alto e também observamos que a interação entre células imunes e a resposta imune são diferentes, principalmente quanto a presença de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no grupo risco padrão (baixo), sendo responsáveis por criar um ambiente pró-inflamatório e ativar células imunocompetentes. Além disso, sugerimos que a produção

de ADO pode ser menor no grupo risco padrão (baixo) do que no grupo risco alto, levando a uma menor imunossupressão no microambiente neoplásico desses pacientes, favorecendo seu prognóstico. Portanto o perfil de frequência de linfócitos pode prever o resultado do tratamento em nichos e grupos de risco diferentes, tornando-se futuramente um potencial indicador prognóstico, bem como o perfil de expressão e correlação das ectonucleotidases podem se tornar marcadores para monitorar a doença e estratificar subconjuntos de pacientes, ou ainda, tornar-se alvos moleculares para novas estratégias de tratamento. Futuramente, a manipulação do sistema purinérgico pode ser uma interessante e promissora imunoterapia para pacientes com LLA-B.



**PARTE III**  
**Discussão Geral**

## DISCUSSÃO

Cronologicamente, começamos o projeto de pesquisa realizando a análise de enriquecimento de anotação de genes, usando ferramentas de bioinformática (Parte II da dissertação). As análises *in silico*, experimentação baseada em simulação computacional, aumenta a probabilidade de identificarmos processos biológicos mais pertinentes ao estudo, poupando tempo e dinheiro. Portanto, o objetivo dessa etapa foi analisar se a expressão de genes relacionados ao sistema purinérgico (ENTPD1, CD38, NT5E e DPP4) pode ter valor prognóstico para os pacientes com LLA-B, em uma coorte infantil.

De acordo com a análise de Kaplan-Meier e a análise multivariada de Cox, observamos que o aumento da expressão do gene CD38, que codifica a glicoproteína de superfície do tipo II (CD38), nas amostras de medula óssea não recorrente e medula óssea recorrente aumenta o risco de morte dos pacientes com LLA-B, portanto, a alta expressão do gene pode caracterizar subgrupos da doença com comportamento mais agressivo. É importante ressaltar que encontramos diferença significativa na expressão de outros genes purinérgicos, porém em apenas uma das análises estatísticas usadas (Kaplan-Meier ou Cox). Consideramos confiantes os resultados significativos encontrados em ambos os testes aplicados, visto que são complementares. O único resultado significativo na análise de Cox e Kaplan-Meier, portanto, inclui a expressão do gene CD38 nas análises de sobrevida global. Outros estudos também observaram que a expressão de CD38 pode prever um pior desfecho clínico, porém em outros tipos de leucemias e/ou em coortes adultas (D'Arena et al. 2001; Chang, Liu e Cleveland 2003; Eveillard et al. 2016).

Visto que as análises *in silico* utilizam dados transcriptômicos, ou seja, sequenciamento de mRNA, precisamos cautela para transpor a discussão em termos de análise de proteínas, pois entre o mRNA e a codificação de proteínas pode haver controle da expressão gênica a nível pós-transcricional. Na parte II da dissertação, mesmo trabalhando com transcriptoma, fizemos uma discussão especulativa a nível de proteína. Sugerimos que uma alta expressão do gene CD38, que influencia negativamente a sobrevida de pacientes com LLA-B, possa estar codificando uma maior quantidade da ectoenzima CD38 no microambiente neoplásico desses pacientes. CD38 pode estar alterando a homeostase de NAD<sup>+</sup> (hidrolisado por CD38 na via não canônica de produção de adenosina) no microambiente neoplásico e aumentando a sobrevivência das células leucêmicas através de modulação na resposta antitumoral. Outra hipótese é que a ADO estaria promovendo o crescimento e a sobrevivência das células leucêmicas. O NAD<sup>+</sup> seguiria a via não canônica de produção de ADO, resultando em imunossupressão.

Afim de transpor essa discussão especulativa, caracterizando a investigação como teórica, propomos realizar uma investigação prática com experimentos *in vivo* (Parte I da dissertação). Afim de analisar se amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LLA-B apresentavam uma maior expressão de ectonucleotidases, corroborando ou não com os achados encontrados no artigo de bioinformática, decidimos analisar esses marcadores nas células imunes dos pacientes. Sabe-se que o microambiente neoplásico é composto por um acúmulo de células neoplásicas, mas também contém células endoteliais, fibroblastos, componentes estruturais e infiltrado de células imunes, que afetam o desenvolvimento do câncer, invasão e metástase (Bremnes et al. 2016). Nesse contexto acontece complexas interações entre células imunes provenientes do microambiente neoplásico, ou seja,

moduladas para não atacar as células cancerígenas, e não provenientes do câncer, responsáveis pelo ataque as células neoplásicas. A composição do microambiente imune difere entre os pacientes e nos cânceres, já foi visto que o tipo, densidade, localização e organização das células imunes dentro de tumores sólidos definem o contexto imune, provando ser um determinante importante das características do tumor e dos resultados dos pacientes (Bremnes et al. 2016). Nesse sentido, decidimos analisar a presença dos marcadores purinérgicos nos linfócitos de pacientes com LLA-B em dois tipos de microambientes: medula óssea e sangue periférico. Além de analisar a presença dos marcadores purinérgicos, caracterizamos o sistema imunológico dos pacientes do estudo, analisando os valores de linfócitos e suas subpopulações. Já foi visto que valores de linfócitos podem prever o resultado do tratamento, podendo ser um potencial indicador prognóstico para os pacientes (Santoiemma e Powell 2015; Geiger e Rubnitz 2015).

No manuscrito *in silico* utilizamos uma coorte grande de pacientes, dados obtidos de um banco de dados de livre acesso, dando grande poder estatístico as nossas análises. Porém, destacamos que dos 298 pacientes com LLA, 83% apresentavam amostras de medula óssea. Talvez por esse motivo não visualizamos diferença significativa na expressão dos genes purinérgicos em amostras de sangue periférico nessa coorte. Já nos experimentos *in vivo*, devido ao pouco tempo disponível para coleta das amostras, analisamos uma população de 6 pacientes com LLA que apresentavam amostras de medula óssea e uma população de 13 pacientes com LLA que apresentavam amostras de sangue periférico; sendo, ainda, essa população de 13 pacientes estratificada ou não em dois grupos: risco padrão (baixo – n=4) e risco alto (n=9). Na elaboração do projeto de pesquisa, realizamos o cálculo do tamanho amostral necessário, que foi baseado na variação significativa dos valores experimentais em

análises semelhantes publicadas. O tamanho amostral foi calculado através do programa Minitab® com “n” de 17 indivíduos por grupo. Como visto, não conseguimos obter todas as amostras necessárias para aumentar a relevância estatística do estudo, portanto, faz-se necessário aumentar o tamanho amostral para minimizar possíveis resultados falso negativos ou falso positivos.

Nos experimentos *in vivo*, em amostras de sangue periférico (n=13), observamos uma menor quantidade de CD73, no grupo LLA se comparado ao grupo controle, em subpopulações de células T CD4+ e Bregs. Ainda, cada célula T CD8+ expressa mais CD38 em sua membrana celular, ao passo que expressa menos CD38 na membrana celular das células B e Bregs. Ainda, observamos uma correlação positiva entre as ectonucleotidases CD38 e CD39 na subpopulação de Tregs, quando avaliado pela frequência. Uma maior expressão de CD38 nas células T CD8+ pode estar aumentando a produção de citocinas que podem contribuir para a progressão da LLA-B, como visto para a LLC-B por Tinhofer e colaboradores (Huang, Tsuda e Takatsuki 1993). Já foi visto que a expressão de CD38 nas células B pode influenciar na propensão das células sofrerem apoptose (Zupo et al. 1996), portanto, uma menor expressão de CD38 na membrana celular das células B totais e Bregs pode estar aumentando a propensão dessas células sofrerem apoptose. Em pacientes com mieloma múltiplo refratário, o tratamento com daratumumab (anticorpo monoclonal que se liga a CD38) demonstrou ser seguro e eficaz (Bride et al. 2018), assegurando que CD38 pode ser um bom alvo e sugerindo que tratamentos anti-CD38 podem ser uma terapia promissora. Ainda, foi visto que as células Tregs que já são positivas para o marcador CD39 exibem alta expressão de CD38 em pacientes com sepse (Huang et al. 2015). Na LLA-B, mais CD38 e CD39 podem estar sendo responsáveis por produzir mais ADO, tornando as células Tregs mais ativas e as T efectoras menos ativas, favorecendo a progressão das

células neoplásicas. Aparentemente esses resultados que revelam uma menor expressão de CD38 em alguns tipos celulares específicos podem parecer discordantes dos obtidos *in silico*, porém devemos levar em consideração que nas análises transcriptômicas trabalhamos com toda a informação de mRNA presente na amostra, portanto, trabalhamos com a informação genética presente em todas as células, saudáveis ou leucêmicas. Então, ao todo, há uma maior expressão do gene CD38, porém nada impede que alguns tipos celulares estejam expressando mais esse gene, enquanto outros estejam expressando menos, no balanço geral há uma maior expressão do gene CD38 capaz de impactar negativamente na probabilidade de sobrevida dos pacientes com LLA-B.

Como a coleta de biopsia de medula óssea é um procedimento altamente invasivo, eticamente não conseguimos amostras de medula óssea de sujeitos saudáveis para comparar com o grupo LLA, portanto, todos os resultados nessa coorte são discutidas com dados da literatura, de forma descritiva e sem análise estatística, com exceção das análises de correlação. Nessa coorte (n=6), observamos uma maior quantidade do marcador CD38 em subpopulações de células T CD4+ e CD8+, uma maior quantidade do marcador CD39 na população de Treg e uma maior quantidade do marcador CD73 nas subpopulações de células B (totais e Bregs). Como visto anteriormente na coorte de sangue periférico, células T CD8+ que expressam CD38 são capazes de contribuir na progressão da LLA-B através da secreção de citocinas (Huang, Tsuda e Takatsuki 1993), mas ainda podem estar suprimindo a proliferação de células T CD4+ efectoras (Bahri et al. 2012). Nesse contexto, a expressão de CD38 pode estar potencializando a atividade supressora das células T CD8+, inibindo as células que combateriam as células leucêmicas, favorecendo a progressão da leucemia e por consequência diminuindo a sobrevida global dos pacientes com LLA-B. Ainda, vimos uma correlação positiva entre a expressão de CD38 e CD73 na população de células T

CD4+, e entre CD38 e CD39 na população de células Bregs, quando avaliado pela MFI. CD38 parece ser a principal ectonucleotidase do eixo CD38/CD39/CD73 em LLA-B, podendo ser uma enzima chave na produção de ADO, molécula imunossupressora, podendo levar a progressão da LLA-B.

Ainda, mesmo não tendo estratificado a coorte de pacientes no experimento *in silico*, achamos interessante estratificar nos experimentos *in vivo*. Grupos de risco são usados para planejar melhores tratamentos, visto que pacientes com LLA de alto risco geralmente recebem diferentes tipos de fármacos anticâncer e/ou doses maiores de fármacos anticâncer do que pacientes com LLA de risco padrão (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002). A classificação utilizada foi baseada na idade dos pacientes, visto a probabilidade das crianças (1 a 10 anos) alcançarem uma remissão bem-sucedida após 4 semanas de início do tratamento ser de 95% (Hoffbrand, Moss e Pettit 2006) e também na contagem de glóbulos brancos no momento do diagnóstico, onde contagens menores que 50.000/ $\mu$ L no momento do diagnóstico são favoráveis ao prognóstico do paciente (PDQ Pediatric Treatment Editorial Board 2002). Classificamos, portanto, pacientes no grupo risco padrão (baixo) aqueles com idade entre 1 e 10 anos que tinham uma contagem de glóbulos brancos menor que 50.000/ $\mu$ L no momento do diagnóstico e pacientes no grupo risco alto aqueles com 10 anos ou mais e/ou que tinham uma contagem de glóbulos brancos de 50.000/ $\mu$ L ou mais no momento do diagnóstico.

Nos grupos risco padrão (baixo) e risco alto, observamos que cada célula T CD8+ expressa mais CD38 em sua membrana celular, no grupo LLA se comparado ao grupo controle, ao passo que expressa menos CD38 na membrana celular das células B e Bregs, resultado semelhante ao encontrado na coorte de amostras de sangue periférico,

demonstrando novamente a importância da expressão de CD38 em alguns tipos celulares específicos na LLA-B. A única diferença encontrada entre os grupos risco padrão (baixo) e risco alto, quanto a expressão de ectonucleotidases, foi uma menor expressão de CD39 em células Tregs na superfície celular do grupo LLA de risco baixo, se comparado com o grupo controle. O risco padrão (baixo) pode estar produzindo menos ADO pela via canônica, visto que há menos CD39 para converter ATP em AMP (substrato para a produção de ADO). Menor produção de ADO pode levar a uma menor imunossupressão, favorecendo o prognóstico desse grupo de pacientes se comparado com o grupo risco alto.

Quanto a expressão das ectonucleotidases nos linfócitos totais e suas subpopulações, podemos observar o envolvimento de todas as ectonucleotidases avaliadas (CD38, CD39, CD73) em tipos de células imunes diferentes, indicando que cada tipo celular utiliza de meios heterogêneos de sinalização celular, dependendo do contexto metabólico. Correlacionando os resultados dos experimentos *in silico* e *in vivo*, nota-se que no artigo de bioinformática correlacionamos a expressão dos genes purinérgicos com a sobrevivência de pacientes com LLA-B, onde a expressão do marcador CD38 mostra-se importante para estudos futuros. A expressão dos outros genes purinérgicos também está acontecendo, com a diferença de que não influenciam a probabilidade de sobrevivência dos pacientes.

Também caracterizamos o sistema imunológico de pacientes com LLA-B, destacando as frequências de linfócitos totais e suas subpopulações, visto que pouco se sabe sobre essa complexa interação entre células imunes e a resposta imune em diferentes tipos de amostras e em grupos de risco diferentes para essa patologia, principalmente referente a linfócitos B e T regulatórios. Comparamos as frequências de linfócitos e suas subpopulações da nossa coorte de pacientes com amostras de medula



óssea (n=6) com uma coorte referência (Clark, Phillips e Miller 1976), encontrando frequências maiores em nossa coorte. Comparando nossos resultados com uma coorte de pacientes com LMA, observamos uma maior frequência de células T citotóxicas na LLA-B. Já foi visto que células T CD8<sup>+</sup> expressam mais PD-1 em amostras de medula óssea se comparado com amostras de sangue periférico. PD-1 pode estar mediando a exaustão das células T, gerando um ambiente supressor na LLA-B (Jia et al. 2018).

Há uma diferença quanto a frequência celular em amostras de medula óssea e sangue periférico, bem como entre os grupos risco padrão (baixo) e alto. Na coorte de amostras de medula óssea (n=6), observamos uma maior frequência de células T, se comparado com a coorte de amostras de sangue periférico. Na coorte de amostras de sangue periférico parece predominar células de linhagem B, se comparado com a coorte de amostras de medula óssea. Já no grupo risco padrão (baixo), observamos uma tendência a uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, diferente do encontrado no grupo risco alto. Concluimos que diferentes grupos apresentam perfis celulares diferentes, porém, quanto aos grupos de risco, parece que a presença de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> podem estar sendo benéficas para o prognóstico desses pacientes. Já foi visto que a expansão de células T CD8<sup>+</sup> em paciente com câncer pode ser uma maneira de criar um ambiente pró-inflamatório dominante, levando a rejeição do tumor em sítios locais e distais (P. Yu et al. 2004), já as células T CD4<sup>+</sup> estariam envolvidas na ativação de células T CD8<sup>+</sup> para combater o câncer.

Podemos sugerir, portanto, que o gene CD38 pode estar envolvido na agressividade da LLA-B, correlacionando-se com uma menor probabilidade de sobrevida global nos pacientes. Com os experimentos *in silico* e *in vivo* abrimos a possibilidade de CD38 fazer parte da rede patogénica subjacente associada ao desenvolvimento e progressão da LLA-B. Ainda, podemos sugerir que o perfil da

frequência de linfócitos pode influenciar o resultado do tratamento em nichos e grupos de risco diferentes, bem como o perfil de expressão e correlação das ectonucleotidasas.

## CONCLUSÃO

Observamos, portanto, um aumento na expressão das ectonucleotidases em células imunes na LLA, principalmente no que diz respeito a CD38 (a qual vimos pelos testes estatísticos nos experimentos *in silico* e nas análises realizadas nos experimentos *in vivo*). As ectonucleotidases CD39 e CD73 apresentaram resultados menos robustos que a ectonucleotidase CD38, onde observamos aumento significativo em subpopulações específicas de linfócitos. Ressaltamos o papel da ADO na imunossupressão e progressão neoplásica. Por fim, a expressão das ectonucleotidases variam nas diferentes subpopulações de linfócitos, impactando na resposta imune dos pacientes com LLA. Faz-se necessário mais pesquisas a respeito do papel das ectonucleotidases, principalmente da CD38, na LLA-B. O entendimento do sistema imune no contexto purinérgico abre perspectivas interessantes como ferramenta para prognóstico e terapia para pacientes com LLA-B.

## **PERSPECTIVAS**

- Aumentar o tamanho amostral, a fim de aumentar a relevância estatística do estudo.
- Realizar cultura de células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea de pacientes com LLA-B e de sujeitos saudáveis, inibindo ou não a CD38 (analisando a secreção de citocinas, ativação e proliferação/morte dessas células e metabolismo do ATP).
- Avaliar as características fenotípicas e o papel funcional das células B regulatórias derivadas das células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea de pacientes com LLA-B na regulação das respostas dos linfócitos T, através de co-cultura. Analisando a secreção de citocinas, metabolismo do ATP e ativação e proliferação/morte dessas células.
- Avaliar a hidrólise de nucleotídeos no plasma de pacientes com LLA-B e de sujeitos saudáveis.

## REFERÊNCIAS

1. Andrés, Clara De, Marta Tejera-Alhambra, Bárbara Alonso, Lara Valor, Roseta Teijeiro, Rocío Ramos-Medina, Dolores Mateos, Florence Faure e Silvia Sánchez-Ramón. 2014. “New Regulatory CD19+CD25+ B-Cell Subset in Clinically Isolated Syndrome and Multiple Sclerosis Relapse. Changes after Glucocorticoids.” *Journal of Neuroimmunology* 270 (1–2): 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.02.003>.
2. Antonioli, Luca, Corrado Blandizzi, Pál Pacher e György Haskó. 2013. “Immunity, Inflammation and Cancer: A Leading Role for Adenosine.” *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>.
3. Bahri, Rajia, Annalena Bollinger, Thomas Bollinger, Zane Orinska e Silvia Bulfone-Paus. 2012. “Ectonucleotidase CD38 Demarcates Regulatory, Memory-Like CD8+ T Cells with IFN- $\gamma$ -Mediated Suppressor Activities.” *PLoS ONE* 7 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045234>.
4. Bar, Merav, Megan Othus, Hanahlyn M. Park, Vicky Sandhu, Xueyan Chen, Brent L. Wood e Elihu Estey. 2015. “Elevated Lymphocyte Count at Time of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis Is Associated with Shorter Remission.” *Leukemia and Lymphoma* 56 (11): 3109–15. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1020060>.
5. Bhattacharya, Kaushik, Sarmila Chandra e Chitra Mandal. 2014. “Critical Stoichiometric Ratio of CD4+ CD25+ FoxP3+ Regulatory T Cells and CD4+ CD25- Responder T Cells Influence Immunosuppression in Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia.” *Immunology* 142 (1): 124–39. <https://doi.org/10.1111/imm.12237>.
6. Bieńkowski, Michał e Matthias Preusser. 2015. “Prognostic Role of Tumour-

- Infiltrating Inflammatory Cells in Brain Tumours: Literature Review.” *Current Opinion in Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000251>.
7. Blair, Paul A., Lina Yassin Noreña, Fabian Flores-Borja, David J. Rawlings, David A. Isenberg, Michael R. Ehrenstein e Claudia Mauri. 2010. “CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients.” *Immunity* 32 (1): 129–40. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.11.009>.
  8. Bouaziz, Jean David, Koichi Yanaba e Thomas F. Tedder. 2008. “Regulatory B Cells as Inhibitors of Immune Responses and Inflammation.” *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00661.x>.
  9. Bremnes, Roy M., Lill Tove Busund, Thomas L. Kilver, Sigve Andersen, Elin Richardsen, Erna Elise Paulsen, Sigurd Hald, et al. 2016. “The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer.” *Journal of Thoracic Oncology*. Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.015>.
  10. Burnstock, G., e A. Verkhratsky. 2009. “Evolutionary Origins of the Purinergic Signalling System.” *Acta Physiologica*. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x>.
  11. Clark, D. A., R. A. Phillips, e R. G. Miller. 1976. “Characterization of Cells That Suppress the Cytotoxic Activity of T Lymphocytes. I. Quantitative Measurement of Inhibitor Cells.” *JIMMUNOL*. 116 (4): 1020–29.
  12. Dalwadi, Harnisha, Bo Wei, Matthew Schrage, Tom T. Su, David J. Rawlings, e Jonathan Braun. 2003. “ B Cell Developmental Requirement for the G  $\alpha$  I2

- Gene .” *The Journal of Immunology* 170 (4): 1707–15.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1707>.
13. Deaglio, Silvia, Karen M. Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang Fan Chen, et al. 2007. “Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression.” *Journal of Experimental Medicine* 204 (6): 1257–65.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20062512>.
14. Falcão, Roberto Passetto, e Eduardo Magalhães Rego. 2002. “Leucemia Linfóide Aguda Em Adultos e Crianças: Características Morfológicas e Imunofenotípicas.” *Serie Monograficas Da Escola Brasileira de Hematologia*, no. 9: 25–35.
15. Farias, Mariela Granero, e Simone Martins Castro. 2004. “Diagnóstico Laboratorial Das Leucemias Linfóides Agudas.” *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 40 (2): 91–98.
16. Figueiró, F., L. Muller, S. Funk, E. K. Jackson, A. M.O. Battastini, e T. L. Whiteside. 2016. “Phenotypic and Functional Characteristics of CD39<sup>high</sup> Human Regulatory B Cells (Breg).” *OncImmunity* 5 (2).  
<https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082703>.
17. Fillatreau, Simon, Claire H. Sweenie, Mandy J. McGeachy, David Gray, e Stephen M. Anderton. 2002. “B Cells Regulate Autoimmunity by Provision of IL-10.” *Nature Immunology* 3 (10): 944–50. <https://doi.org/10.1038/ni833>.
18. Gartner, Leslie. 2017. *Tratado de Histologia*.  
<https://books.google.com.br/books?id=rKE5DwAAQBAJ&pg=PT768&lpg=PT768&dq=É+possível+que+os+dois+tipos+de+linfócitos+Treg+tenham+funções+sobrepostas+e+que+eles+atuem+em+conjunto+para+suprimir+a+respost>

a+autoimune+a+moléculas+do+próprio+organismo&source=bl&o.

19. Geiger, Terrence L., e Jeffrey E. Rubnitz. 2015. “New Approaches for the Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia.” *Discovery Medicine* 19 (105): 275–84.
20. German, J. 1995. “Bloom’s Syndrome.” *Dermatologic Clinics* 13 (1): 7–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7712653>.
21. Greaves, Mel. 2005. “In Utero Origins of Childhood Leukaemia.” In *Early Human Development*, 81:123–29. Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.10.004>.
22. ———. 2006. “Infection, Immune Responses and the Aetiology of Childhood Leukaemia.” *Nature Reviews Cancer*. <https://doi.org/10.1038/nrc1816>.
23. Hoffbrand, A. V., P. A. H. Moss, e J. E. Pettit. 2006. *Essential Haematology*. Blackwell Pub.
24. Horenstein, A.L., A. Chillemi, G. Zaccarello, S. Bruzzone, V. Quarona, A. Zito, S. Serra, e F. Malavasi. 2013. “A CD38/CD203a/CD73 Ectoenzymatic Pathway Independent of CD39 Drives a Novel Adenosinergic Loop in Human T Lymphocytes.” *Oncoimmunology* 2 (9). <https://doi.org/10.4161/ONCI.26246>.
25. Horenstein, Alberto L., Cristiano Bracci, Fabio Morandi, e Fabio Malavasi. 2019. “CD38 in Adenosinergic Pathways and Metabolic Re-Programming in Human Multiple Myeloma Cells: In-Tandem Insights From Basic Science to Therapy.” *Frontiers in Immunology*. NLM (Medline). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00760>.
26. Huang, Huihuang, Ruonan Xu, Fang Lin, Chunmei Bao, Siyu Wang, Chengcheng Ji, Ke Li, et al. 2015. “High Circulating CD39+ Regulatory T Cells Predict Poor Survival for Sepsis Patients.” *International Journal of Infectious*



- Diseases* 30 (January): e57–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.11.006>.
27. Huang, R W, H Tsuda, e K Takatsuki. 1993. “Interleukin-2 Prevents Programmed Cell Death in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells.” *International Journal of Hematology* 58 (1–2): 83–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8219114>.
28. Huang, Steve, Sergey Apasov, Masahiro Koshiba, e Michail Sitkovsky. 1997. “Role of A2a Extracellular Adenosine Receptor-Mediated Signaling in Adenosine-Mediated Inhibition of T-Cell Activation and Expansion.” *Blood* 90 (4): 1600–1610. [https://doi.org/10.1182/blood.v90.4.1600.1600\\_1600\\_1610](https://doi.org/10.1182/blood.v90.4.1600.1600_1600_1610).
29. Iqbal, Jameel, e Mone Zaidi. 2006. “Extracellular NAD<sup>+</sup> Metabolism Modulates Osteoclastogenesis.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349 (2): 533–39. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.108>.
30. Jeune, Caroline Le, Sarah Bertoli, Mohamed Elhamri, Francois Vergez, Cecile Borel, Françoise Huguet, Mauricette Michallet, Charles Dumontet, Christian Recher, e Xavier Thomas. 2014. “Initial Absolute Lymphocyte Count as a Prognostic Factor for Outcome in Acute Myeloid Leukemia.” *Leukemia and Lymphoma* 55 (4): 855–62. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.813504>.
31. Jia, Bei, Liru Wang, David F. Claxton, W Christopher Ehmann, Witold B. Rybka, Shin Mineishi, Syed Rizvi, et al. 2018. “Bone Marrow CD8 T Cells Express High Frequency of PD-1 and Exhibit Reduced Anti-Leukemia Response in Newly Diagnosed AML Patients.” *Blood Cancer Journal* 8 (3): 34. <https://doi.org/10.1038/s41408-018-0069-4>.
32. Junior, Cavalcanti, Geraldo Barroso, Raquel Ciuvalschi Maia, Jane de Almeida Dobbin, Maria Kadma Carriço, Ransa Cabral Harab, Wilson Savino, e Maria do Socorro Pombo de Oliveira. 1997. “The Importance to Application of

- Monoclonal Antibodies in Laboratorial Diagnostic of Lymphoblastic Leukemia.” *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 159–67. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&sc=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=526281&indexSearch=ID>.
33. Kaku, Hiroaki, Kai Fan Cheng, Yousef Al-Abed, e Thomas L. Rothstein. 2014. “A Novel Mechanism of B Cell–Mediated Immune Suppression through CD73 Expression and Adenosine Production.” *The Journal of Immunology* 193 (12): 5904–13. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400336>.
34. Kessel, Aharon, Tharwat Haj, Regina Peri, Ayelet Snir, Doron Melamed, Edmond Sabo, e Elias Toubi. 2012. “Human CD19+CD25<sup>high</sup> B Regulatory Cells Suppress Proliferation of CD4<sup>+</sup> T Cells and Enhance Foxp3 and CTLA-4 Expression in T-Regulatory Cells.” *Autoimmunity Reviews* 11 (9): 670–77. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.018>.
35. Keyhani, A., Y.O. O Huh, D. Jendiroba, L. Pagliaro, J. Cortez, S. Pierce, M. Pearlman, E. Estey, H. Kantarjian, e E.J. J Freireich. 2000a. “Increased CD38 Expression Is Associated with Favorable Prognosis in Adult Acute Leukemia.” *Leukemia Research* 24 (2): 153–59. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(99\)00147-2](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(99)00147-2).
36. Kumar, V. 2013. “Adenosine as an Endogenous Immunoregulator in Cancer Pathogenesis: Where to Go?” *Purinergic Signalling*. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9349-9>.
37. Lee, Byung O., Laura Haynes, Sheri M. Eaton, Susan L. Swain, e Troy D. Randall. 2002. “The Biological Outcome of CD40 Signaling Is Dependent on the Duration of CD40 Ligand Expression: Reciprocal Regulation by Interleukin

- (IL)-4 and IL-12.” *Journal of Experimental Medicine* 196 (5): 693–704.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20020845>.
38. Lee, Yongjoon, Junsik Park, Su-Hyung Park, e Eui-Cheol Shin. 2019. “CD39+CD8+ T Cells Exhibit a Distinct Phenotype among Tumor-Infiltrating Tumor-Antigen-specific CD8+ T Cells.” *The Journal of Immunology* 202 (1 Supplement).
39. “Leucemias Agudas Pediátricas.” n.d. Accessed January 11, 2020.  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Avaliacao\\_epidemiologica\\_da\\_s\\_leucemias\\_linfoblasticas\\_em.\\_pa.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Avaliacao_epidemiologica_da_s_leucemias_linfoblasticas_em._pa.pdf).
40. Malavasi, Fabio, Silvia Deaglio, Rajendra Damle, Giovanna Cutrona, Manlio Ferrarini, e Nicholas Chiorazzi. 2011. “CD38 and Chronic Lymphocytic Leukemia: A Decade Later.” *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-275610>.
41. Mauri, Claudia, e Michael R. Ehrenstein. 2008. “The ‘short’ History of Regulatory B Cells.” *Trends in Immunology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2007.10.004>.
42. Naganuma, Makoto, Elizabeth B. Wiznerowicz, Courtney M. Lappas, Joel Linden, Mark T. Worthington, e Peter B. Ernst. 2006. “Cutting Edge: Critical Role for A<sub>2A</sub> Adenosine Receptors in the T Cell-Mediated Regulation of Colitis .” *The Journal of Immunology* 177 (5): 2765–69.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2765>.
43. Ohta, A., E. Gorelik, S.J. Prasad, F. Ronchese, D. Lukashev, M.K.K. Wong, X. Huang, et al. 2006. “A<sub>2A</sub> Adenosine Receptor Protects Tumors from Antitumor T Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (35): 13132–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>.

44. Ohta, A., e M. Sitkovsky. 2001. “Role of G-Protein-Coupled Adenosine Receptors in Downregulation of Inflammation and Protection from Tissue Damage.” *Nature* 414 (6866): 916–20. <https://doi.org/10.1038/414916a>.
45. Okuda, T, S A Shurtleff, M B Valentine, S C Raimondi, D R Head, F Behm, A M Curcio-Brint, Q Liu, C H Pui, e C J Sherr. 1995. “Frequent Deletion of P16INK4a/MTS1 and P15INK4b/MTS2 in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Blood* 85 (9): 2321–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7727766>.
46. PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, PDQ Pediatric Treatment Editorial. 2002. *Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26389206>.
47. Pellegatti, Patrizia, Lizzia Raffaghello, Giovanna Bianchi, Federica Piccardi, Vito Pistoia, e Francesco Di Virgilio. 2008. “Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase.” Edited by Joseph El Khoury. *PLoS ONE* 3 (7): e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>.
48. Pui, C., L.L. Robison, e A.T. Look. 2008. “Acute Lymphoblastic Leukaemia.” *The Lancet* 371 (9617): 1030–43. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60457-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60457-2).
49. Santoemma, Phillip P., e Daniel J. Powell. 2015. “Tumor Infiltrating Lymphocytes in Ovarian Cancer.” *Cancer Biology and Therapy*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1040960>.
50. Santos, Fernanda de Lima Gomes dos. 2019. “Alterações Hematológicas No Diagnóstico Laboratorial de Leucemias Linfocíticas.”

51. Saze, Zenichiro, Patrick J. Schuler, Chang Sook Hong, Dongmei Cheng, Edwin K. Jackson, e Theresa L. Whiteside. 2013. "Adenosine Production by Human B Cells and B Cell-Mediated Suppression of Activated T Cells." *Blood* 122 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-482406>.
52. Schmiegelow, K., T. Vestergaard, S. M. Nielsen, e H. Hjalgrim. 2008. "Etiology of Common Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The Adrenal Hypothesis." *Leukemia*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.212>.
53. Schumacher, Harold R, Carmelita J Alvares, Ruthann I Blough, e Fermina Mazzella. 2002. "Acute Leukemia." *Clinics in Laboratory Medicine* 22 (1): 153–92, vii. [https://doi.org/10.1016/s0272-2712\(03\)00071-4](https://doi.org/10.1016/s0272-2712(03)00071-4).
54. Sitkovsky, Michail, e Dmitriy Lukashev. 2005. "Regulation of Immune Cells by Local-Tissue Oxygen Tension: HIF1 $\alpha$  and Adenosine Receptors." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri1685>.
55. Stanic, Barbara, Willem Van De Veen, Oliver F. Wirz, Beate Rückert, Hideaki Morita, Stefan Söllner, Cezmi A. Akdis, e Mübeccel Akdis. 2015. "IL-10-Overexpressing B Cells Regulate Innate and Adaptive Immune Responses." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 135 (3): 771-780.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.041>.
56. Swerdlow, SH, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein, e J Thiele. 2008. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. WHO Press, Geneva.
57. Tian, Jide, Dan Zekzer, Lorraine Hanssen, Yuxin Lu, Angelica Olcott, e Daniel L. Kaufman. 2001. "Lipopolysaccharide-Activated B Cells Down-Regulate Th1 Immunity and Prevent Autoimmune Diabetes in Nonobese Diabetic Mice." *The*

- Journal of Immunology* 167 (2): 1081–89.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1081>.
58. Vaisitti, Tiziana, Francesca Arruga, Giulia Guerra, e Silvia Deaglio. 2019. “Ectonucleotidases in Blood Malignancies: A Tale of Surface Markers and Therapeutic Targets.” *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02301>.
59. Virgilio, Francesco Di, Jean Marie Boeynaems, e Simon C. Robson. 2009. “Extracellular Nucleotides as Negative Modulators of Immunity.” *Current Opinion in Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.021>.
60. Wang, Liang, Hua Wang, Peng Fei Li, Yue Lu, Zhong Jun Xia, Hui Qiang Huang, e Yu Jing Zhang. 2015. “CD38 Expression Predicts Poor Prognosis and Might Be a Potential Therapy Target in Extranodal NK/T Cell Lymphoma, Nasal Type.” *Annals of Hematology* 94 (8): 1381–88.  
<https://doi.org/10.1007/s00277-015-2359-2>.
61. Wang, Wei, Li Gao, Yan Li, Zhen Ling Li, Ming Gong, Fan Zhou Huang, Yan Rong Chen, Chun Xia Zhang, Ya Yue Gao, e Yi Gai Ma. 2016. “The Application of CD73 in Minimal Residual Disease Monitoring Using Flow Cytometry in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia.” *Leukemia and Lymphoma* 57 (5): 1174–81. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1070153>.
62. Yegutkin, Gennady G., Tiina Henttinen, Sergei S. Samburski, Jozef Sychala, e Sirpa Jalkanen. 2002. “The Evidence for Two Opposite, ATP-Generating and ATP-Consuming, Extracellular Pathways on Endothelial and Lymphoid Cells.” *Biochemical Journal* 367 (1): 121–28. <https://doi.org/10.1042/BJ20020439>.
63. Yu, Ping, Youjin Lee, Wenhua Liu, Robert K. Chin, Jing Wang, Yang Wang, Andrea Schietinger, Mary Philip, Hans Schreiber, e Yang Xin Fu. 2004.

- “Priming of Naive T Cells inside Tumors Leads to Eradication of Established Tumors.” *Nature Immunology* 5 (2): 141–49. <https://doi.org/10.1038/ni1029>.
64. Yu, X., Z. Zhang, Z. Wang, P. Wu, F. Qiu, e J. Huang. 2016. “Prognostic and Predictive Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis.” *Clinical and Translational Oncology* 18 (5): 497–506. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1391-y>.
65. Zimmermann, H. 1996. “Biochemistry, Localization and Functional Roles of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System.” *Progress in Neurobiology* 49 (6): 589–618. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(96\)00026-3](https://doi.org/10.1016/0301-0082(96)00026-3).
66. Zupo, Simona, Laura Isnardi, Mauro Megna, Rosanna Massara, Fabio Malavasi, Mariella Dono, Elisabetta Cosulich, e Manlio Ferrarini. 1996. “CD38 Expression Distinguishes Two Groups of B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemias with Different Responses to Anti-IgM Antibodies and Propensity to Apoptosis.” *Blood* 88 (4): 1365–74. <https://doi.org/10.1182/blood.v88.4.1365.bloodjournal8841365>.

**ANEXO A: Carta de aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**



HOSPITAL DE  
CLÍNICAS  
PORTO ALEGRE RS



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

**Projeto**

2018/0401

**Pesquisadores:**

*Alessandra Aparecida Paz*  
ALESSANDRA APARECIDA PAZ

*Vitória Brum da Silva Nunes*  
VITÓRIA BRUM DA SILVA NUNES

*Fabício Figueiró*  
FABRÍCIO FIGUEIRÓ

*Liane Esteves Daudt*  
LIANE ESTEVES DAUDT

*Ana Maria Oliveira Battastini*  
ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

*Mariela Granero Farias*  
MARIELA GRANERO FARIAS

*Fabiane Spagnol Pedrazzani*  
FABIANE SPAGNOL PEDRAZZANI

**Número de Participantes:** 46

**Título:** Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) 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 avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).



## ANEXO B: Parecer do projeto de mestrado do PPG – Ciências Biológicas Bioquímica

**PPG-Ciências  
Biológicas  
Bioquímica**

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

### Parecer de Projeto de Mestrado

O projeto da aluna **Vitória Brum da Silva Nunes**, intitulado: "**Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação**", orientado pelo Prof. Dr. Fabrício Figueiró, encaminhado para avaliação pelo PPG - Bioquímica teve a seguinte análise e parecer:

#### ANÁLISE DO PROJETO

##### 1. Mérito científico

- Relevante  
 Sugestões de alterações:

##### 2. Fundamentação

- Adequada  
 Sugestões de alterações:

##### 3. Objetivos

- Bem definidos  
 Sugestões de alterações:

##### 4. Metodologia

- Adequada  
 Sugestões de alterações:

##### 5. Cálculo do número amostral

- Realizado  
 Não aplicável  
 Não realizado:

**6. Considerações Éticas**

- Descritas  
 Não aplicável  
 Sugestões de alterações:

**7. Descarte dos Resíduos Químicos e Biológicos**

- Descritos  
 Não aplicável  
 Sugestões de alterações:

**8. Cronograma de Execução**

- Apresentado  
 Não apresentado

**9. Referências Bibliográficas**

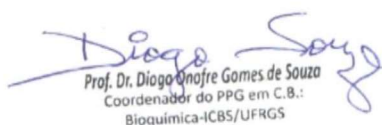
- Pertinentes  
 Sugestões de alterações:


**PARECER FINAL:**

- Aprovado  
 Diligência

Porto Alegre, 22 de 05 de 2018

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Diogo Onofre Gomes de Souza  
Coordenador do PPG em C.B.:  
Bioquímica-ICBS/UFRGS

  
JULIANA GASPAROTTO  
PÓS-DOUTORANDA DO PPG BIOQUÍMICA  
CPF: 005436800-61

## **ANEXO C: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **(Grupo controle)**

**Nº do projeto GPPG ou CAAE: 93973218.1.1001.5327**

Título do Projeto: Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar as funções das células responsáveis pela defesa do organismo através de amostras de material biológico em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) e em sujeitos saudáveis. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Laboratório de Sinalização Purinérgica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a realização do estudo é necessário comparar o grupo de pacientes que apresentam a característica estudada (LLA) com um grupo de pacientes que não apresenta esta característica. Você está sendo convidado para participar do grupo controle, ou seja, que não possui diagnóstico de leucemia. Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: autorizar a utilização do material biológico (sangue periférico) descartado pelo Laboratório de Análises Clínicas, Setor de Hematologia do HCPA, portanto, não será necessária uma nova coleta para esta pesquisa. Também pedimos sua autorização para consultar seu prontuário para coleta de dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos.

A utilização das amostras de material biológico seguirá as normativas vigentes e, após a sua utilização, será devidamente descartada.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, tendo em vista que a coleta de sangue periférico já seria realizada assistencialmente. Há apenas o risco de quebra de confidencialidade dos dados, porém os pesquisadores tomarão todos os cuidados para que isso não aconteça.

Sua participação na pesquisa não trará benefícios diretos a você e aos demais participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatório. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 2

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### (Grupo controle)

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

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você 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 não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51)3359-8317, com o pesquisador Fabrício Figueiró, pelo telefone (51)3308-5553/5554 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51)33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o termo

---

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 2 de 2

**ANEXO D: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo controle: Responsáveis**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Grupo controle - Responsáveis)**

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 93973218.1.1001.5327

Título do Projeto: Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar as funções das células responsáveis pela defesa do organismo através de amostras de material biológico em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) e em sujeitos saudáveis. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Laboratório de Sinalização Purinérgica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Para a realização do estudo é necessário comparar o grupo de pacientes que apresentam a característica estudada (LLA) com um grupo de pacientes que não apresenta esta característica. A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada para participar do grupo controle, ou seja, que não possui diagnóstico de leucemia. Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: autorizar a utilização do material biológico (sangue periférico) descartado pelo Laboratório de Análises Clínicas, Setor de Hematologia do HCPA, portanto, não será necessária uma nova coleta para esta pesquisa. Também pedimos sua autorização para consultar o prontuário para coleta de dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos.

A utilização das amostras de material biológico seguirá as normativas vigentes e, após a sua utilização, será devidamente descartada.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, tendo em vista que a coleta de sangue periférico já seria realizada assistencialmente. Há apenas o risco de quebra de confidencialidade dos dados, porém os pesquisadores tomarão todos os cuidados para que isso não aconteça.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são indiretos, pois a participação na pesquisa não trará benefícios diretos à pessoa pela qual você é responsável e aos demais participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatório. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 3

CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### (Grupo controle - Responsáveis)

Recebe ou possa vir a receber na instituição.

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

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da 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, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51)3359-8317, com o pesquisador Fabrício Figueiró, pelo telefone (51)3308-5553/5554 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51)33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Nome do responsável

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 2 de 3

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Grupo controle - Responsáveis)**

\_\_\_\_\_

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 3 de 3

## **ANEXO E: Termo de consentimento livre e esclarecido – Grupo pacientes LLA**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **(Grupo Pacientes LLA)**

**Nº do projeto GPPG ou CAAE: 93973218.1.1001.5327**

Título do Projeto: Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar as funções das células responsáveis pela defesa do organismo através de amostras de material biológico em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Laboratório de Sinalização Purinérgica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você aceitar participar da pesquisa, os procedimentos envolvidos em sua participação são os seguintes: autorizar a utilização do material biológico (sangue periférico e medula óssea) já coletado e que foi utilizado para o seu diagnóstico de LLA. O material seria descartado pelo Setor de Hematologia do HCPA, portanto, não será necessária uma nova coleta para esta pesquisa. Também pedimos sua autorização para consultar seu prontuário para coleta de dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos.

A utilização das amostras de material biológico seguirá as normativas vigentes e, após a sua utilização, será devidamente descartada.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, tendo em vista que a coleta de sangue periférico e medula óssea já seria realizada assistencialmente. Há apenas o risco de quebra de confidencialidade dos dados, porém os pesquisadores tomarão todos os cuidados para que isso não aconteça.

Sua participação na pesquisa não trará benefícios diretos a você e aos demais participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatório. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

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

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 1 de 2



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Grupo Pacientes LLA)**

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante de sua participação na pesquisa, você 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 não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51)3359-8317, com o pesquisador Fabrício Figueiró, pelo telefone (51)3308-5553/5554 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51)33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_

Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Nome do pesquisador que aplicou o termo

\_\_\_\_\_

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Grupo pacientes LLA - Responsáveis)**

**Nº do projeto GPPG ou CAAE: 93973218.1.1001.5327**

Título do Projeto: Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é estudar as funções das células responsáveis pela defesa do organismo através de amostras de material biológico em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Laboratório de Sinalização Purinérgica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: autorizar a utilização do material biológico (sangue periférico e medula óssea) já coletado e que foi utilizado para o diagnóstico de LLA da pessoa pela qual você é responsável. O material seria descartado pelo Setor de Hematologia do HCPA, portanto, não será necessária uma nova coleta para esta pesquisa. Também pedimos sua autorização para consultar o prontuário para coleta de dados clínicos, laboratoriais e sócio demográficos.

A utilização das amostras de material biológico seguirá as normativas vigentes e, após a sua utilização, será devidamente descartada.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, tendo em vista que a coleta de sangue periférico e medula óssea já seria realizada assistencialmente. Há apenas o risco de quebra de confidencialidade dos dados, porém os pesquisadores tomarão todos os cuidados para que isso não aconteça.

A participação na pesquisa não trará benefícios diretos à pessoa pela qual você é responsável e aos demais participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado, e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatório. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 1 de 3

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### (Grupo pacientes LLA - Responsáveis)

haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da 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, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51)3359-8317, com o pesquisador Fabrício Figueiró, pelo telefone (51)3308-5553/5554 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51)33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

---

Nome do participante da pesquisa

---

Nome do responsável

---

Assinatura

---

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 2 de 3

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**(Grupo pacientes LLA - Responsáveis)**

\_\_\_\_\_

Assinatura

Local e Data: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador \_\_\_\_\_  
CEP Hospital de Clínicas de Porto Alegre (MR 05/11/2015)

Página 3 de 3