

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 POTENCIAIS BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E
IMUNOMODULADORES EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO B
(LLA-B)**

Porto Alegre

2023

Vitória Brum da Silva Nunes

**AVALIAÇÃO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E
IMUNOMODULADORES EM LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA DO TIPO
B (LLA-B)**

Tese 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 doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes, Vitoria Brum da Silva

Avaliação de potenciais biomarcadores prognósticos e imunomoduladores em leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) / Vitoria Brum da Silva Nunes. -- 2023. 191 f.

Orientador: Fabrício Figueiró.

Tese (Doutorado) -- 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, 2023.

1. Leucemia linfocítica aguda B comum infantil. 2. LLA-B. 3. Ectonucleotidases. 4. Imunomoduladores. 5. Subpopulações linfocitárias. I. Figueiró, Fabrício, orient. II. Título.

**À minha amada família:
pai Carlos, mãe Débora, irmãos
Leonardo e Icaro e noivo Bruno.**

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

(Carl Jung)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela vida. Acredito que a vida é regida por energias e vibrações e Deus seria a energia essencial que flui livremente em todas as direções. Portanto, agradeço a essa energia essencial, a Deus, que me pôs aqui e agora, nessa vida.

Gostaria de agradecer aos meus amados 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/dedicarei a vocês. Amo vocês mais do que tudo nesse mundo!

Meu pai e minha mãe esforçaram-se bravamente para educar três filhos, sendo eu a filha mais velha. Fomos (eu e meus irmãos), sempre, a prioridade para nossos pais. Mesmo com dificuldades em nos manter em escolas particulares a vida toda, a prioridade para nossos pais era propiciar para nós o melhor estudo possível. Vou sempre lembrar minha mãe falando a seguinte frase: “Quando eu e teu pai morreremos, não deixaremos bens materiais para vocês. E sim, estudo”. Passarei a diante, para meus filhos, o que os meus pais me ensinaram: que a educação é um potente instrumento de transformação social, econômico e cultural. Só a educação é capaz de transformar vidas! Obrigada por este e tantos outros ensinamentos que vocês me transmitiram ao longo da vida.

Também gostaria de agradecer aos meus irmãos, Leonardo e Icaro, por serem meus parceiros de vida. Que nossa irmandade jamais esmoreça e que sejamos apoio incondicional uns para os outros ao longo dessa vida. Que nada, jamais, seja maior que o nosso laço de amor e sangue. A mana mais velha estará sempre aqui para/por vocês. Amo muito vocês!

A minha família, em especial aos meus queridos avós: Darcy, Gilberto, Eronita e Sirley. Obrigada por serem o pilar das nossas famílias.

Ao meu amor, noivo e melhor amigo, Bruno, obrigada pelo entendimento, amizade, parceria e por tanto respeito e amor. Que possamos trilhar juntos essa jornada da vida, sempre em sintonia. Obrigada por me incentivar e acreditar em mim, até quando eu mesma não acredito. Que possamos acompanhar o crescimento um do outro e que sejamos cada dia melhores um para o outro e para nós mesmos. Eu te amo muito! Estendo aqui meu agradecimento e amor pela Luna, um pugzinho que nos enche de amor e completou nossa pequena-grande família.

Ao meu querido orientador, Fabrício Figueiró, obrigada por abrir as portas do laboratório 22 para mim e por acreditar no meu potencial. Fostes amigo, professor, psicólogo e um excelente orientador. Não poderia ter tido um orientador melhor do que tu! Que nossa parceria perdure por muitos anos. À Profa. Ana Maria Oliveira Battastini, por me acolher em seu laboratório, pelo carinho e reconhecimento e por tantos ensinamentos. A todos os professores que passaram pela minha vida ao longo desses anos, desde o colégio, meus mais sinceros agradecimentos; uma parcela de quem sou

hoje é porque, em algum momento, nossos caminhos se cruzaram e vocês compartilharam comigo seus conhecimentos. Sou eternamente grata pelos professores que pela minha vida passaram e contribuíram para eu ser a mulher que sou hoje.

Aos meus colegas e amigos do laboratório 22, obrigada por tudo, vocês tornaram essa caminhada mais leve, divertida e motivante. Sou uma cientista mais madura hoje, pois tive muitos de vocês como professores ao longo dessa caminhada. Agradecimento especial a Juliete Scholl, que me ajudou tanto por tantos anos. Tu foste essencial, Ju; a Camila Kehl e a Alexia Nedel, por termos juntas formado o “Grupo das leucemias”. A chegada de vocês ao laboratório tornou esse aprendizado sobre leucemias mais leve e divertido. Sou grata ao Fabrício e a vocês por terem acreditado no potencial dessa área de estudo e por darem continuidade; Luiz Lopes, Alisson Coldebella e Augusto Weber, sou imensamente grata pela nossa amizade e por tornarem minha passagem pelo laboratório mais leve e recheada de boas risadas. A todos os alunos/pesquisadores que um dia fizeram parte do Laboratório 22 e que foram trilhar outros caminhos, meu carinho e meu agradecimento sincero.

A todos os meus colaboradores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Mariela Granero, Ana Paula Alegretti, Alessandra Paz, Mariana Bohns, Liane Daudt, Monalisa Sosnoski e Fabiane Spagnol), obrigada pelo apoio ao longo dessa caminhada. Agradecimento especial a Dra. Alessandra Paz, a Ana Paula Alegretti e a Mariela Granero. Mari e Ana, vocês acreditaram no meu potencial e me fizeram adorar a citometria de fluxo, obrigada por tanto.

Agradeço a todos os demais colaboradores que contribuíram em algum momento para o desenvolvimento do meu trabalho, mas também para o meu crescimento profissional e pessoal. Agradecimento especial a Danieli Dallemole, César Moritz, Fabiana Manica e Mery Stéfani.

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.

Agradeço a UFRGS que me acolhe desde a graduação. Lá se vão 10 anos que cruzo quase que diariamente pelos campus da instituição e pelos alunos, professor, técnicos e servidores que fazem da UFRGS o que ela é hoje, uma instituição reconhecida internacionalmente, mas também um lugar pulsante de vida e que me fez/faz feliz a tantos anos. Sentirei saudades!

Um agradecimento muito especial a todos os funcionários do Departamento de Bioquímica da UFRGS que são essenciais para o funcionamento desse departamento. Desde os técnicos e servidos aos terceirizados. Muito obrigada pela amizade e por tanto suporte ao longo dos anos. Agradecimento especial ao Giordano Ferreira, Cleia e Silvana.

Por fim, agradeço aos componentes da banca pela disponibilidade na avaliação desse trabalho 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.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE FIGURAS.....	20
LISTA DE TABELAS.....	22
LISTA DE ESQUEMAS	23
APRESENTAÇÃO	24
1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Leucemia	26
1.1.1 Classificação das leucemias	27
1.1.2 Leucemia no Brasil e no mundo	28
1.1.3 Apresentação inicial das leucemias.....	30
1.1.4 Tratamento convencional das neoplasias hematológicas.....	30
1.2 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)	33
1.2.1 Classificação da LLA	33
1.2.1.1 Classificação FAB	33
1.2.1.2 Classificação OMS.....	34
1.2.2 Epidemiologia da LLA.....	36
1.2.3 Etiologia da LLA.....	38
1.2.3.1 Anormalidades genéticas recorrentes na população pediátrica.....	40
1.2.3.2 Mutações mais comuns associadas ao desenvolvimento da LLA-B	40
1.2.4 Apresentação inicial da LLA	41
1.2.4.1 Apresentação inicial da LLA na população pediátrica	42
1.2.5 Diagnóstico da LLA.....	43
1.2.5.1 Morfologia e citoquímica	43
1.2.5.2 Imunofenotipagem.....	44
1.2.5.3 Avaliação citogenética/molecular	45

1.2.6 Tratamento específico da LLA	46
1.2.6.1 Fase de indução	46
1.2.6.2 Fase de consolidação/intensificação	47
1.2.6.3 Fase de manutenção	48
1.2.7 Monitoramento da LLA.....	48
1.2.8 Estratificação de risco na LLA infantil.....	50
1.2.9 Sistema imunológico na LLA.....	50
1.2.9.1 Os mecanismos de evasão imune na LLA.....	50
1.2.9.2 Medula óssea como microambiente tumoral e a evasão imune	51
1.3 Sistema purinérgico: panorama geral	53
1.3.1 A família das ectonucleotidases	54
1.3.1.1 CD39 e CD73: Ectonucleotidases da via canônica	55
1.3.1.1.1 Expressão constitutiva de CD39 e CD73 nas células imunes.....	57
1.3.1.2 CD38: Ectonucleotidase da via não canônica	58
1.3.1.2.1 Expressão constitutiva de CD38 nas células imunes	60
1.3.2 Sistema purinérgico e imunomodulação.....	61
1.3.2.1 Atuação direta dos nucleotídeos extracelulares e nucleosídeos na imunomodulação	63
1.3.2.2 Papel das ectonucleotidases CD38, CD39 e CD73 na imunomodulação.....	66
1.3.3 Expressão de CD38, CD39 e CD73 no contexto das neoplasias hematológicas	69
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	71
3 OBJETIVOS	72
3.1 Objetivo Geral.....	72
3.2 Objetivos Específicos	72
4 RESULTADOS	73
4.1 Capítulo 1.....	73
4.2 Capítulo 2.....	86
5 DISCUSSÃO	102
6 CONCLUSÃO	116
7 PERSPECTIVAS	118

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9 ANEXOS.....	149
9.1 Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327).....	149
9.2 Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	150
9.3 Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327).....	151
9.4 Termo de Compromisso para Utilização de Dados do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	152
9.5 Formulário de Delegação de Funções do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327).....	153
9.6 Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Plataforma Brasil para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327).....	154
9.7 Parecer Consubstanciado do CEP da Plataforma Brasil para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	155
9.8 Parecer do Projeto de Mestrado do PPG – Bioquímica intitulado “Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação” que foi associado ao projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	158
9.9 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	160
9.10 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle: Responsáveis do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327).....	162
9.11 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Pacientes LLA do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	164
9.12 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Pacientes LLA: Responsáveis do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)	166
9.13 Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327).....	168
9.14 Acordo entre Instituições sobre Operacionalização, Compartilhamento, Utilização do Material Biológico Humano Armazenado em Biorrepositório do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	169
9.15 Declaração de Conhecimento e Cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados para Pesquisas Avaliadas pelo CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	172

9.16 Delegação de Funções do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	173
9.17 Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Plataforma Brasil para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	174
9.18 Parecer Consubstanciado do CEP da Plataforma Brasil para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	175
9.19 Parecer do Projeto de Doutorado do PPG – Bioquímica intitulado “Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) e sua relação com a imunomodulação” que foi associada ao projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	179
9.20 Plano de Seleção e Recrutamento de Participantes de Projetos de Pesquisa Desenvolvidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	182
9.21 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adultos do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	183
9.22 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	185
9.23 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Meio Eletrônico do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	187
9.24 Roteiro de Ligação Telefônica do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	189
9.25 Termo de Consentimento Informado (TCI) do Serviço de Hemoterapia – Doação de Sangue para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)	190
9.26 Artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período de doutorado.....	191

RESUMO

A estratificação de risco da leucemia linfocítica aguda B (LLA-B) comum infantil é baseada em fatores clínicos e biológicos e embora essa estratificação melhore o resultado clínico dos pacientes, a recidiva ocorre em um número significativo de casos. Sabe-se que a LLA-B apresenta heterogeneidade clínica e biológica e 50% dos pacientes não têm marcadores prognósticos definidos. Nesse sentido, a identificação de novos alvos terapêuticos, bem como de biomarcadores prognósticos e diagnósticos pode melhorar os resultados clínicos dos pacientes com LLA-B. A sinalização purinérgica é uma importante via na progressão do câncer. No entanto, a expressão de ectonucleotidases e seu impacto nas células imunes na LLA-B carece de exploração. Considerando diferentes coortes de pacientes com LLA-B comum infantil, a expressão gênica (*DPP4/CD38/ENTPD1/NT5E*) e proteica (*CD38/CD39/CD73*) de ectonucleotidases foram analisadas *in silico* e *ex vivo* e a associação com o prognóstico foi estabelecida (Capítulo 1); ainda, analisamos a expressão de ectonucleotidases em subpopulações linfocitárias de pacientes com LLA-B (Capítulo 2). Em análises univariadas, a expressão de *NT5E* foi significativamente associada a pior sobrevida livre de progressão (SLP) em amostras de medula óssea. Em análises multivariadas, análise de Kaplan-Meier e teste de log-rank, maior expressão de *NT5E* previu SLP desfavorável em amostras de medula óssea. Considerando a doença residual mínima (DRM), maior celularidade foi associada à alta expressão de *NT5E* no dia 8 da terapia de indução. Além disso, observamos que os leucócitos totais de pacientes com LLA-B infantil tinham mais CD38 em comparação com a mesma população celular de sujeitos saudáveis. De fato, pacientes LLA-B com DRM>0,1% apresentaram maior expressão de CD38 em leucócitos totais em comparação com sujeitos saudáveis. Observamos maior expressão de CD38 em leucócitos totais do que em blastos em pacientes LLA-B com DRM>0,1%; também comparamos pacientes LLA-B com sujeitos saudáveis e observamos um aumento de células T CD4⁺ e CD8⁺. Ainda, observamos uma diminuição na expressão de CD38 nas subpopulações de células B e Treg e um aumento na frequência de CD39⁺CD73⁺ em células Breg e T CD8⁺. Analisando citocinas e nucleosídeos/nucleotídeos de adenina, encontramos uma diminuição nas concentrações de TNF, IL-1 β e ADO, juntamente com um aumento de AMP no plasma de pacientes com LLA-B. Sugerimos que a expressão do gene *NT5E* e da proteína CD38, da família das ectonucleotidases, podem fornecer biomarcadores prognósticos interessantes para a LLA-B comum infantil; ainda, como imunomoduladores, a expressão das ectonucleotidases pode estar associada a estados de ativação, bem como à abundância de diferentes subconjuntos celulares. Observamos um perfil de expressão de imunidade pró-tumoral em pacientes com LLA-B no momento do diagnóstico, podendo estar associado à exaustão celular e evasão imune.

Palavras-chave: Leucemia linfocítica aguda B comum infantil, LLA-B, Ectonucleotidases, Imunomoduladores, Subpopulações linfocitárias, Prognóstico, *NT5E*, CD38

ABSTRACT

The risk stratification of common childhood B-acute lymphocytic leukemia (B-ALL) is based on clinical and biological factors. Although this stratification improves the clinical outcome of patients, relapse occurs in many cases. It is known that B-ALL has significant biological and clinical heterogeneity, and 50% of B-ALL patients do not have defined prognostic markers. In this sense, identifying new therapeutic targets and prognostic and diagnostic biomarkers can improve B-ALL patients' clinical outcomes. Purinergic signaling is an essential pathway in cancer progression; however, the expression of ectonucleotidases and their impact on immune cells in B-ALL lacks exploration. Considering different cohorts of common childhood B-ALL patients, gene (DPP4/CD38/ENTPD1/NT5E) and protein (CD38/CD39/CD73) expression of ectonucleotidases were analyzed *in silico* and *ex vivo*, and the association with prognosis was established (Chapter 1); furthermore, we analyzed the expression of ectonucleotidases in B-ALL patients' lymphocyte subpopulations (Chapter 2). In univariate analyses, expression of NT5E was significantly associated with worse progression-free survival (PFS) in bone marrow samples. In multivariate analyses, Kaplan-Meier analysis, and log-rank test, higher NT5E expression predicted unfavorable PFS in bone marrow samples. Considering minimal residual disease (MRD), higher levels of cellularity were associated with the high *NT5E* expression at day 8 of induction therapy. Furthermore, we observed that total leukocytes of common childhood B-ALL patients had more CD38 compared to the same cell population of healthy donors. B-ALL patients with MRD>0.1% had higher CD38 protein expression on total leukocytes in comparison to healthy donors. We observed higher CD38 expression on total leukocytes than blasts in B-ALL patients with MRD>0.1%; we also compared B-ALL patients to healthy donors and observed an increase of CD4+ and CD8+ T-cells. Furthermore, we observed a decrease in CD38 expression in B and Treg subpopulations and an increase in CD39⁺CD73⁺ frequency in Breg and CD8+ T-cells. Analyzing cytokines and adenine nucleosides/nucleotides, we found a decrease in TNF, IL-1 β , and ADO concentrations, and an increase in AMP in B-ALL patients' plasma. We suggest that *NT5E* gene and CD38 protein expression, of the ectonucleotidases family, could provide interesting prognostic biomarkers for common childhood B-ALL; as immunomodulators, the expression of ectonucleotidases might be associated with activation states, as well as the abundance of different cellular subsets. We observed a pro-tumor immunity expression profile in B-ALL patients at diagnosis might be associated with cell exhaustion and immune evasion in B-ALL.

Keywords: Common childhood B-acute lymphocytic leukemia, B-ALL, Ectonucleotidases, Immunomodulators, Lymphocyte subpopulations, Prognostic, *NT5E*, CD38

LISTA DE ABREVIATURAS

(c): Citoplasmático

4p15: Banda p15 do cromossomo 4

aa: Aminoácidos

ACRs: Regiões conservadas da apirase (*Apyrase conserved regions*)

ADO: Adenosina (*Adenosine*)

ADP: Adenosina difosfato (*Adenosine diphosphate*)

ADPR: adenosina difosfato ribose (*Adenosine diphosphate ribose*)

AMP: Adenosina monofosfato (*Adenosine monophosphate*)

APs: Fosfatase alcalina (*Alkaline phosphatases*)

ATP: Adenosina trifosfato (*Adenosine triphosphate*)

BCR: Região de ponto de quebra/interrupção (*Breakpoint cluster region*)

BFM: *Berlin – Frankfurt - Münster*

Breg: Linfócitos B regulatórios

cADPR: Adenosina difosfato ribose cíclico (*Cyclic adenosine diphosphate ribose*)

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico (*Cyclic adenosine monophosphate*)

c-CBL: *The Casitas B-cell lymphoma (CBL) gene encodes the E3 ubiquitin ligase*

CBL (also refereed to as c-CBL)

CD203a/ENPP1/NPP1: Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (*Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*)

CD38: ADP-ribosil ciclase/ ADP-ribose cíclico hidrolase/NAD⁺ glicohidrolase (*ADP-ribosyl cyclase/ cyclic ADP-ribose hydrolase/ NAD⁺ glycohydrolase*)

CD38: gene que codifica a ectonucleotidase CD38

CD39/NTPDase 1: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (*Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*)

CD73: Ecto-5'-nucleotidase

COG: *Children's Oncology Group*

CTLA-4: Antígeno 4 de linfócito T citotóxico (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)

DAMP: Padrão molecular associado ao dano (*Damage-associated molecular pattern*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DPP4: gene que codifica a proteína CD26

DRM: Doença residual mínima

Ecto-ADA: Ecto-adenosina desaminase (*Ecto-adenosine deaminase*)

ENTPDI: gene que codifica a ectonucleotidase CD39

ERK/MAPK: Quinases reguladas por sinais extracelulares/ proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Extracellular signal-regulated kinases/ mitogen-activated protein kinases*)

FAB: *French – American – British*

FISH: Hibridização fluorescente *in situ* (*Fluorescence in situ hybridization*)

G-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos (*Granulocyte colony-stimulating factor*)

GM-CSF: Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)

GPI: Glicosilfosfatidilinositol (*Glycosylphosphatidylinositol*)

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HLA-G: Antígeno leucocitário humano G (*Human leukocyte antigen G*)

HLA-I: Antígeno leucocitário humano de classe I (*Human leukocyte antigen class I*)

HLA-II: Antígeno leucocitário humano de classe II (*Human leukocyte antigen class II*)

IFN- γ : Interferon-gama

IgM: Imunoglobulina M

IL-1: Interleucina 1

IL-1 α : Interleucina 1 α

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

INO: Inosina (*Inosine*)

LF: Linfoma folicular

LICs: Células iniciadoras de leucemia (*Leukemia-initiating cells*)

LLA: Leucemia linfocítica aguda

LLA-B: Leucemia linfocítica aguda B

LLA-T: Leucemia linfocítica aguda T

LLC: Leucemia linfocítica crônica

LMA: Leucemia mieloide aguda

LMC: Leucemia mieloide crônica

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade (*Major histocompatibility complex*)

MM: Mieloma múltiplo

MPO: Mieloperoxidase

mRNA: RNA mensageiro

NAD⁺: Nicotinamida adenina dinucleotídeo (*Nicotinamide adenine dinucleotide*)

NAM: Nicotinamida

NK: Células *Natural Killers*

NPPs/E-NPPs: Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (*Ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*)

NT5E: gene que codifica a ectonucleotidase CD73

NTPDases/E-NTPDases: Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (*Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

P1: Receptor purinérgico metabotrópico para adenosina, dividido nos subtipos A1, A2A, A2B e A3

P2X: Receptor purinérgico ionotrópico para o ATP

P2Y: Receptor purinérgico metabotrópico para nucleotídeos

PAS: Ácido periódico de Schiff (*Periodic acid-Schiff*)

PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

PD-1: Proteína celular de morte programada-1 (*Programmed cell death protein-1*)

Ph+: Cromossomo *Philadelphia* anormal

PLC- γ : Fosfalipase C- γ (*Phospholipase C- γ*)

PNU: Polimorfismos de nucleotídeo único

RNA: Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)

RT-PCR: Reação da transcriptase reversa seguida de PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)

sIg: Reticulação de imunoglobulina de superfície (*Cross-linking of surface immunoglobulin*)

SLP: Sobrevida livre de progressão

SNC: Sistema nervoso central

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TCR: Receptor de células T (*T-Cell Receptor*)

TdT: Terminal desoxinucleotidil transferase

TGF- β : Fator de crescimento transformador- β (*Transforming growth factor- β*)

Th: Células T auxiliares (*Helper*)

Th1: Células T auxiliares (*Helper*) pró-inflamatórias definidas pela sua produção de IFN γ

Th17: Células T auxiliares (*Helper*) pró-inflamatórias definidas pela sua produção de IL-17

TIGIT: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domains*

TNF: Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

TNF-1 α : Fator de necrose tumoral-1 α (*Tumor necrosis factor 1 α*)

Treg: Linfócitos T regulatórios

VEs: Vesículas extracelulares

ZAP-70: Proteína quinase 70KDa associada a cadeia zeta (*Zeta chain-associated protein kinase of 70KDa*)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem representativa das células sanguíneas no sangue periférico de sujeitos saudáveis e de pacientes com leucemia. A principal característica da leucemia é a proliferação descontrolada e maturação anormal de células leucêmicas (blastos ou linfoblastos), que leva à diminuição da produção de células normais.....26
- Figura 2.** Imagem representativa das principais diferenças entre a classificação OMS e a classificação FAB (*French – American – British*).....28
- Figura 3.** Tratamento convencional da LLA-B.....31
- Figura 4.** Classificação FAB. Coloração de May-Grunwald-Giemsa.....34
- Figura 5.** 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.....35
- Figura 6.** Via canônica e não canônica de produção de adenosina.....54
- Figura 7.** Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidases: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) (CD39), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs), fosfatase alcalina (APs) e ecto-5'-nucleotidase (CD73).....55
- Figura 8.** Representação esquemática de parte do cromossomo humano 4, com atenção para localização do gene *CD38* e organização de seus éxons.....59
- Figura 9.** Conversão de NAD^+ em cADPR e ADPR.....60
- Figura 10.** ATP e ADO: Yin e Yang do sistema imunológico. ATP e ADO estão presentes nos tecidos ou no nicho tumoral em concentrações variáveis. A alteração do

equilíbrio entre esses dois metabólitos resulta em inflamação (alta concentração de ATP) ou imunossupressão (alta concentração de ADO). Ambos os extremos representam uma condição potencialmente prejudicial, considerando as consequências biológicas exercidas sobre as células do sistema imunológico.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas para os anos de 2020-2022 das taxas brutas e ajustadas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de leucemia (neoplasia maligna), segundo sexo e localização primária.....	29
Tabela 2. Classificação OMS das LLAs.....	36
Tabela 3. Distribuição da proteína CD38.....	61

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Ilustração esquemática representando a nossa hipótese de que são vários mediadores e moduladores imunológicos, bem como a abundância e o estado de ativação de diferentes tipos celulares que ditam em que direção o equilíbrio é inclinado, se anti- ou pró-tumoral.....114

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Introdução, Objetivos, Resultados, Discussão, Conclusões, Perspectivas, Referências Bibliográficas e Anexos.

A Introdução apresenta a fundamentação teórica que nos levou a formular as hipóteses propostas da tese, dispostas no item Objetivos.

Na seção Resultados estão expostos os resultados obtidos, descritos em formato de artigos científicos completos publicados.

A seção Discussão contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos.

A seção Conclusões aborda as conclusões gerais obtidas na tese.

Na seção Perspectivas estão expostas as sugestões de continuidade deste trabalho que poderão constituir novos projetos científicos, dando continuidade à linha de pesquisa.

A seção Referências Bibliográficas lista as referências utilizadas na redação dos itens Introdução e Discussão da tese.

A seção Anexos contém: Cartas de aprovação do GPPG/HCPA para os projetos 2018/0401 e 2022/0094; Termo de compromisso para utilização de dados institucionais do GPPG/HCPA para o projeto 2018/0401; Termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas do GPPG/HCPA para o projeto 2018/0401; Termo de compromisso para utilização de dados do GPPG/HCPA para o projeto 2018/0401; Acordo entre instituições sobre operacionalização,

compartilhamento, utilização do material biológico humano armazenado em biorrepositório do HCPA para o projeto 2022/0094; Declaração de conhecimento e cumprimento da lei geral de proteção de dados para pesquisa avaliadas pelo CEP/HCPA para o projeto 2022/0094; Formulários de delegação de funções do HCPA para os projetos 2018/0401 e 2022/0094; Folhas de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos da Plataforma Brasil para os projetos 2018/0401 e 2022/0094; Pareceres consubstanciados do CEP da Plataforma Brasil para os projetos 2018/0401 e 2022/0094; Parecer consubstanciado do PPG Ciências Biológicas: Bioquímica para o projeto intitulado “Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação” que foi associado ao projeto 2018/0401; Parecer consubstanciado do PPG Ciências Biológicas: Bioquímica para o projeto intitulado “Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) e sua relação com a imunomodulação” que foi associado ao projeto 2022/0094; Plano de seleção e recrutamento de participantes de projetos de pesquisa desenvolvidos no HCPA para o projeto 2022/0094; Termos de consentimento livre e esclarecido aplicado nos diferentes grupos (grupo controle, grupo controle – responsáveis, grupo pacientes LLA e grupo pacientes LLA – responsáveis) do projeto 2018/0401; Termos de consentimento livre e esclarecido aplicado nos diferentes grupos (adultos, responsáveis e meio eletrônico) do projeto 2022/0094; Roteiro de ligação telefônico do projeto 2022/0094; Termo de consentimento informado do Serviço de Hemoterapia – Doação de Sangue para o projeto 2022/0094; e lista de artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período do doutorado.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemia

A leucemia é uma doença que atinge as células do sangue, sendo considerada uma malignidade hematológica, cuja principal característica é a proliferação descontrolada e maturação anormal de células leucêmicas (blastos), que leva à diminuição da produção de células normais (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA, 2020) (Figura 1). Por terem origem em células constituintes do sangue, as leucemias têm capacidade inerente de proliferação e de mobilização na corrente sanguínea, culminando no extravasamento para outros tecidos (Whitehead et al., 2016).

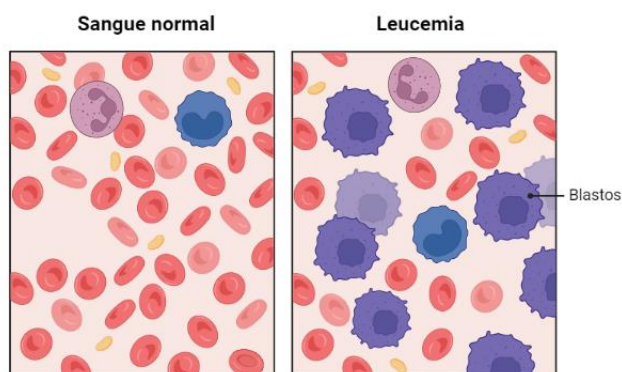


Figura 1. Imagem representativa das células sanguíneas no sangue periférico de sujeitos saudáveis e de pacientes com leucemia. A principal característica da leucemia é a proliferação descontrolada e maturação anormal de células leucêmicas (blastos ou linfoblastos), que leva à diminuição da produção de células normais [Imagem de autoria própria, 2023].

Embora em casos raros esteja associada a uma mutação hereditária e uma síndrome genética, como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom ou ataxia-telangiectasia, esse distúrbio geralmente ocorre como câncer esporádico, surgindo de uma mutação em uma célula somática previamente normal. A leucemia não é considerada uma doença genética clássica, mas pode ser chamada de doença genética, pois a etiologia subjacente primária tem demonstrado ser uma mutação do DNA,

especialmente rearranjos cromossômicos. A hematopoiese normal é um processo de diferenciação e maturação altamente regulado de uma célula-tronco hematopoiética para uma célula altamente especializada de linhagem mieloide ou linfóide. As células mielóides proliferam em suas células terminais maduras dentro da medula óssea, enquanto os precursores linfóides migram para os órgãos linfóides (por exemplo, linfonodos, baço e timo) para completar a maturação. Se uma aberração nas vias reguladoras confere uma vantagem proliferativa a uma célula mutante, o resultado final pode ser a apresentação clínica da leucemia (Y. Zhang & Rowley, 2013).

1.1.1 Classificação das leucemias

O grupo cooperativo *French-American-British* (FAB) classificou, primeiramente, as malignidades hematopoiéticas com base nas características morfológicas da população celular anormal (diâmetro celular, forma do núcleo, no número e na protuberância dos nucléolos e na quantidade e no aspecto relativos do citoplasma) em combinação com a apresentação clínica (Bennett et al., 1976). Com a expansão dos conhecimentos da oncogênese, em particular dos mecanismos genéticos na leucemia, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu na década de 90 e revisou um sistema de classificação universalmente aceito de neoplasias mielóides e linfóides em 2001 e 2008 (World Health Organization, 2001, 2009), de acordo com a linhagem de origem celular e a combinação de critérios morfológicos, imunofenotípicos, genéticos e clínicos (Y. Zhang & Rowley, 2013) (Figura 2).

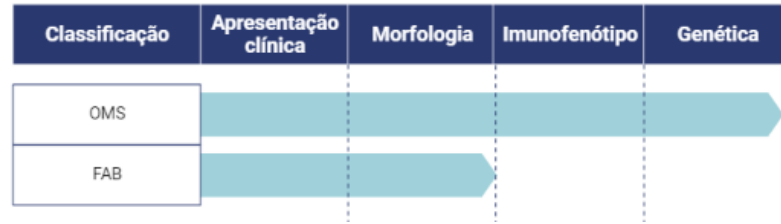


Figura 2. Imagem representativa das principais diferenças entre a classificação OMS e a classificação FAB (*French – American – British*). Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que estratificou as neoplasias mieloides e leucemias agudas de acordo com a combinação da morfologia, imunofenótipo, aspectos genético-moleculares e síndromes clínicas. Ela substituiu a antiga classificação FAB, que levava em consideração apenas morfologia das células neoplásicas e a apresentação clínica dos pacientes [Imagem de autoria própria, 2023].

O tipo de leucemia depende do tipo de célula sanguínea que se torna cancerosa: linhagem mieloide (podem incluir granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos) ou linhagem linfoide (corresponde às células B e T); e, de acordo com o estágio de diferenciação em que as células mutadas permanecem, o que caracteriza a doença em aguda ou crônica. As agudas progridem num curto espaço de tempo e as células neoplásicas são geralmente imaturas. Por outro lado, as crônicas progridem mais lentamente, podendo permanecer estacionárias, com células cancerosas difíceis de distinguir morfológicamente das células normais (INCA, 2020).

Assim, destacamos os principais tipos de leucemias: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) e leucemia linfocítica crônica (LLC) (INCA, 2020).

1.1.2 Leucemia no Brasil e no mundo

A estimativa mundial de 2018 mostra que ocorreram 249 mil casos novos de leucemia em homens, sendo a décima neoplasia mais incidente entre todos os cânceres, com um risco estimado de 6,5/100 mil homens. Para as mulheres, foram estimados 187 mil casos novos com taxa de incidência de 5,0/100 mil, ocupando a décima segunda

posição. As maiores taxas de incidência de leucemia para ambos os sexos são encontradas em países que apresentam altos níveis de desenvolvimento humano, como: Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e grande parte da Europa (Bray et al., 2018).

No Brasil, a leucemia em homens é o quinto câncer mais frequente na Região Norte (4,45/100 mil). Na região Nordeste (5,02/100 mil) ocupa a sétima posição, seguida pela Região Sul (8,34/100 mil) com a décima posição. Nas demais Regiões, Sudeste (5,70/100 mil) e Centro-Oeste (4,29/100 mil), é a décima primeira mais frequente. Para as mulheres, é a sexta mais frequente nas Regiões Sul (7,76/100 mil) e Norte (3,55/100 mil) do Brasil. Na Região Nordeste (4,06/100 mil), ocupa a décima posição. Na região Centro-Oeste (3,85/100 mil), é a décima primeira e, na Região Sudeste (4,15/100 mil), é a décima segunda posição mais frequente. Em relação à mortalidade, dados de 2017 mostram que ocorreram no Brasil 4.795 óbitos por leucemia, com uma taxa bruta de mortalidade de 4,75/100 mil em homens e 4.401 óbitos com uma taxa bruta de mortalidade de 4,25/100 mil em mulheres (INCA, 2020).

No Brasil, o número de casos novos de leucemia foi de 5.920 casos em homens e de 4.890 em mulheres para cada ano do triênio 2020-2022. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,67 casos novos a cada 100.000 homens e 4,56 para cada 100.000 mulheres (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas para os anos de 2020-2022 das taxas brutas e *ajustadas*^a de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de leucemia (neoplasia maligna), segundo sexo e localização primária * [Adaptado do INCA, 2020].

Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos											
	Homens						Mulheres					
	Estados			Capitais			Estados			Capitais		
	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada	Casos	Taxa Bruta	Taxa Ajustada
Leucemias	5.920	5,67	5,55	1.210	5,43	5,93	4.890	4,56	3,95	1.180	4,69	4,64

^aPopulação padrão mundial (1960)./*Números arredondados para múltiplos de 10.

1.1.3 Apresentação inicial das leucemias

A apresentação clínica inicial das leucemias abrange um amplo espectro de sinais e sintomas, muitos deles comuns em pacientes com outras enfermidades. Independentemente do tipo de leucemia, a apresentação mais frequente envolve sintomas correlacionados à insuficiência da medula óssea ou infiltração direta dos blastos leucêmicos em proliferação (Appelbaum, 2014). À medida que a anemia, trombocitopenia e/ou leucopenia se desenvolvem, as manifestações iniciais se correlacionam. Pacientes anêmicos podem se queixar de fadiga, dispneia, cefaleia ou dor torácica (Schumacher et al., 2002). Eles podem ter hematomas ou sangramentos (principalmente do nariz e das gengivas) como resultado da trombocitopenia. Até 60% das leucemias podem apresentar algum tipo de sangramento (Dixit et al., 2007). Os pacientes podem apresentar sintomas de disfunção de suas células imunológicas, mesmo no cenário de uma contagem de glóbulos brancos normal ou elevada. Isso pode ser evidente através de feridas na pele com cicatrização deficiente ou infecções recorrentes e, raramente, sepse neutropênica (Appelbaum, 2014). Manifestações gastrointestinais tendem a ser comuns, especialmente nas recidivas. Nódulos e úlceras podem ser encontradas não apenas na boca e áreas anorretais, mas também em qualquer lugar do trato gastrointestinal (Ebert & Hagspiel, 2012).

1.1.4 Tratamento convencional das neoplasias hematológicas

Para o tratamento das neoplasias hematológicas, como as leucemias, há protocolos terapêuticos específicos, bem como protocolos terapêuticos de suporte, igualmente importantes, não só para o controle da doença, mas também para o sucesso

do tratamento específico. Ambos os protocolos devem ser incluídos na terapia dos pacientes (S. H. Faderl & Kantarjian, 2008).

O tratamento específico das neoplasias hematológicas inclui a administração de diversos fármacos quimioterápicos, em sequências específicas de duração e dose. O objetivo do tratamento específico é erradicar a doença, restaurar a hematopoiese e impedir o desenvolvimento de células neoplásicas resistentes que poderão levar à recaída. Assim, o tratamento específico divide-se nas fases de indução, consolidação e manutenção a longo prazo. A profilaxia da invasão do sistema nervoso central (SNC) por células neoplásicas é outra fase relevante do tratamento e o transplante alogênico de células estaminais hematopoiéticas também poderá ser considerado em casos de elevado risco (S. H. Faderl & Kantarjian, 2008; Paul et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017) (Figura 3).

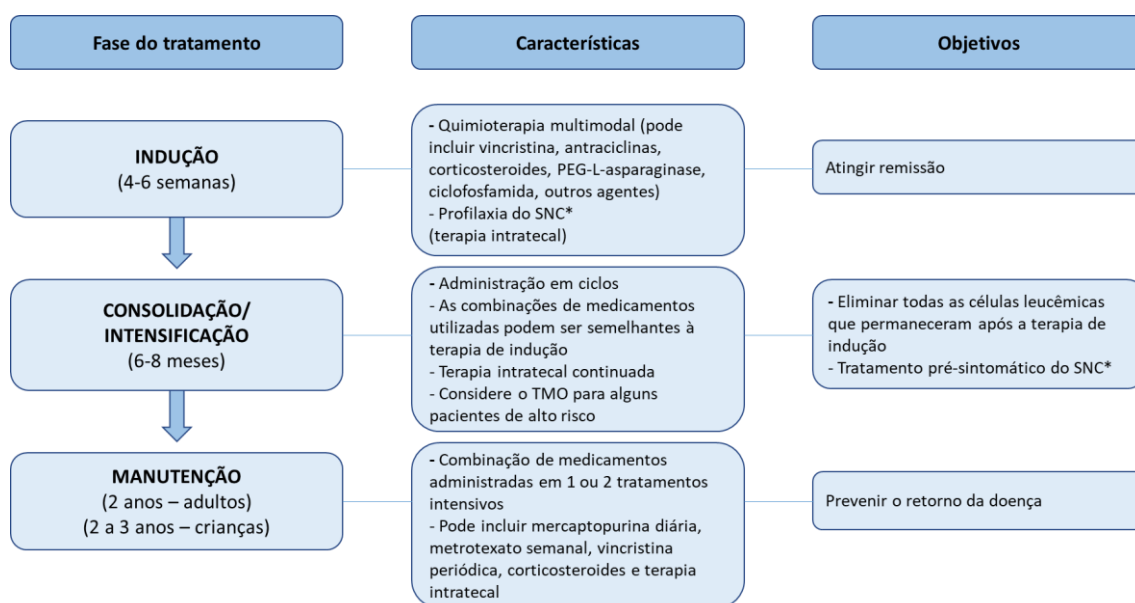


Figura 3. Tratamento convencional da LLA-B. A primeira fase do tratamento específico consiste na indução da remissão da doença e tem uma duração de 4 a 6 semanas. Esta fase combina intensiva quimioterapia para atingir a remissão. Os protocolos terapêuticos utilizados na fase de indução incluem uma associação de diversos fármacos. A maioria dos pacientes com LLA-B consegue atingir remissão da doença nesta fase; porém, faz-se necessário que os pacientes passem pelas demais fases terapêuticas para que seja considerado uma cura. A fase de consolidação/intensificação tem duração de 6 a 8 meses de quimioterapia intensiva, com

doses administradas próximas ao limite de tolerância do paciente. Tem como objetivo eliminar todas as células leucêmicas que permaneceram após a terapia de indução e o tratamento pré-sintomático do SNC. A fase de manutenção dura 2 anos para adultos e entre 2 a 3 anos para crianças e o objetivo é evitar a recaída da doença, prolongando a remissão [Imagem de autoria própria, 2023].

Pacientes com neoplasias hematológicas apresentam uma insuficiência medular, causado pela infiltração da medula óssea com células neoplásicas e pela terapêutica específica. Portanto, faz-se necessário uma terapia de suporte, incluindo prevenção da síndrome de lise tumoral e administração de hemoderivados (eritrócitos e plaquetas para o tratamento da anemia e trombocitopenia, respectivamente; e fatores de crescimento hematopoiéticos, como eritropoietina, G-CSF e GM-CSF) (S. H. Faderl & Kantarjian, 2008; Stanworth et al., 2013). A profilaxia emética (indica-se o uso de antagonistas dos receptores da serotonina, da neusoquinina-1 e da dopamina, benzodiazepinas, canabinóides e corticosteroides), bem como cuidados a nível psicológico, nutricional e da dor também fazem parte deste tratamento (Lohr, 2008; Feyer & Jordan, 2011).

Ainda, o controle das infecções fúngicas e bacterianas é muito importante no tratamento das neoplasias hematológicas, dado que constituem uma causa principal de morbidade e mortalidade. Como há um déficit imunitário inerente nas neoplasias hematológicas, observando-se hipogamaglobulinemia e neutropenia, o que potencializa mais o aparecimento de infecções (Gökbuget & Hoelzer, 2009; Baden et al., 2016). Nos protocolos para controle das infecções bacterianas, geralmente não está incluído o uso de antibióticos profiláticos, dado o risco de desenvolvimento de resistência. Assim, os antibióticos têm a sua utilização reservada para a profilaxia apenas em casos de elevado risco. Quanto às infecções fúngicas, também poderá ser feita profilaxia com a administração de determinados antifúngicos em casos de elevado risco. Ainda, faz-se

importante salientar que a administração concomitante de antibióticos, antifúngicos e quimioterápicos pode desencadear toxicidade, especialmente renal e hepática, podendo haver necessidade de adiar o tratamento específico por este motivo (Baden et al., 2016).

1.2 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

A Leucemia linfocítica (ou linfoide/linfoblástica) aguda (LLA) é uma doença hematológica maligna derivada das células linfoides indiferenciadas (linfoblastos) que estão presentes em grande número na medula óssea, no timo e nos gânglios linfáticos. Nesta neoplasia agressiva, há o acúmulo de linfoblastos em diferentes etapas da maturação, pois eles mantêm a capacidade de multiplicação, mas não de diferenciação até formas maduras e imunocompetentes (Farias & Castro, 2004). Acredita-se que a LLA se origina de várias lesões genéticas importantes nas células progenitoras do sangue que estão comprometidas em se diferenciar em células T ou B, incluindo mutações que conferem a capacidade de autorrenovação ilimitada e aquelas que levam à interrupção precisa do desenvolvimento em estágio específico (C.-H. Pui et al., 2004; Armstrong & Look, 2005). Em alguns casos, a primeira mutação pode surgir em uma célula-tronco hematopoiética que possui capacidade de desenvolvimento multi-linhagem (J. C. Y. Wang & Dick, 2005). As células implicadas na LLA têm rearranjos em seus genes de receptores, de imunoglobulinas ou células T e expressam moléculas de receptores, de antígenos e outras glicoproteínas de superfície celular, ligadas à diferenciação que recapitulam aquelas de células progenitoras linfoides imaturas nos estágios iniciais de desenvolvimento de linfócitos T e B normais (C.-H. Pui et al., 2004; Armstrong & Look, 2005).

1.2.1 Classificação da LLA

1.2.1.1 Classificação FAB

Até a década de 70 as leucemias agudas eram divididas em leucemias linfoides, não linfoides e monocíticas. Em 1976, foi lançada a classificação FAB baseada na morfologia dos blastos e nas reações enzimático-citoquímicas. A LLA foi classificada em L1 (células pequenas e homogêneas com 1-2 nucléolos discretos), L2 (células grandes com tamanho variável com 1-2 nucléolos) e L3 (células grandes, homogêneas, cromatina finamente pontilhada com citoplasma basofílico vacuolizado) (Figura 4). De acordo com essa classificação, a LLA também é definida pela presença de mais de 30% de linfoblastos na medula óssea ou no sangue periférico (Bennett et al., 1976).

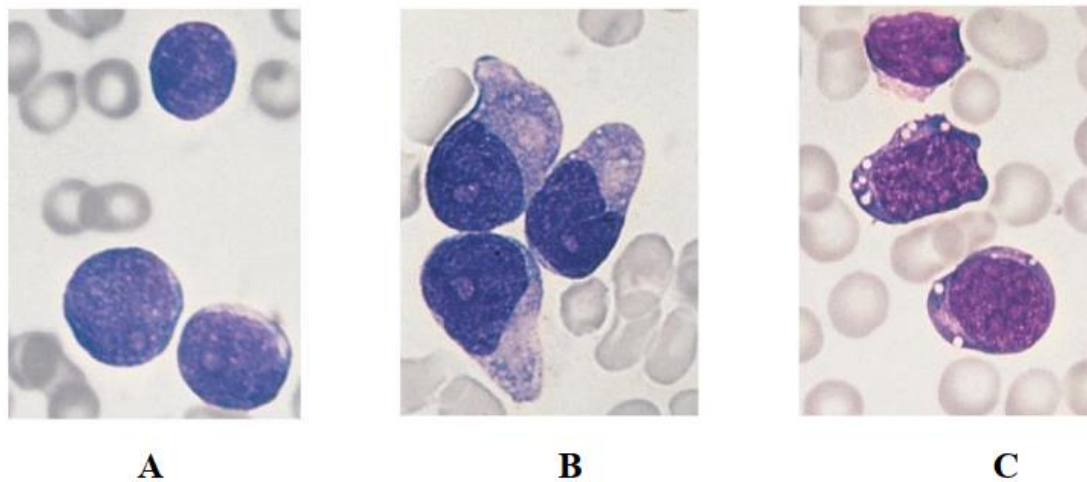


Figura 4. Classificação FAB. Coloração de May-Grunwald-Giemsa. Ampliação de 100x. (A) Linfoblastos L1. Amostra de sangue periférico, observando-se pequenos linfoblastos, com citoplasma escasso, núcleo regular e com nucléolo pequeno, nem sempre visível. (B) Linfoblastos L2. Aspirado de medula óssea, com linfoblastos heterogêneos, de tamanho superior aos anteriores (L1), com citoplasma abundante, núcleo irregular e nucléolo visível. (C) Linfoblastos L3. Amostra de sangue periférico, na qual são visíveis linfoblastos de tamanho médio, núcleo regular, nucléolo proeminente, citoplasma basófilo e com vacúolos [Imagem reproduzida e adaptada de Bain, 2017].

1.2.1.2 Classificação OMS

Na década de 90 surgiu uma classificação subsidiada pela OMS e atualizada em 2001 e 2008, que estratificou as doenças em diferentes categorias e as definiu de acordo com a combinação da morfologia, imunofenótipo, aspectos genético-moleculares e

síndromes clínicas. Dessa forma, este sistema torna-se útil não só para a classificação, mas também para o diagnóstico e escolha do protocolo terapêutico a seguir (Swerdlow et al., 2008).

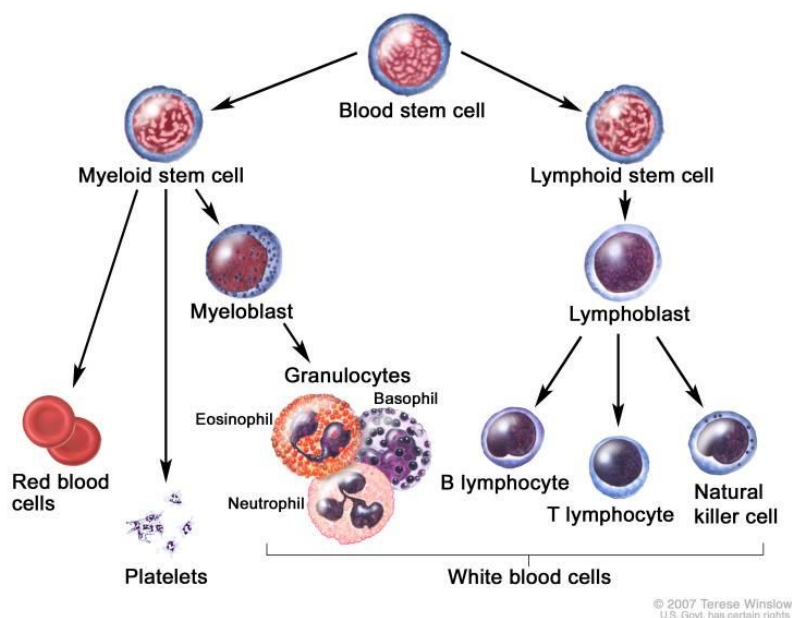


Figura 5. Desenvolvimento de células sanguíneas. Diferentes linhagens de células sanguíneas e imunes, incluindo linfócitos T e B, diferenciam-se de uma célula-tronco sanguínea comum. A LLA se origina nos linfoblastos T ou B na medula óssea [Imagem reproduzida de PDQ Pediatric Treatment Editorial Board, 2002].

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 imunofenotípicas dos linfoblastos, com denominação de leucemia linfoblástica do tipo T (LLA-T) ou B (LLA-B) (Cavalcanti Junior et al., 1997) (Figura 5). Uma contagem de blastos acima de 20% é necessária para o diagnóstico de leucemia aguda de acordo com esta classificação (World Health Organization, 2009). Ainda, a classificação da OMS subclassifica a LLA-B em LLA-B com anormalidades genéticas recorrentes e LLA-B sem outras especificações (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação OMS das LLAs [Adaptado de Terwilliger & Abdul-Hay, 2017].

<p>Leucemia linfoblástica B</p> <ul style="list-style-type: none">Leucemia linfoblástica B, sem outras especificaçõesLeucemia linfoblástica B com anormalidades genéticas recorrentes<ul style="list-style-type: none">Leucemia linfoblástica B com t(9;22)(q34.1;q11.2);<i>BCR-ABL1</i>Leucemia linfoblástica B com t(v;11q23.3); rearranjo <i>KMT2A</i>Leucemia linfoblástica B com t(12;21)(p13.2;q22.1);<i>ETV6-RUNX1</i>Leucemia linfoblástica B com hiperdiploidiaLeucemia linfoblástica B com hipodiploidiaLeucemia linfoblástica B com t(5;14)(q31.1;q32.3);<i>IL3-IGH</i>Leucemia linfoblástica B com t(1;19)(q23;p13.3);<i>TCF3-PBX1</i> <p>Leucemia linfoblástica T</p>

1.2.2 Epidemiologia da LLA

Embora a LLA possa ocorrer em qualquer idade, sua incidência é maior entre crianças de 2 a 5 anos numa porcentagem de cerca de 80% (Farias & Castro, 2004), voltando a crescer após os 50 anos de idade (Appelbaum, 2014). A LLA é a malignidade mais comum entre crianças menores de 14 anos, compreendendo a 26% dos novos diagnósticos de câncer nessa faixa etária (Siegel et al., 2021). Os avanços nos regimes de tratamento levaram a melhorias na sobrevida das crianças com LLA, com taxas atuais de sobrevida global em 5 anos superiores a 90% (Balliot et al., 2019). O Children's Oncology Group (COG) examinou os resultados da LLA infantil e observou que as taxas de sobrevida aumentaram de 83% para mais de 90% entre os anos 1990 a 2000 nos Estados Unidos (Salzer et al., 2010). Isso se aplica a todas as faixas etárias de crianças, com exceção de bebês com menos de um ano de idade (Sison & Brown, 2013). Apesar dos avanços, as taxas de recaída na LLA infantil ainda são de aproximadamente 20% (Hunger & Mullighan, 2015).

Entre adolescentes e adultos jovens, a incidência das leucemias agudas é de 20% (Farias & Castro, 2004), atingindo seus níveis mais baixos entre 25 e 45 anos (Malard & Mohty, 2020). A incidência da LLA volta a crescer após os 50 anos de idade (Falcão & Rego, 2002). Embora a maioria atinja a remissão completa devido à alta taxa de resposta à quimioterapia de indução, apenas 30-40% dos pacientes adultos com LLA alcançarão a remissão a longo prazo (Appelbaum, 2014; Jabbour et al., 2015). Apenas 25% dos pacientes com LLA acima de 50 anos vivem por 5 anos após o diagnóstico, destacando a importante disparidade entre as faixas etárias e a necessidade de melhorias no tratamento da LLA em pacientes adultos (Malard & Mohty, 2020).

A incidência geral da LLA é de 1 a 1,5 por 100.000 pessoas. Nos Estados Unidos, a incidência da LLA foi estimada em 1,57 por 100.000 pessoas em 2014; em 2016 foram diagnosticados cerca de 6.590 novos casos, com mais de 1.400 mortes (Terwilliger & Abdul-Hay, 2017); e em 2018 foram diagnosticados aproximadamente 5.960 novos casos e 1.470 mortes (Malard & Mohty, 2020). Em 2022, foram registrados 6.660 novos casos diagnosticados (3.740 em homens e 2.920 em mulheres) e 1.560 mortes (880 em homens e 680 em mulheres) (Siegel et al., 2022). A proporção entre homens e mulheres é de cerca de 1,2:1 (Malard & Mohty, 2020) e o risco é ligeiramente maior em brancos do que em afro-americanos (Siegel et al., 2022). A LLA é mais comum em populações hispânicas/latinas; assim, é na América do Sul que se verifica o maior número de casos desta neoplasia, destacando países como Equador, Costa Rica e Colômbia (Appelbaum, 2014; Lim et al., 2014).

A LLA do tipo B é a mais comum, ocorrendo em 85% dos casos diagnosticados, e apresenta uma igual incidência por sexo. Em contraste, os 15% dos casos restantes que são classificados como LLA do tipo T apresentam uma predominância masculina, com uma incidência que é cerca de duas vezes superior nos homens. De acordo com

um estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos, jovens diagnosticados com LLA-B têm maior possibilidade de sobrevivência do que aqueles que têm diagnóstico de LLA-T, enquanto que nos adultos ocorre o oposto (Dores et al., 2012).

1.2.3 Etiologia da LLA

A etiologia da LLA permanece desconhecida, porém alguns fatores de risco têm sido associados a esta patologia. A exposição a doses moderadas de 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 (benzeno, tolueno e pesticidas, particularmente os inseticidas para animais), drogas (melfalano, clorambucil, ciclofosfamida, antraciclina, actinomicina, epipodofilotoxinas, fenilbutazona e sulfimpirazona) 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 Klinefelter, Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Xeroderma pigmentoso e sua variante XP, Síndrome de Cockayne, Ataxia-telangiectasia, Neurofibromatose e Síndrome de Li-Fraumeni (German, 1995; Schumacher et al., 2002). Essas síndromes são caracterizadas pela ocorrência de defeitos nos mecanismos de reparação do DNA; porém explicam menos de 5% dos casos diagnosticados. Dentre elas, destaca-se a síndrome de Down, na qual os portadores apresentam um risco de desenvolver LLA cerca de 20 a 30 vezes superior à população em geral (Belson et al., 2007; Paul et al., 2016).

Polimorfismos genéticos também estão envolvidos na susceptibilidade às leucemias (C.-H. Pui et al., 2008). Os polimorfismos de nucleotídeo único (PNU) incluem-se nas mutações genéticas hereditárias. Alguns PNU foram encontrados nos genes: *ARID5B*, gene associado ao padrão da expressão gênica em linfoblastos neoplásicos; *IKZF1*, gene que codifica proteínas com função relevante no desenvolvimento da linhagem linfoide, bem como na supressão de tumores; *DDC*, gene que regula o desenvolvimento e maturação da série branca; e *CEBPE*, gene envolvido no desenvolvimento e diferenciação de várias linhagens celulares. Assim, as alterações destes genes, bem como a desregulação da sua expressão, poderá culminar no desenvolvimento de células anormais e, eventualmente, na ocorrência de neoplasias (Treviño et al., 2009; Y. Wang et al., 2013; Moriyama et al., 2015; Al-Absi et al., 2017; Studd et al., 2019).

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 (Ford et al., 1993; Mori et al., 2002). 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 à 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 (Kinlen & Stiller, 1993). 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 às utilizadas para tratamento da LLA. Estes picos de cortisol seriam capazes de eliminar o clone leucêmico (Schmiegelow et al., 2008).

1.2.3.1 Anormalidades genéticas recorrentes na população pediátrica

Aproximadamente 75% dos casos de LLA infantil apresentam anormalidades genéticas recorrentes, incluindo aneuploidias ou arranjos cromossômicos estruturais. Translocações t(9;22)(q34;q11) [BCR-ABL1], t(12;21) (p13;q22) [ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)], hiperdiploidia e translocação t(4;11)(q21;q23) [MLL-AFF1 (AF4)] em lactentes são encontradas com maior frequência na LLA-B infantil. Outras anormalidades citogenéticas recorrentes incluem hipodiploidia e translocação t(1;19)(q23;p13) [TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)] (Mullighan, 2012). Foram descobertas também alterações submicroscópicas adicionais de DNA, que afetam genes envolvidos na hematopoiese normal, supressão tumoral, apoptose e regulação do ciclo celular, incluindo *IKZF1*, *CRLF2*, *PAX5* e *FLT3* (Woo et al., 2014).

1.2.3.2 Mutações mais comuns associadas ao desenvolvimento da LLA-B

A elevada hiperdiploidia constitui um padrão de anormalidade citogenética bastante comum nesta leucemia, com mais de 51 e até 67 cromossomos que ocorre em 25-30% dos casos de LLA-B infantil, com maior frequência na faixa etária de 1 a 4 anos (Moorman, 2012). O aumento do cariótipo que não ocorre de forma aleatória pode envolver os cromossomos +X, +4, +6, +10, +14, +17, +18 ou +21 (Paulsson & Johansson, 2009; Paulsson et al., 2010). Este diagnóstico confere um bom prognóstico na LLA-B infantil (Paulsson & Johansson, 2009). Recentemente, alelos raros de *PRDM9* (que codifica uma histona H3 metiltransferase específica da meiose que controla a ativação de hotspots de recombinação) foram relatados como associados ao desenvolvimento de elevada hiperdiploidia e LLA-B infantil (Woodward et al., 2014).

Além disso, foi postulado que a atividade de *PRDM9* durante os estágios iniciais da meiose na linhagem germinativa parental poderia levar à instabilidade genômica e ao desenvolvimento de LLA-B infantil (Hussin et al., 2013).

A translocação $t(9;22)(q34;q11)$ ou ‘cromossomo Philadelphia’ (Ph+ LLA-B), codifica o gene de fusão *BCR-ABL1*. Essa translocação está presente em 3-5% dos casos de LLA-B infantil (Ribeiro et al., 1987) e está associada a idade avançada, maior contagem de leucócitos e envolvimento mais frequente do SNC no momento do diagnóstico (Crist et al., 1990). A translocação funde a sequência 5’ da região de ponto de quebra/interrupção (*BCR*) no cromossomo 22 com a sequência 3’ do gene *ABL1* no cromossomo 9. A oncoproteína resultante é uma tirosina quinase não receptora constitutivamente ativa, responsável pela leucemogênese. O uso de inibidores de tirosina quinase, como o imatinibe, combinado com quimioterapia intensiva melhora significativamente a sobrevida de crianças e adolescente com Ph+ LLA-B sem aumento apreciável na toxicidade (Schultz et al., 2009).

O rearranjo cromossômico mais comum na LLA-B é $t(12;21)(p13;q22)$, que codifica para *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*) (Mullighan, 2012). Ocorre em 25% das crianças com LLA-B e confere excelente prognóstico (Forestier et al., 2008; Moorman et al., 2010). Os fatores de transcrição *ETV6* e *RUNX1* são necessários para a hematopoiese normal (Okuda et al., 1996; L. C. Wang et al., 1997). Acredita-se que a proteína de fusão *ETV6-RUNX1* interrompa a expressão normal dos genes regulados por *RUNX1*, convertendo *RUNX1* em um repressor transcricional (Hiebert et al., 1996).

1.2.4 Apresentação inicial da LLA

A LLA pode se apresentar com linfadenopatia assintomática, hepatomegalia e esplenomegalia. No entanto, isso é menos comum na LLA do que em neoplasias

hematológicas mais indolentes e distúrbios mieloproliferativos (Kamimura et al., 2011). Sintomas prodrômicos como febre, sudorese noturna e perda de peso podem ocorrer; dores ósseas e articulares são menos comuns. A síndrome de lise tumoral espontânea, que é uma apresentação rara na leucemia, é mais provável de ocorrer na LLA-B do subtipo maduro. A infiltração do SNC ou meninges por linfoblastos é uma apresentação clínica mais frequente de recidiva de LLA, mas pode ser observada inicialmente na LLA-B do subtipo maduro. Hipercalcemia e lesões ósseas líticas, complicações mais comuns em tumores sólidos, são altamente suspeitas de LLA-T em adultos (Rose-Inman & Kuehl, 2017).

1.2.4.1 Apresentação inicial da LLA na população pediátrica

Em crianças, as manifestações musculoesqueléticas são uma característica única das leucemias agudas, com mais de um terço apresentando dor nos ossos ou na coluna, que em crianças não verbais pode não ser mais específica do que claudicação. Aproximadamente metade tem pelo menos uma anormalidade radiográfica, incluindo desmineralização difusa, erosão do osso cortical, lesão lítica ou fraturas patológicas (Stumpel et al., 2011).

A linfadenopatia da axila, virilha e pescoço é mais comum em crianças do que em adultos com leucemia, e embora resulte mais frequentemente de um processo reativo, qualquer linfadenopatia persistente deve levantar suspeita de malignidade (Stumpel et al., 2011). Com menos frequência, os médicos podem notar nódulos descoloridos azulados, que são suspeitos, mas não específicos de leucemia. Um nível mais alto de suspeita de malignidade deve ser considerado para sobreviventes de câncer infantil anterior; crianças com síndromes neurocutâneas, como neurofibromatose; ou certos distúrbios cromossômicos como a trissomia 21 (Rose-Inman & Kuehl, 2017).

1.2.5 Diagnóstico da LLA

1.2.5.1 Morfologia e citoquímica

A avaliação morfológica da medula óssea representa o primeiro passo na via diagnóstica da LLA, uma vez que a LLA sempre se apresenta com envolvimento da medula óssea (Lai et al., 2000). A citometria de fluxo representa a metodologia padrão-ouro para o diagnóstico, tanto para a identificação da linhagem celular quanto para a definição do subconjunto. A morfologia das células leucêmicas no sangue periférico pode ser significativamente diferente das da medula óssea (Chiaretti et al., 2014).

Do ponto de vista morfológico, não há critérios para distinguir LLA-B e LLA-T. Também pode ser difícil distinguir os linfoblastos da LLA-B dos precursores linfóides normais da linhagem B, conhecidos como hematogônias, que são observados no sangue periférico em várias condições, incluindo mielofibrose primária e, em crianças, na fase de recuperação após a quimioterapia. As hematogônias normalmente têm uma proporção nucleocitoplasmática ainda maior do que os linfoblastos, com cromatina mais homogênea e ausência completa de nucléolos visíveis. As hematogônias também podem expressar CD10 e serem caracterizadas pela aquisição e perda regular e ordenada de antígenos da linhagem B; elas também podem ser diferenciadas dos linfócitos maduros por sua fraca expressão de CD45 e, às vezes, pela expressão de CD34 (Sevilla et al., 2010).

A morfologia da medula óssea da LLA é, no entanto, bastante variável, conforme indicado anteriormente na classificação FAB. Citoquimicamente, os blastos têm reações de peroxidase negativas e positividade variável para o ácido periódico de

Schiff (PAS); Sudan black B às vezes é fracamente positivo (Stein et al., 1983). Por definição, os blastos LLA são negativos para mieloperoxidase (MPO) e outras reações citoquímicas mieloides. Linfoblastos podem reagir com esterases não específicas com forte positividade na zona Golgi com inibição variável com fluoreto de sódio. Os linfoblastos L3 da classificação FAB apresentam intensa positividade citoplasmática para verde de metilo pironina, enquanto os vacúolos coram fortemente com Oil red O, demonstrando assim seu conteúdo lipídico (Chiaretti et al., 2014). O papel da citoquímica na diferenciação da LLA é limitado, sendo estes testes substituídos pelos resultados da imunofenotipagem que são muito mais objetivos.

1.2.5.2 Imunofenotipagem

A imunofenotipagem, por meio da citometria de fluxo multicanal, tornou-se o procedimento padrão para diagnóstico da LLA e subclassificação; e também foi desenvolvido como uma ferramenta útil para a detecção e monitoramento da doença residual mínima (DRM). O consenso do *European Group for the Immunological characterization of Leukaemias* determinou que um limite de 20% deve ser usado para definir uma reação positiva de células blásticas a um determinado anticorpo monoclonal, exceto para MPO, CD3, CD79a e TdT, que são considerados positivos no nível de expressão de 10% (Bene et al., 1995; Béné et al., 2011). Mais recentemente, novas estratégias de citometria foram desenvolvidas pelo consórcio *EuroFlow* para garantir a reprodutibilidade dos testes diagnósticos (Kalina et al., 2012; van Dongen et al., 2012).

Por imunofenótipo, os linfoblastos B demonstram positividade universal para marcadores de células B, incluindo CD19, CD79a citoplasmático (c) e CD22 (c); assim como positividade para os marcadores CD22, CD24, PAX5 e terminal

desoxinucleotidil transferase (TdT); e com expressão variável de CD10, CD20 e CD34. LLA-B pode ser dividida 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, 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 μ 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 (Bain, 2017).

A LLA-T divide-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 (Cavalcanti Junior et al., 1997).

1.2.5.3 Avaliação citogenética/molecular

A caracterização das mutações cromossômicas e genéticas recorrentes na LLA, já abordadas nesta tese, assume um papel relevante no diagnóstico, na classificação, na previsão do prognóstico e na escolha do tratamento (Chiaretti et al., 2014). As principais técnicas empregadas nesta análise são a análise citogenética convencional, hibridização fluorescente *in situ* (FISH; *fluorescence in situ hybridization*), reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*) e reação da transcriptase reversa seguida

de PCR (RT-PCR; *reverse transcription polymerase chain reaction*) (Larson & Anastasi, 2008; Chiaretti et al., 2014).

A análise citogenética convencional permite a identificação de mutações cromossômicas, translocações e aneuploidias mediante observação microscópica dos cromossomos de células que se encontram em metáfase. Porém, dado que nem todas as células neoplásicas entram nesta fase mitótica, a dependência da divisão celular constitui uma limitação do método. Alternativamente, o método FISH é mais rápido e sensível que a análise citogenética convencional, pois dispõe de sondas marcadas que hibridizam com cromossomos metafásicos ou núcleos em interfase, sendo em seguida detectadas com fluorocromos. Quanto à avaliação molecular, os métodos PCR e RT-PCR também permitem detectar com alta sensibilidade e rapidez rearranjos genéticos específicos. Juntamente com a FISH, eles são especialmente relevantes nos casos em que não é possível encontrar células metafásicas analisáveis (Larson & Anastasi, 2008; Mrózek et al., 2009; Chiaretti et al., 2014).

1.2.6 Tratamento específico da LLA

1.2.6.1 Fase de indução

A primeira fase do tratamento específico consiste na indução da remissão da doença e tem uma duração de 4 a 6 semanas (Hunger & Mullighan, 2015). Esta fase combina intensiva quimioterapia para atingir a remissão, de forma a eliminar o maior número possível de blastos na medula óssea e, assim, permitir o reestabelecimento da hematopoiese normal (Paul et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

Os protocolos terapêuticos utilizados na fase de indução incluem uma associação de diversos fármacos: glicocorticoides, como dexametasona ou prednisona,

asparaginase e vincristina. De forma geral estes fármacos são os mais utilizados na rotina clínica e permitem aos pacientes alcançarem remissão em mais de 95% das crianças e em cerca de 80-90% dos adultos. Ainda, pode-se incluir nos protocolos terapêuticos o uso de uma antraciclina, como a daunorrubicina, doxorrubicina ou ciclofosfadina (Bassan & Hoelzer, 2011; Hunger & Mullighan, 2015).

Os glicocorticoides, primeiros fármacos a serem utilizados no tratamento da LLA, têm a capacidade de inibir a produção de citocinas, alterar a expressão gênica, induzir a parada do ciclo celular e causar apoptose (Inaba & Pui, 2010; Bassan & Hoelzer, 2011). A asparaginase é uma enzima que catalisa a hidrólise do aminoácido asparagina (aminoácido essencial para as células neoplásicas) em ácido aspártico, diminuindo a concentração de asparagina no soro. Assim, a depleção de asparagina leva à redução da síntese de DNA, RNA e proteínas nos blastos, o que culmina na morte celular. A adição da asparaginase nos protocolos terapêuticos pediátricos permite a obtenção de melhores resultados, sendo considerado um fármaco padrão nestes casos, ao contrário dos casos em adultos (Rizzari et al., 2013; Kawedia & Rytting, 2014).

A vincristina exerce seu efeito antineoplásico inibindo a formação dos microtúbulos no fuso mitótico, culminando em morte celular (Harnicar et al., 2009). E as antraciclinas exercem seu efeito anti-câncer não seletivo ao propiciar a formação excessiva de radicais livres, peroxidação lipídica dentro das membranas celulares, danos ao DNA e, finalmente, morte celular (Shandilya et al., 2020).

A maioria dos pacientes com LLA consegue atingir a remissão da doença nesta fase; porém, faz-se necessário que os pacientes passem pelas demais fases terapêuticas descritas a seguir para que seja considerado uma cura (Hunger & Mullighan, 2015).

1.2.6.2 Fase de consolidação/intensificação

A fase de consolidação/intensificação tem duração de 6 a 8 meses de quimioterapia intensiva, com doses administradas próximas ao limite de tolerância do paciente. Tem como objetivo eliminar quaisquer células neoplásicas que possam ter resistido ao tratamento de indução e impedir a disseminação da leucemia para o SNC. Portanto, é nesta fase que se administra a terapêutica profilática da invasão do SNC (Hunger & Mullighan, 2015; Paul et al., 2016). Os protocolos terapêuticos utilizados nesta fase incluem a administração de metotrexato em elevadas doses, mercaptopurina, citarabina, ciclofosfamida e os fármacos utilizados na fase anterior vincristina e asparaginase (Inaba et al., 2013; Hunger & Mullighan, 2015).

A presença de células leucêmicas residuais mensuráveis após a indução, bem como após a quimioterapia de consolidação, é um fator prognóstico bem estabelecido que prevê um maior risco de recaída e menor sobrevida em pacientes leucêmicos, independentemente de sua idade ou imunofenótipo de leucemia (Short et al., 2019; Contreras Yametti et al., 2021).

1.2.6.3 Fase de manutenção

A fase de manutenção dura entre 2 a 3 anos e o objetivo é evitar a recaída da doença, prolongando a remissão. O esquema terapêutico consiste na administração de mercaptopurina diária, metotrexato semanal e bolus mensais de corticosteroides e vincristina. Dada a longa duração do tratamento pode ocorrer diminuição da adesão, o que pode refletir em recaída (Hunger & Mullighan, 2015; Paul et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

1.2.7 Monitoramento da LLA

A DRM têm sido utilizada cada vez mais para monitorar a resposta ao tratamento da LLA. A DRM é definida como a detecção de células neoplásicas no sangue ou na medula óssea. Um consenso sobre o limiar e ponto (s) de tempo para avaliar a resposta à indução foi refinada por diferentes grupos de pesquisa nas últimas décadas. Quanto ao limiar, a maioria das evidências científicas estabelece a presença de apenas 0,01% de células neoplásicas para ser considerada positiva para a presença da DRM, recorrendo a técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo, PCR e sequenciamento de nova geração para proceder esta avaliação (Campana, 2010; Paul et al., 2016; Contreras Yametti et al., 2021). Como tempo inicial mais apropriado para avaliar a DRM, o COG, *St. Jude Children's Research Hospital* e AEIOP-BFM definiram que seria o período do fim da indução (Borowitz et al., 2008; Conter et al., 2010).

Valores abaixo dos estabelecidos para DRM, no final da fase de indução ou durante a consolidação do tratamento, indicam que o protocolo terapêutico pode ser reduzido. Ao passo que na presença de DRM persistente, pondera-se a intensificação do tratamento ou considera-se o paciente como possível candidato ao transplante alogênico de células estaminais hematopoiéticas. Ainda, quando a DRM é avaliada durante a fase de indução da remissão, o risco de recaída é, geralmente, proporcional ao nível de DRM detectado (S. Faderl et al., 2010).

Há fortes evidências que apoiam que a DRM tem importância prognóstica robusta e independente na LLA infantil e adulta, com significado clínico importante na estratificação de risco dos pacientes. Assim, esta análise torna-se também relevante no monitoramento e na escolha da abordagem terapêutica a ser utilizada (Campana, 2010; Paul et al., 2016).

1.2.8 Estratificação de risco na LLA infantil

Na LLA, grupos de risco são usados para planejar o tratamento, 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). Existem três grupos de risco na LLA infantil de acordo com o protocolo IC-BFM 2009: risco padrão, risco intermediário e risco alto. Tal sistema de classificação é baseado na idade do paciente no momento do diagnóstico, contagem de leucócitos, resposta precoce ao tratamento, alguns marcadores genéticos e/ou seus equivalentes moleculares, aneuploidias e avaliações de DRM baseado em citometria de fluxo. Ou seja, considerando a DRM, o paciente pode ser realocado em uma nova classificação de risco. O nível de DRM é avaliado nos dias 15, 33 e semana 12 (opcional) da fase de indução do protocolo terapêutico (Zawitkowska et al., 2020; Brum da Silva Nunes et al., 2022).

1.2.9 Sistema imunológico na LLA

1.2.9.1 Os mecanismos de evasão imune na LLA

Estudos têm demonstrado que tumores sólidos e líquidos compartilham mecanismos de evasão imune (Jiménez-Morales et al., 2021). Foi proposto que a LLA exibia tolerância imunológica porque as células leucêmicas não possuem ou apenas um subconjunto delas expressa moléculas acessórias coestimulatórias relevantes (CD80 e CD87), mostrando ativação deficiente de células T (Kebelmann-Betzing et al., 2001; Luczyński et al., 2006). Ainda, a carga relativamente baixa de mutações na LLA em comparação com outros tumores pode reduzir a produção de neoantígenos e induzir uma baixa resposta imunogênica (D'Amico et al., 2004; Y.-Y. Feng et al., 2017; Zamora et al., 2018). No entanto, a presença de linfócitos infiltrantes, como células T

CD8+, em pacientes pediátricos com LLA sugere uma resposta imune antitumoral potencialmente robusta (Zamora et al., 2019). Foi proposto que na LLA as células T antígenos-específicas não são adequadamente ativadas, em vez disso elas são deletadas ou anérgicas (inativas) na apresentação inicial do antígeno (D'Amico et al., 2004; Curran et al., 2017). Quanto a LLA-B, foi observado que as células B não funcionam como células apresentadoras de antígeno que, além da sua rápida disseminação, poderia afetar o início e a execução da imunidade antileucêmica por meio da não ativação de células T, o que pode promover imunossupressão e sobrevivência das células neoplásicas (Curran et al., 2017). Além disso, foi sugerido que a apresentação defeituosa do antígeno nas moléculas MHC de classe I está envolvida na evasão imune na LLA (Jiménez-Morales et al., 2021). Quanto a expressão e funcionalidade dos antígenos leucocitários humanos de classe I e II (HLA-I e HLA-II, respectivamente), foi descrito na LLA a regulação negativa ou perda da expressão da superfície celular de HLA-I, bem como alta resistência à morte mediada por células NK (Reusing et al., 2016; L. Liu et al., 2018). Também foi relatado na LLA, a ausência de expressão de HLA-II em células T leucêmicas e seu regulador transativador de classe II (Holling et al., 2004).

Como fatores que desregulam a vigilância imunológica na LLA, outros mecanismos foram propostos tais como: alterações na proporção de citocinas anti-/pró-inflamatórias, aberrações no imunofenótipo das linhagens linfoides, alteração da expressão dos *checkpoints* imunológicos, alta produção de fatores supressores por células T citotóxicas, anormalidades citotóxicas e outras populações de células com funções alteradas (Mannelli, 2016; Curran et al., 2017).

1.2.9.2 Medula óssea como microambiente tumoral e a evasão imune

A evasão imunológica se deve a mecanismos inerentes ao microambiente tumoral. Os blastos malignos mantêm uma estreita interação com as células normais dentro do nicho da medula óssea e remodelam funcionalmente e estruturalmente o microambiente da medula óssea para favorecer o desenvolvimento da LLA e promover a disseminação de blastos e induzir resistência à quimioterapia às custas da hematopoiese normal (Dander et al., 2021; Hong et al., 2021; Pastorczak et al., 2021). Alterações nas populações de células imunes no microambiente tumoral são mecanismos envolvidos na evasão imune por células leucêmicas. Já foi relatado que os blastos leucêmicos têm a capacidade de remodelar o microambiente tumoral durante a progressão da doença e promover a diferenciação de monócitos em monócitos não clássicos (Witkowski et al., 2020). No microambiente da medula óssea também já foi relatado uma diminuição nas células T citotóxicas e células NK, bem como um aumento nas populações de células imunossupressoras, como Tregs, macrófagos M2 e células supressoras derivadas da linhagem mielóide para apoiar um microambiente imunossupressor (Dander et al., 2021). A interação entre os blastos leucêmicos e os diferentes tipos celulares no microambiente têm sido associada a progressão da LLA (Shafat et al., 2017).

Os blastos da LLA também expressam moléculas de superfície compartilhadas com células-tronco hematopoiéticas e interagem com moléculas da matriz extracelular, fatores solúveis e citocinas para a promoção da LLA (Jiménez-Morales et al., 2021). As proteínas da matriz extracelular derivadas das células estromais mesenquimais, como a osteopontina e a periostina no nicho, estimulam a disseminação e proliferação da LLA. A matriz extracelular da medula óssea também representa uma barreira física que contribui para a evasão imune no nicho celular (Klamer & Voermans, 2014). Outra alteração importante no microambiente leucêmico é o aumento dos níveis de citocinas

anti-inflamatórias e imunossupressoras, como IL-10 e TGF- β e a alta expressão de PD-1 e TIGIT que contribuem para a progressão tumoral e evasão imune (Dander et al., 2021; Xu et al., 2021). IL-1, IFN- γ , TNF- α e HLA-G no microambiente da medula óssea podem induzir tolerância imunológica e então recorrência da LLA (Jiménez-Morales et al., 2021). Assim, direcionar o eixo das quimiocinas pode reduzir significativamente a carga tumoral na LLA (Hong et al., 2021).

A modulação do sistema imune é um fator que influencia a probabilidade de o paciente alcançar uma remissão bem-sucedida. Dessa forma, outro importante fator no truncado contexto imune-neoplásico é o sistema purinérgico (Sitkovsky & Lukashev, 2005; Deaglio, Dwyer, et al., 2007; Di Virgilio et al., 2009).

1.3 Sistema purinérgico: panorama geral

O metabolismo extracelular da adenosina trifosfato (ATP) nos seus metabólitos adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP), adenosina (ADO) e inosina (INO) é um processo rigorosamente regulado, devido ao importante papel do eixo ATP/ADO 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 ectonucleotidases. A conversão de ATP em AMP é predominantemente catalisada pela ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase 1 (NTPDase1, CD39), enquanto a ecto-5'-nucleotidase (CD73) catalisa a conversão de AMP a ADO. Assim, CD39 e CD73 atuam conjuntamente na conversão de ATP à ADO na chamada via canônica de produção de ADO. Existe uma via alternativa não canônica de produção de ADO, onde a ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 1 (ENPP1, NPP1, CD203a) converte a adenosina difosfato ribose (ADPR) ou ATP em AMP, que é posteriormente metabolizado em

ADO pela CD73. A ADPR é produzida a partir de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) por NAD-glicohidrolase (CD38). A enzima ecto-adenosina desaminase (ecto-ADA) complexada com a proteína CD26, converte ADO em INO, controlando a concentração de ADO no espaço extracelular (Horenstein et al., 2013; Chillemi et al., 2014) (Figura 6).

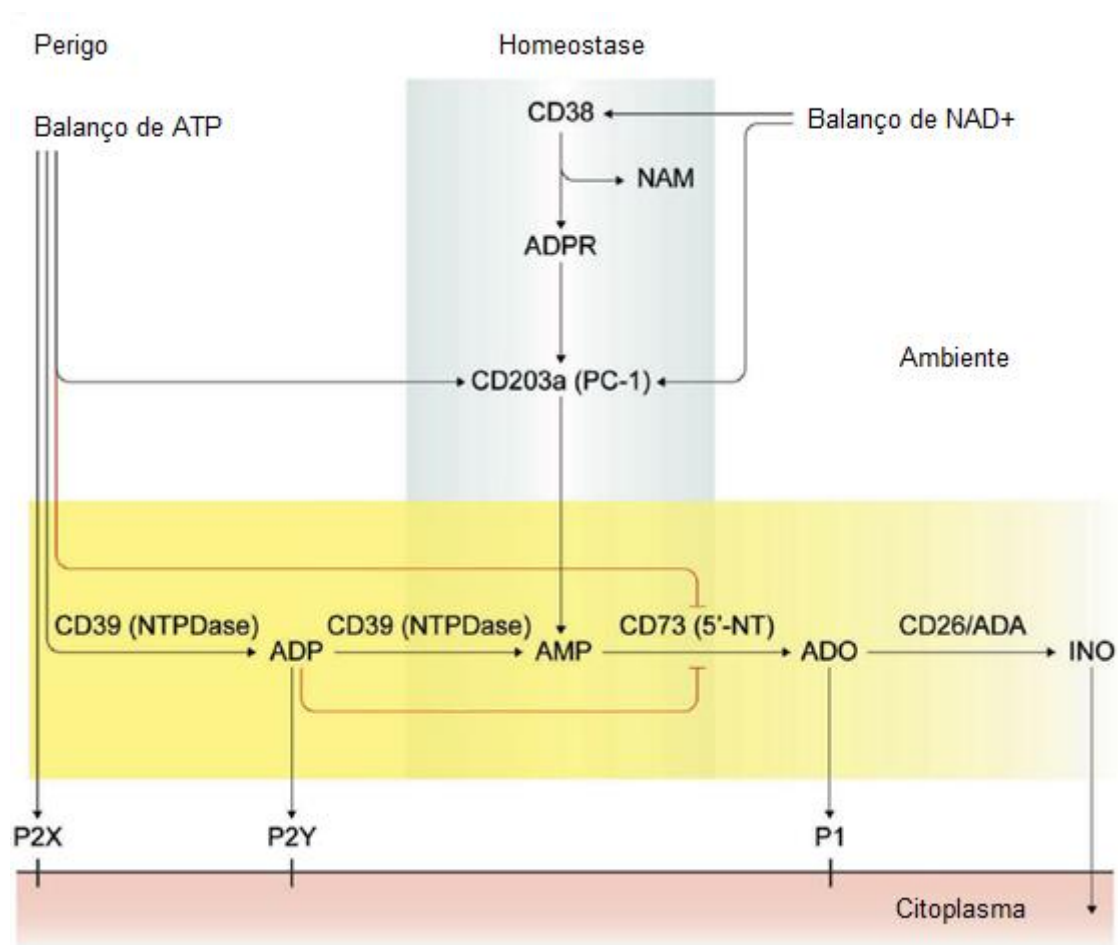


Figura 6. Via canônica (dentro do espaço amarelo) e não canônica (dentro do espaço azul) de produção de adenosina. Linhas pretas=ações positivas. Linhas vermelhas=ações negativas. NAM: nicotinamida; INO: inosina; P2X: receptor purinérgico 2X; P2Y: receptor purinérgico 2Y; P1: receptor purinérgico 1 [Imagem reproduzida e adaptada de Chillemi et al., 2014].

1.3.1 A família das ectonucleotidases

Os nucleotídeos liberados para o meio extracelular são hidrolisados até seus nucleotídeos/nucleosídeos correspondentes por meio da ação catalítica das

ectonucleotidasas (Yegutkin, 2008), as quais apresentam papel chave na regulação da sinalização purinérgica, controlando a concentração e o tempo em que estas moléculas sinalizadoras permanecem no meio extracelular (Lemmens et al., 1996; Zimmermann, 2000). As ectonucleotidasas encontram-se ancoradas à membrana plasmática ou às membranas intracelulares, com seu sítio catalítico voltado para o meio extracelular ou para o lúmen de organelas, respectivamente (Zimmermann, 2000). Estas enzimas incluem os seguintes membros: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases/E-NTPDases); ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs/E-NPPs); fosfatase alcalina (APs); ecto-5'-nucleotidase (CD73); e ecto-adenosina desaminase (ecto-ADA) (Zimmermann, 2000; Zimmermann et al., 2012; Burnstock, 2014) (Figura 7).

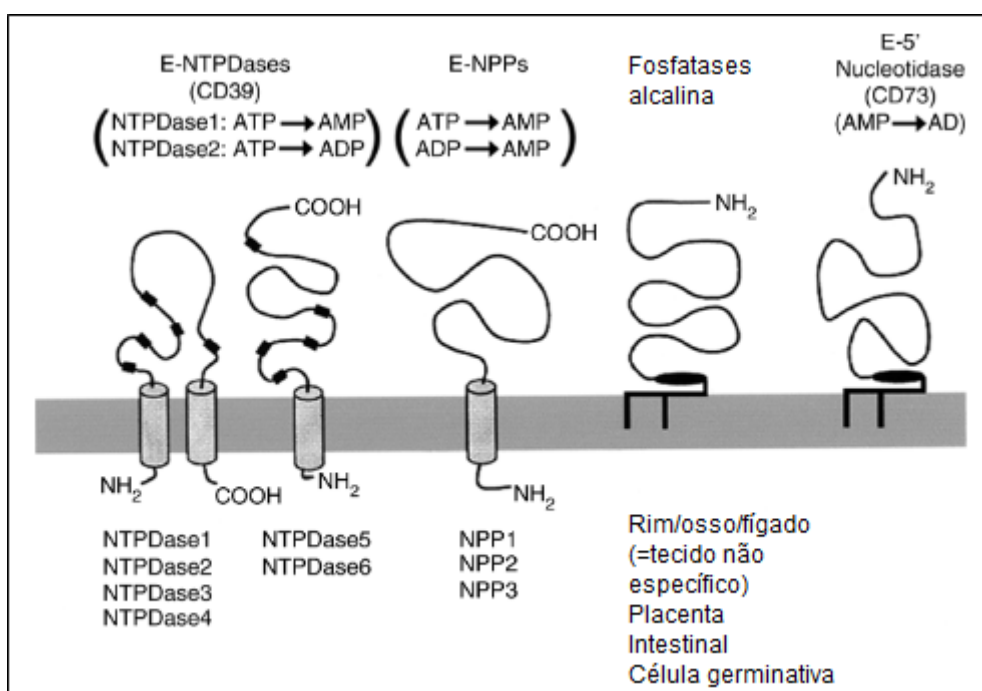


Figura 7. Topografia de membrana das principais enzimas representantes da família das ectonucleotidasas: ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (NTPDases) (CD39), ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (NPPs), fosfatase alcalina (APs) e ecto-5'-nucleotidase (CD73) [Imagem reproduzida e adaptada de Burnstock, 2014].

1.3.1.1 CD39 e CD73: Ectonucleotidasas da via canônica

A CD39/NTPDase1, codificada pelo gene *ENTPDI*, foi a primeira enzima descoberta e caracterizada da família das NTPDases, que compreende oito diferentes membros que diferem por suas propriedades catalíticas e por sua localização celular. Atividades fosfolíticas, distintas entre os membros da família das NTPDases, são devidas as diferenças substanciais em suas sequências, que refletem em diferenças estruturais secundárias, terciárias e quaternárias (Heine et al., 2001). Conseqüentemente, eles têm preferências distintas por substratos e cátions bivalentes, hidrolisam trifosfatos de nucleosídeos em taxas variadas e formam produtos diferentes. De uma forma geral, níveis micromolares de íons Ca^{2+} ou Mg^{2+} são absolutamente necessários para que essas ectoenzimas exerçam atividade máxima (Vaisitti et al., 2019).

CD39 é caracterizada pela sua capacidade de hidrolisar em taxas similares ATP e ADP, produzindo sequencialmente AMP (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin, 2014). A CD39 é uma enzima de superfície celular, ancorada à membrana plasmática por dois domínios transmembrana (N- e C-terminal), com o sítio catalítico voltado para o meio extracelular, sendo assim muito importante no controle dos níveis extracelulares de nucleotídeos (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008, 2014). O domínio transmembrana N-terminal sofre palmitoilação para permitir a associação da enzima com as âncoras lipídicas (Papanikolaou et al., 2005).

A CD39 apresenta cinco sequências idênticas, denominadas de regiões conservadas da apirase (ACRs), as quais estão relacionadas com o sítio ativo da enzima e com a atividade catalítica (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012). Para atingir a sua atividade catalítica máxima, essa enzima necessita de concentrações milimolares dos cátions Ca^{2+} e Mg^{2+} (com preferência de Mg^{2+} sobre Ca^{2+}) e de pH entre 7,0 - 8,5 (Yegutkin, 2008; Zimmermann et al., 2012; Yegutkin,

2014). A CD39 sofre modificações pós-traducionais, incluindo proteólise e glicosilação limitadas, sendo esta última determinante para conferir atividade catalítica a enzima (Zhong et al., 2001). A indução da expressão de CD39 é promovida após a exposição a citocinas pró-inflamatórias, estresse oxidativo e hipóxia (Allard et al., 2017).

O AMP é um produto intermediário da hidrólise do ATP que pode ser hidrolisado pela CD73. A CD73, codificada pelo gene *NT5E* (Minor et al., 2019), é a enzima responsável pela hidrólise de nucleosídeos monofosfatados em seus respectivos nucleosídeos e fosfato inorgânico, sendo considerada a principal fonte enzimática de adenosina no meio extracelular (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008, 2014). Esta enzima de aproximadamente 70 kDa é um homodímero que se encontra ancorada à membrana plasmática pela interação entre a cauda C-terminal e uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Ligado à sua estrutura N-terminal encontra-se um átomo de zinco e outros metais divalentes, o que a caracteriza como uma metaloenzima (Zimmermann, 2000; Yegutkin, 2008). A glicosilação pós-traducional, resultando em diferentes glicofomas, também foi relatada (Fini et al., 2003). Os homodímeros CD73 ciclam de conformação aberta e fechada para hidrólise eficiente de AMP (Knapp et al., 2012). IL-1 β , TNF- α e prostaglandina E2 mostraram aumentar a atividade de CD73 (Savic et al., 1990).

1.3.1.1.1 Expressão constitutiva de CD39 e CD73 nas células imunes

CD39 e CD73 são expressas em vários tipos de células constitutivamente: CD39 é expressa principalmente em células *natural killers* (NK) (entre 1-5%); monócitos (>90%); células dendríticas; células B (>90%); células T CD4+, incluindo células T de memória e Tregs (20-30%); e células T CD8+ (<5%) (Koziak et al., 1999; Dwyer et al., 2007). A CD73 é expressa em células mielóides, células estromais da medula óssea e

células epiteliais do timo (Resta et al., 1998). Em células B é expressa em aproximadamente 75% e nas células T CD8⁺ em aproximadamente 50%. Nas células T CD4⁺, incluindo Tregs, é expressa em cerca de 10% e nas células NK de 2-5% (Allard et al., 2017). Foi observado que as células NK podem expressar CD73 ao entrar em contato com células-tronco mesenquimais (Chatterjee et al., 2014). A co-expressão de CD39 e CD73 foi observada nas células B, Treg, Th17, células NK e células supressoras derivadas da linhagem mielóide (Ferretti et al., 2019).

1.3.1.2 CD38: Ectonucleotidase da via não canônica

A CD38 é constituída por uma única cadeia de 300 aminoácidos (aa) com um peso molecular de ~45kDa, sendo caracterizada por uma cauda citoplasmática curta (21aa), um pequeno domínio transmembranar (23aa) e um grande domínio extracelular (256aa). É uma glicoproteína compreendendo 2 a 4 cadeias de oligossacarídeos N-ligados contendo resíduos de ácido siálico. A estrutura geral da CD38 é estabilizada por seis pares de pontes dissulfeto (Malavasi et al., 2008). A grande maioria da proteína CD38 tem uma orientação de membrana do tipo II, com o sítio catalítico voltado para o exterior da célula. Além da estrutura de 45kDa, experimentos mostraram que a CD38 pode existir nas formas solúveis intra- e extracelulares (Quarona et al., 2013; Zimmermann, 2021) presente em fluidos biológicos em condições normais e patológicas (Funaro et al., 1996; Horenstein et al., 1998).

A CD38 é codificada pelo gene *CD38*, que foi mapeado para banda p15 do cromossomo 4 (4p15) como um gene de cópia única (Nakagawara et al., 1995). O gene *CD38* contém 8 éxons (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8), sendo que aproximadamente 98% do gene é composto por sequências intrônicas. O éxon 1 da CD38, maior éxon codificador, determina as regiões intracitoplasmática e transmembrana e parte da região extracelular

(Nata et al., 1997; Ferrero et al., 2000; C. Santos, 2019) (Figura 8). O controle da expressão de CD38 parece ser multifacetado (Ferrero & Malavasi, 1997; Kishimoto et al., 1998).

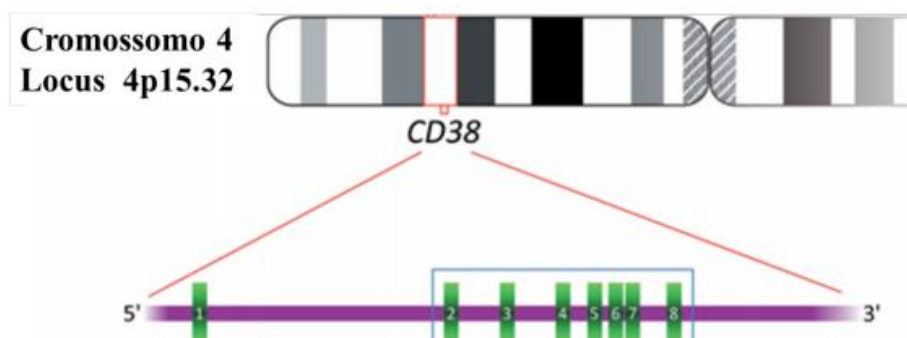


Figura 8. Representação esquemática de parte do cromossomo humano 4, com atenção para localização do gene *CD38* e organização de seus éxons [Imagem reproduzida de C. Santos, 2019].

CD38 é uma proteína de superfície celular dotada de funções receptoras e enzimáticas. Quanto as suas atividades receptoras, ela foi identificada pela primeira vez no ano de 1980 como um marcador de ativação e proliferação de linfócitos T humanos (Bhan et al., 1980). Ainda, evidenciou-se que a interação entre CD38 e CD31 é crucial para a migração de leucócitos através do endotélio (Deaglio et al., 1998), sendo esse *crosstalk* CD38/CD31 amplamente analisado em vários ambientes diferentes que variam de células T para B, células NK e mieloides, em condições normais e patológicas (Deaglio et al., 2000).

Mais tarde, demonstrou-se que a CD38 atua como enzima com atividades NAD⁺ glicohidrolase, ADP-ribosil ciclase e ADP-ribose cíclico hidrolase (H. C. Lee et al., 1993; Zocchi et al., 1993; Moreau et al., 2013) (Figura 9). A CD38 faz parte da rede ectoenzimática da via não canônica de produção de ADO, sendo responsável pela conversão de NAD⁺ em nicotinamida e ADPR (Morandi et al., 2019). Além disso,

CD38 catalisa a síntese de ADPR cíclico (cADPR) a partir de NAD^+ e catalisa a hidrólise de cADPR em ADPR. ADPR e cADPR são segundos mensageiros envolvidos na sinalização do cálcio intracelular (Hogan et al., 2019). A ligação desses produtos a diferentes receptores e canais influencia a regulação do cálcio e ativa vias de sinalização críticas (Aarhus et al., 1995).

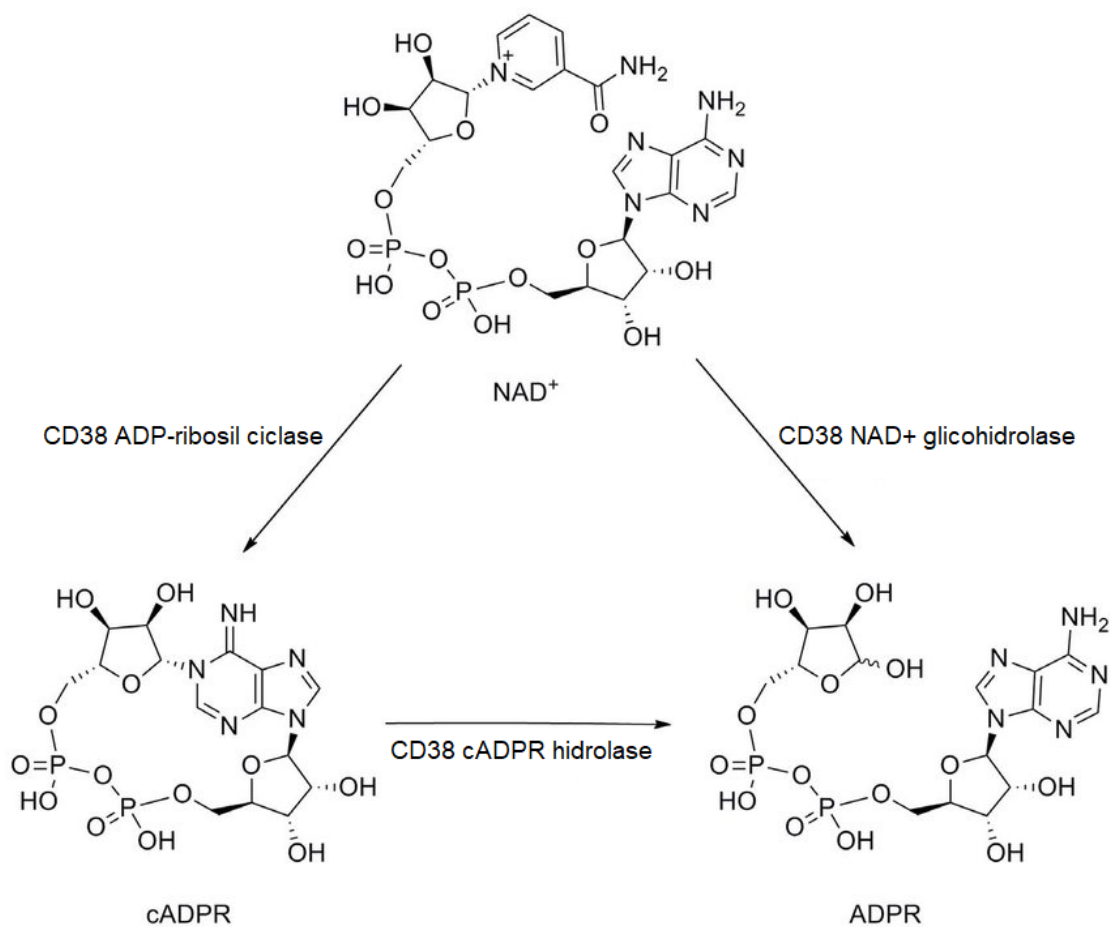


Figura 9. Conversão de NAD^+ em cADPR e ADPR [Imagem reproduzida e adaptada de Moreau et al., 2013].

1.3.1.2.1 Expressão constitutiva de CD38 nas células imunes

A expressão da proteína CD38 foi observada pela primeira vez em timócitos e linfócitos T (Bhan et al., 1980). Posteriormente, novos estudos levaram a uma noção revisada da distribuição da molécula e a expressão de CD38, pelo menos no sistema

imunológico, agora é considerada praticamente onipresente, mas com níveis de expressão variáveis (Malavasi et al., 2008; Quarona et al., 2013). A CD38 é expressa em células linfoides e mieloides, sendo também expressa em hemácias, plaquetas e plasmócitos saudáveis e malignos (Naik et al., 2019); seu nível de expressão varia com o estágio de maturação, o tipo de ativação e o meio em que ocorre a ativação (van de Donk et al., 2018). No entanto, vale ressaltar que o mecanismo de ação subjacente da expressão de CD38 em diferentes linhagens celulares ainda não está totalmente esclarecido. Na Tabela 3 estão resumidos dados sobre a distribuição da CD38 em tecidos linfoides.

Tabela 3. Distribuição da proteína CD38 [Adaptado de Malavasi et al., 2008].

Tecidos Linfoides	População celular
Sangue	Células T
	Células B
	Células mieloides
	Células NK
	Eritrócitos
	Plaquetas
Sangue do cordão umbilical	Células T e B
	Linfócitos e monócitos
Medula Óssea	Precursores de células plasmáticas
Timo	Timócitos corticais
Linfonodos	Células B de centros germinais

1.3.2 Sistema purinérgico e imunomodulação

Várias linhas de pesquisa sugerem que o microambiente tumoral é marcado pelo aumento do *turnover* de nucleotídeos extracelulares, como ATP ou NAD, e nucleosídeos como ADO, que atuam diretamente na imunomodulação de pacientes com neoplasias, bem como pelo aumento da expressão gênica e proteica de ectonucleotidases que os metabolizam (Ohta et al., 2006; Deaglio, Dwyer, et al., 2007; Pellegatti et al., 2008), que atuam indiretamente (Di Virgilio et al., 2009). Semelhante a outros mecanismos que são sequestrados para servir a propósitos pró-

tumorais, as células tumorais aproveitam a expressão dos nucleotídeos, nucleosídeos e ectonucleotidasas (Vaisitti et al., 2019). Dados emergentes indicam que os sistemas purinérgicos e adenosinérgicos não são apenas críticos na formação do microambiente tumoral em tumores sólidos, mas também em malignidades hematológicas, como a LLC (Serra et al., 2011, 2016).

O nicho linfoide é uma área dinâmica onde células cancerígenas, células imunes, fibroblastos, citocinas, fatores de crescimento e a matriz extracelular interagem mutuamente, resultando em crescimento e progressão tumoral, além de modificação de células circunstantes (Quail & Joyce, 2013). Se o acúmulo de ATP/ADO no meio extracelular será benéfico ou prejudicial para o hospedeiro, isso dependerá de três fatores importantes. O primeiro fator que vale ser mencionado é o painel de receptores expressos pelo tumor e células inflamatórias infiltrantes; porém, não será o foco deste trabalho. Os outros dois fatores que aprofundaremos com mais detalhes nesta tese são a concentração de nucleotídeos como resultado da liberação das células e, principalmente, a taxa de degradação de nucleotídeos e nucleosídeos por ectonucleotidasas (Vaisitti et al., 2018). Mesmo que os receptores purinérgicos tenham surgido como atores centrais no desenvolvimento, invasão e progressão do tumor, atuando não apenas nas células imunoinfiltrantes, mas também nas células cancerígenas, seu papel é um tanto controverso, embora amplamente explorado em trabalhos científicos (Stagg & Smyth, 2010).

Os níveis de nucleotídeos extracelulares aumentam em resposta à hipóxia e à isquemia, duas características definidoras do ambiente tumoral (V. Kumar, 2013; Petrova et al., 2018). No câncer, incluindo malignidades hematológicas, a superexpressão de ectonucleotidasas tem sido associada ao aumento do direcionamento para nichos protegidos, aumento da sobrevivência e proliferação,

bem como modulação das respostas imunes em direção à tolerância. Em alguns casos, as ectonucleotidases tornaram-se marcadores confiáveis para monitorar doenças e estratificar subconjuntos de pacientes ou alvos moleculares para novas estratégias de tratamento (Vaisitti et al., 2018).

1.3.2.1 Atuação direta dos nucleotídeos extracelulares e nucleosídeos na imunomodulação

Os nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares como ATP e ADO, respectivamente, representam uma importante e ubíqua classe de moléculas sinalizadoras que exercem diversos efeitos biológicos (Yegutkin, 2008). Atualmente, a visão na imunologia é que o ATP e o ADO representam um “Yin e Yang”: enquanto o ATP estimula o sistema imunológico agindo como um sinal de “encontre-me” que induz o recrutamento de células inflamatórias, a ADO embota essas respostas (Figura 10). Por esta razão, o ATP é considerado um sinal de perigo que ativa as respostas inflamatórias e que é neutralizado pela ADO, que fornece um poderoso sinal de parada, evitando dano tecidual excessivo (Trautmann, 2009).

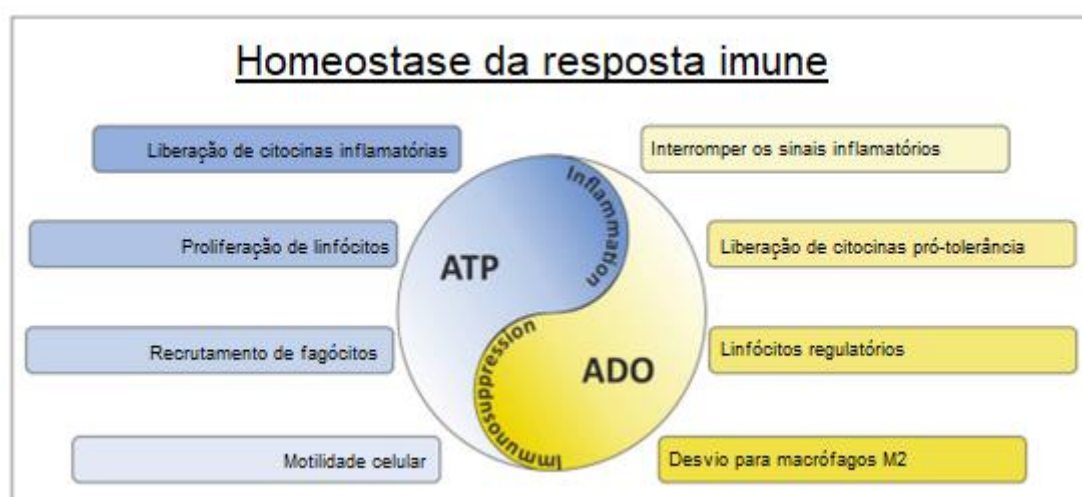


Figura 10. ATP e ADO: Yin e Yang do sistema imunológico. ATP e ADO estão presentes nos tecidos ou no nicho tumoral em concentrações variáveis. A alteração do equilíbrio entre esses dois metabólitos resulta em inflamação (alta concentração de ATP) ou imunossupressão (alta

concentração de ADO). Ambos os extremos representam uma condição potencialmente prejudicial, considerando as consequências biológicas exercidas sobre as células do sistema imunológico [Imagem reproduzida e adaptada de Vaisitti et al., 2018].

O ATP é um exemplo de nucleotídeo púrico que além de agir intracelularmente como molécula energética para manutenção celular, também age como uma potente molécula de sinalização no meio extracelular. O ATP se liga a múltiplos receptores purinérgicos tipo P2 (P2Y e P2X) e influencia o metabolismo celular, migração, proliferação e apoptose (Yegutkin, 2008; Burnstock & Verkhratsky, 2009). Os receptores P2Y metabotrópicos são acoplados via proteína G à mobilização de cálcio (Ca^{2+}), geração de cAMP e ativação da via MAPK/ERK (Abbracchio et al., 2006); e os receptores P2X ionotrópicos são canais iônicos homo/heterotriméricos que medeiam fluxos transmembranares de íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} (Surprenant & North, 2009; Coddou et al., 2011). O principal mecanismo de sinalização utilizado por esses receptores é a alteração da concentração iônica intracelular. Praticamente todos os tipos de células expressam um ou mais receptores purinérgicos (Burnstock & Knight, 2018), incluindo células tumorais (Burnstock & Di Virgilio, 2013). O ATP pode ser liberado no espaço extracelular através de diferentes mecanismos, incluindo canal de membrana plasmática e lise; independentemente do mecanismo utilizado, os efeitos funcionais finais são consequência da célula-alvo e dos receptores aos quais o ATP se liga (Vaisitti et al., 2018).

O ATP é conhecido como um sinal de dano ou padrão molecular associado ao dano (DAMP) (Di Virgilio, 2005) e uma vez liberado, a imunidade inata é capaz de detectá-lo, contribuindo para o desencadeamento da resposta inflamatória (Mariathasan & Monack, 2007). O ATP pode conduzir a inflamação quando liberado em altas concentrações e de forma aguda, em condições de estresse ou dano celular (Yegutkin,

2014), no meio extracelular atuando como um sinal capaz de recrutar fagócitos para locais inflamatórios, promovendo a eliminação de células danificadas (Elliott et al., 2009). Porém, os resultados podem ser diferentes quando as células são expostas de forma intermitente a aumentos lentos e crônicos em seus níveis extracelulares; sob essa condição, os efeitos do ATP podem ser mais sutis e, dependendo das células, moldam as respostas imunes em direção à tolerância e à não responsividade ao invés da reatividade celular. Portanto, o ATP se comporta como um mediador imunológico clássico, com seu papel dualístico, da inflamação e da imunidade (Di Virgilio et al., 2009). Fisiologicamente, o ATP pode ser degradado para ADO que neutraliza os seus sinais representando assim um potente imunossupressor (Gessi et al., 2007).

Já a ADO pode ser captada pelas células para reconstituir o pool de nucleotídeos, ou pode provocar potentes respostas imunossupressoras e anti-inflamatórias, mediadas pela interação com uma família de receptores purinérgicos do tipo P1 acoplados a proteína G (A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃) (Sitkovsky & Lukashev, 2005), que estão ligados à mobilização de cálcio dos estoques intracelulares ou aumento do cAMP. A sinalização via cAMP é tipicamente associada a imunossupressão significativa (Ohta & Sitkovsky, 2001; Ohta et al., 2006), enquanto a inibição da geração de cAMP após o envolvimento de P1 é geralmente vista como um mecanismo imunoestimulante (Butler et al., 2012). Todos os receptores para ADO se acoplam às vias das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (Hoskin et al., 2008). Cada receptor exhibe diferentes afinidades para ADO com A₁, A_{2A} e A₃ respondendo a baixos níveis de ADO (250-700nM), representando receptores de alta afinidade. Já o A_{2B} é um receptor de baixa afinidade cuja ativação ocorre apenas em condições patológicas, onde a ADO se acumula em alta concentração (25µM) (de Lera Ruiz et al., 2014).

A ADO pela ativação do receptor A2A e consequente elevação dos níveis de cAMP intracelular, desempenha papel importante na inibição das funções efetoras das células T ativadas (Huang et al., 1997; Armstrong et al., 2001). Além disso, 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 (Th1) (Deaglio, Dwyer, et al., 2007). De fato, a ADO atua através de um *feedback* negativo para inibir a hiperativação das células imunes (Ramakers et al., 2012; Eltzschig et al., 2012). Portanto, ADO favorece a expansão do câncer por meio da criação de um ambiente imunotolerante e de suporte ao tumor.

O eixo NAD⁺/ADO é um ponto de verificação que determina se o ambiente extracelular é pró-inflamatório (respostas mediadas por nucleotídeos) ou anti-inflamatório (respostas mediadas por nucleosídeos). O substrato NAD⁺, que desencadeia a via não canônica de produção de ADO pode influenciar o sistema imunológico ao mudar o balanço de sinais ativadores (mediados por P2) para supressores (mediados por P1) (Horenstein et al., 2013). Já foi observado, na patogênese de doenças autoimunes que essa capacidade de mudar a balança de sinais pode ser alterada em subconjuntos específicos de linfócitos (Pavón et al., 2013). Além disso, o NAD⁺ atua como imunomodulador para linfócitos T humanos (Ziegler, 2000; Grahnert et al., 2011) e células Treg (Hubert et al., 2010).

1.3.2.2 Papel das ectonucleotidases CD38, CD39 e CD73 na imunomodulação

Nas células B, a expressão de CD39 foi descrita como um marcador de ativação celular (Maliszewski et al., 1994), bem como contribui para a maturação da afinidade da resposta do anticorpo e para a diferenciação das células B do centro pós-germinal

(Dwyer et al., 2007). Já a expressão de CD73 e a produção de adenosina estão envolvidas na recombinação de troca de classe nas células B (Schena et al., 2013). Como as células B humanas co-expressam CD39 e CD73, bem como receptores de adenosina, elas acabam se beneficiando da ADO gerada por meio de um mecanismo autócrino. A ativação dos receptores de adenosina favorece a expansão e as funções das células B produtoras de ADO. Além disso, a ADO gerada pelas células B influencia o comportamento das células T vizinhas (Saze et al., 2013). Observou-se também que a expressão de ectonucleotidases está associada à alta capacidade proliferativa de células Tregs e ao aumento da secreção de IL-10 e IL-6, que por sua vez potencializam a atividade imunossupressora em relação as células T (Figueiró et al., 2016).

Nas células T, geralmente a expressão de CD39 está associada à aquisição de um fenótipo imunossupressor e maior suscetibilidade à apoptose e ao estresse metabólico, representando, portanto, um mecanismo de controle da expansão dos linfócitos T citotóxicos (Bai et al., 2015; Fang et al., 2016; Noble et al., 2016). Por outro lado, a expressão de CD73 diminui com a ativação das células T, embora a expressão de CD73 seja alta em condições de inflamação crônica, onde se associa a um fenótipo de células T de memória (Doherty et al., 2012). A descoberta de que CD39 e CD73 são co-expressos em células Tregs destacou o papel central dessas ectonucleotidases na condução da supressão imunológica por meio da geração de ADO (Deaglio, Dwyer, et al., 2007). Estudos sugeriram que a expressão de CD39 em Tregs suprime a produção de IL-17, impedindo a trans-diferenciação de Tregs em Th17 ou dotando células Th17 já diferenciadas com um fenótipo imunossupressor (Fletcher et al., 2009; Longhi et al., 2014). Ao contrário de CD39, CD73 está presente apenas em uma pequena proporção de Tregs circulantes, mas pode ser induzido mediante ativação e em condições de hipóxia (Stagg et al., 2011). Também foi proposto que as Tregs recebem ADO por meio

de interações parácrinas com células vizinhas que expressam CD73 ou por meio de trocas mediadas por exossomos (Schuler et al., 2014). A ADO, por sua vez, modula as funções das Tregs promovendo sua proliferação e aumentando a expressão de CTLA-4 e PD-1, aumentando assim o potencial imunossupressor (Ohta et al., 2012).

CD38 é altamente expresso em precursores de células T e em timócitos duplo-positivos CD4+CD8+ (Tenca et al., 2003). Em contraste, as células T maduras têm baixos níveis de CD38, mas após a ativação mitogênica elas regulam positivamente sua expressão (Malavasi et al., 1992; Shubinsky & Schlesinger, 1997; Deterre et al., 2000). Da mesma forma, os progenitores de células B humanas têm CD38 de superfície, enquanto os linfócitos B maduros e virgens têm baixa expressão de CD38 (Campana et al., 2000; Deterre et al., 2000). A ativação de linfócitos B maduros e virgens induz a re-expressão de CD38, que tem sido usado para descrever um estágio de ativação de linfócitos B que origina uma reação no centro germinativo (Y. J. Liu & Arpin, 1997). CD38 também tem sido implicado na maturação, proliferação e produção de citocinas de células T e B, principalmente através da ativação de cascatas de sinalização intracelular que incluem a fosforilação de Zap70, c-CBL, PLC-gamma, PI-3K e MAPK (Romero-Ramírez et al., 2015). Nos linfócitos T, CD38 localiza-se na sinapse imune em contato próximo com o receptor da célula T (TCR); observações semelhantes de uma localização crítica de CD38 também foram relatadas para linfócitos B, monócitos e células NK (Deaglio et al., 2002; Zubiaur et al., 2002; Frasca et al., 2006; Deaglio, Vaisitti, et al., 2007). As implicações funcionais dessas interações permanecem em grande parte desconhecidas, mas é concebível que CD38 possa estar atuando, de alguma forma, como um reforço de sinalização, fornecendo o aumento adicional nos níveis intracelulares de Ca^{2+} que pode ser necessário para induzir ou manter a sinalização

mediada por receptores. Além disso, CD38 aparece como um mediador crítico da quimiotaxia e do *homing* das células imunes (Vaisitti et al., 2019).

1.3.3 Expressão de CD38, CD39 e CD73 no contexto das neoplasias hematológicas

CD38 é expresso em várias neoplasias hematológicas, incluindo LLA-B (Keyhani et al., 2000), LLA-T (L. Wang et al., 2015), LMA (Keyhani et al., 2000), linfoma de células do manto (Parry-Jones et al., 2007) e LLC (Malavasi et al., 2011). Ainda, a superexpressão de CD38 em plasmócitos malignos torna CD38 um alvo ideal para a imunoterapia no mieloma múltiplo (MM) (van de Donk et al., 2018; N. Yu et al., 2021). Anticorpos contra CD38 estão, atualmente, em estudos clínicos para o possível tratamento de leucemias e outras condições patológicas. Quanto a regulação gênica, já foi evidenciado que a regulação positiva do gene *CD38* está associada a um bom prognóstico em leucemias agudas em adultos (Keyhani et al., 2000).

Na LLA de pacientes adultos não tratados já foi relatado a expressão de CD38 como um preditor positivo do resultado da doença, onde os níveis de CD38 se correlacionam com remissão completa e sobrevida global prolongada e representam um marcador prognóstico positivo independente (Keyhani et al., 2000). Também já foi relatado que a recidiva de pacientes LLA Ph+ se deve à persistência de células iniciadoras da leucemia (do inglês, LICs), uma população CD38- auto-renovável, capaz de iniciar a leucemia humana em camundongos imunodeficientes (Kong et al., 2008; Valent et al., 2012; Kong et al., 2014). Foi observado na LLA infantil que uma alta proporção de LICs CD38- se correlacionava negativamente com o resultado da doença e, portanto, pode representar um marcador útil para a estratificação de risco dos pacientes (Long et al., 2014).

Anticorpos contra CD39 estão, atualmente, em estudos clínicos para o possível tratamento de tumores sólidos (NCT05075564 e NCT05381935). Ainda, CD39 pode contribuir para a imunossupressão na LMA (Dulphy et al., 2014) e MM (Brauneck et al., 2021) impactando na disfunção e exaustão das células T. Anticorpos contra CD73 estão, atualmente, em estudos clínicos para o possível tratamento de tumores sólidos (NCT05143970, NCT05431270, NCT04572152 e NCT05174585) e COVID-19 (NCT04516564); além disso, estudos demonstram o potencial da CD73 na imunidade antileucêmica na LMA (Kong et al., 2019). Quanto a regulação gênica, já foi evidenciado que a regulação positiva dos genes *ENTPD1* e *NT5E* está ligada a um prognóstico ruim em muitos cânceres, incluindo LLA-B, carcinoma gástrico, adenocarcinoma retal e carcinoma urotelial (Lu et al., 2013; Abousamra et al., 2015; B. Zhang et al., 2015).

Em uma análise de todo o genoma que comparou 270 pacientes com LLA recém-diagnosticados com progenitores de células B normais, CD73 foi identificado como diferencialmente expresso, tanto no transcrito quanto a nível proteico (Couston-Smith et al., 2011). CD73 foi identificado, por citometria de fluxo, como um marcador útil para monitorar a DRM. Especificamente, CD73 é regulado positivamente em precursores de células B de pacientes com LLA e sua expressão não é modulada negativamente após o tratamento, tornando-o um marcador para identificar células leucêmicas residuais resistentes a terapia e potencialmente responsáveis por futuras recaídas (W. Wang et al., 2016; Şedek et al., 2019).

2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Apesar de já existirem marcadores imunofenotípicos predefinidos nos painéis diagnósticos para a LLA-B, ainda há uma grande necessidade de novos biomarcadores prognósticos para serem incluídos na rotina laboratorial, visto que 50% dos pacientes com LLA-B não possuem marcadores prognósticos definidos devido a significativa heterogeneidade biológica e clínica da doença. A combinação de diversos fatores prognósticos pode possibilitar predições individualizadas e mais acuradas, bem como nortear as melhores opções terapêuticas se aproximando de terapias personalizadas. Também se faz necessário entender as complexas e dinâmicas interações entre o microambiente tumoral e as células imunes, bem como o papel das ectonucleotidases na LLA-B. Nesse contexto, acreditamos que a expressão das ectonucleotidases em subpopulações de células imunes pode atuar como importantes imunomoduladores e fornecer biomarcadores prognósticos interessantes para a LLA-B.

A hipótese da presente tese é que as ectonucleotidases envolvidas com a sinalização purinérgica podem estar alteradas em diferentes populações de linfócitos periféricos, principalmente linfócitos regulatórios, e que esta alteração pode estar associada com a carcinogênese, evasão imune e progressão da doença. Portanto, a presente tese almeja entender a imunomodulação no contexto purinérgico para abrir perspectivas como ferramenta para prognóstico, diagnóstico e terapia para pacientes com LLA-B.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica e proteica de ectonucleotidases a fim de explorar possíveis biomarcadores prognósticos para pacientes com LLA-B, com ênfase na imunomodulação e progressão neoplásica.

3.2 Objetivos Específicos

Capítulo 1: Avaliar as expressões gênicas (*DPP4/CD38/ENTPD1/NT5E*) e proteicas (*CD38/CD39/CD73*) das ectonucleotidases *in silico* e *ex vivo*, respectivamente, e estabelecer uma associação com o prognóstico em diferentes coortes de pacientes com LLA-B, a fim de explorar possíveis biomarcadores prognósticos (item 4.1).

Capítulo 2: Avaliar a expressão das ectonucleotidases nos linfócitos totais e suas subpopulações derivados do sangue periférico em uma coorte de pacientes com LLA-B no momento do diagnóstico (item 4.2).

4. RESULTADOS

4.1 Capítulo 1

***NT5E* GENE AND CD38 PROTEIN AS POTENTIAL PROGNOSTIC BIOMARKERS FOR CHILDHOOD B-ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA**

Vitória Brum da Silva Nunes, Camila Kehl Dias, Marco Antônio De Bastiani, Mariela Granero Farias, Fabiane Spagnol, Ana Paula Alegretti, Liane Esteves Daudt, Mariana Bohns Michalowski, Ana Maria Oliveira Battastini, Alessandra Aparecida Paz, Fabrício Figueiró.

Periódico: **Purinergic Signalling**

Status: **Publicado**

4.2 Capítulo 2

LYMPHOCYTES FROM B-ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS PRESENT DIFFERENTIAL REGULATION OF THE ADENOSINERGIC AXIS DEPENDING ON RISK STRATIFICATION

Vitória Brum da Silva Nunes, Camila Kehl Dias, Juliete Nathali Scholl, Alexia Nedel Sant'Ana, Amanda de Fraga Dias, Mariela Granero Farias, Ana Paula Alegretti, Monalisa Sosnoski, Liane Esteves Daudt, Mariana Bohns Michalowski, Ana Maria Oliveira Battastini, Alessandra Aparecida Paz, Fabrício Figueiró.

Periódico: **Discover Oncology**

Status: **Publicado**

5. DISCUSSÃO

A malignidade não é meramente um acúmulo de células neoplásicas, mas constitui um microambiente que contém células endoteliais, fibroblastos, citocinas, fatores de crescimento, componentes estruturais, matriz extracelular e infiltrado de células imunes que afetam o desenvolvimento, invasão e metástase do câncer (Bremnes et al., 2016). Muitos estudos recentes lançaram nova luz sobre essa complexa interação entre células imunes provenientes do tumor, moduladas para não atacar as células neoplásicas, e não provenientes do tumor, responsáveis pelo ataque as células neoplásicas, principalmente em tumores sólidos (Bieńkowski & Preusser, 2015; X. Yu et al., 2016). No contexto da LLA-B, sabe-se que o nicho linfoide é uma área dinâmica onde todos os componentes interagem mutualmente, resultando em crescimento e progressão neoplásica, além de modificação de células circunstantes (Quail & Joyce, 2013). Além disso, o equilíbrio dinâmico entre ATP e ADO realizado pela presença e atividade reguladora das ectonucleotidases, é um dos muitos fatores associados ao destino pró-carcinogênico ou antitumoral (Campos-Contreras et al., 2020).

Estudos afirmaram que altos valores de linfócitos infiltrantes no microambiente tumoral podem prever o resultado do tratamento e podem ser um potencial indicador prognóstico (Geiger & Rubnitz, 2015; Santoiemma & Powell, 2015). O ATP extracelular foi descrito como um sinal que promove a resposta imune inata e adaptativa ao atrair células imunes. Por outro lado, a ADO atua como uma molécula imunossupressora redirecionando o fenótipo do sistema imune para interromper sinais antitumorais (Allard et al., 2016; de Andrade Mello et al., 2017). Na leucemia linfocítica sabe-se que há uma intensa comunicação cruzada entre células leucêmicas e células não cancerosas em estruturas associadas ao microambiente (como por exemplo linfonodos e medula óssea), onde a sinalização adenosinérgica é integrada na complexa rede de contato célula-célula e mediadores solúveis que conduzem a leucemia (Puente et al., 2018; Vaisitti et al., 2018). A partir disso, hipotetizamos que alterações fenotípicas no microambiente da LLA-B (medula óssea) possam ser transmitidas para o sangue periférico e auxiliar no diagnóstico, prognóstico e no desenvolvimento de novas terapias para pacientes com LLA-B. O objetivo da presente tese foi avaliar a expressão de genes de ectonucleotidases *in silico* e a expressão de proteínas de ectonucleotidases *ex vivo*, a fim de explorar possíveis biomarcadores prognósticos para pacientes com LLA-B (capítulo 1); e caracterizar o sistema imunológico de pacientes

com LLA-B, destacando a relevância clínica dos linfócitos totais e suas subpopulações no sangue periférico através das lentes da sinalização purinérgica, um importante sistema de imunossupressão do câncer e imunidade pró-tumoral, visto que pouco se sabe sobre essa complexa interação entre células neoplásicas e imunes na LLA-B (capítulo 2).

Começamos o projeto de pesquisa realizando as análises *in silico* (capítulo 1) a fim de aumentar a probabilidade de identificarmos processos biológicos mais pertinentes ao estudo. Este tipo de análise otimiza tempo e recursos financeiros. Nessa etapa, exploramos o significado clínico/prognóstico da expressão de genes de ectonucleotidases *in silico*. Observamos que a expressão do gene *NT5E* foi associado à pior sobrevida livre de progressão (SLP) em amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B. Entre os quatro genes envolvidos na sinalização purinérgica analisados, *DPP4* (codifica a proteína CD26), *CD38* (codifica a ectonucleotidase CD38), *ENTPDI* (codifica a ectonucleotidase CD39) e *NT5E* (codifica a ectonucleotidase CD73), apenas *NT5E* mostrou uma associação robusta entre alta expressão no diagnóstico e pior SLP em amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B. Há evidências que sugerem que a expressão de *NT5E* pode ser importante para aumentar as propriedades invasivas e metastáticas de algumas células cancerígenas (Jiang et al., 2018). Ainda, foi observado, em uma análise do conjunto de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), uma associação entre alta expressão de *NT5E* e pior sobrevida global em cinco anos. Além disso, foi correlacionado alta expressão de *NT5E* e maior assinatura de células Tregs em pacientes com carcinoma de células renais (Tripathi et al., 2020). Em pacientes com carcinoma papilífero de tireoide, a alta expressão de mRNA *NT5E* foi associada a características clínico-patológicas desfavoráveis, abundância de Tregs e células dendríticas, depleção de células *Natural Killers* (NK), alta expressão de genes de *checkpoints* imunológicos e genes relacionados à transição mesenquimal no conjunto de dados TCGA (Jeong et al., 2020). Embora exista evidências que correlacionem a expressão de *NT5E* e o prognóstico, este é o primeiro estudo que sugere que a expressão de *NT5E* em amostras de medula óssea tem um impacto prognóstico significativo em pacientes com LLA-B.

A resposta à terapia na LLA infantil está ligada à expressão de genes que controlam a sensibilidade celular e a propensão à apoptose. A descoberta de tais genes é importante porque pode fornecer um meio de melhorar os sistemas de classificação

de risco e identificar vias de sinalização que podem ser direcionadas de forma produtiva para a elaboração de novas terapias. As análises de DRM fornecem uma medida direta da resposta ao tratamento *in vivo* que provavelmente depende não apenas da resistência das células leucêmicas a drogas individuais, mas também de outros fatores, incluindo interações medicamentosas e variáveis farmacocinéticas e farmacogenéticas (C. H. Pui et al., 2001; Campana, 2003; C.-H. Pui et al., 2004). Assim, a resposta ao tratamento medido por DRM tem sido considerado o mais poderoso e completo indicador prognóstico na LLA infantil (Szczepański et al., 2001; Campana, 2003). Portanto, tem sido postulado que genes cuja expressão está associada à presença de DRM devem ter impacto prognóstico significativo (Flotho et al., 2006). Ainda no capítulo 1 desta tese, analisamos a expressão do gene *NT5E* em amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B classificados em DRM<0,1% e DRM>0,1%, sendo DRM>0,1% uma classificação de maior risco em comparação com DRM<0,1%. Observamos que maiores níveis de DRM foram associados à alta expressão de *NT5E* no dia 8 e, conseqüentemente, associados a uma pior resposta ao tratamento. Descobrimos, portanto, que alta expressão de *NT5E* foi associada a uma pior resposta ao tratamento em pacientes com LLA-B em amostras de medula óssea. Podemos sugerir o gene *NT5E* como um possível biomarcador prognóstico, principalmente em relação à SLP, na LLA-B.

Também no capítulo 1, concentramos nossos esforços na análise *ex vivo*, explorando o significado prognóstico da expressão proteica das ectonucleotidases nas populações de blastos, leucócitos totais e células totais (blastos + leucócitos totais) em amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B. Em pacientes diagnosticados com LLA-B, observamos que as células leucocitárias totais apresentavam expressão de CD73 semelhante à de sujeitos saudáveis. Além disso, a expressão desta proteína não apresentou diferenças significativas em nenhum subconjunto celular analisado mesmo considerando a análise de DRM. De fato, em um estudo prospectivo e maior, observou-se que a sobrevivência livre de eventos a longo prazo não era dependente da expressão de CD73 em crianças com LLA (Wieten et al., 2011). Por outro lado, a expressão proteica de CD73 em células B leucêmicas de pacientes DRM-positiva foi relatada como sendo seis vezes maior do que em células B leucêmicas de pacientes DRM-negativa, levando a ectonucleotidase CD73 a ser recomendada como um marcador opcional de DRM para pacientes LLA-B usando citometria de fluxo (W. Wang et al., 2016). Faz-se importante

salientar que *Wieten* e colaboradores analisaram CD73 em células mononucleares da medula óssea de crianças com LLA com idade entre 1-18 anos, enquanto *Wang* e colaboradores analisaram a expressão de CD73 em células B leucêmicas de pacientes com média de idade de 46 anos. Fatores como população celular, tipo de amostra (sangue periférico ou medula óssea) e idade da coorte podem explicar essas diferenças preditivas.

Nas condições do nosso estudo os níveis proteicos de CD73 não foram considerados como um biomarcador prognóstico independente, o que pode parecer discordante ao observado nas análises *in silico* do capítulo 1. Porém, vale ressaltar que genes podem apresentar diferenças no nível de expressão entre a medula óssea e o sangue periférico e, segundo *Sakhinia* e colaboradores, essa diferença pode ser devido ao envolvimento particular desses genes na patobiologia da leucemia, resultando em sua expressão diferencial entre a medula óssea e as células circulantes (*Sakhinia et al., 2006*). Além disso, as análises *in silico* utilizam dados transcriptômicos, e por isso precisamos ter 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.

Os relatos sobre a expressão de CD38 e sua associação com a progressão na LLA são escassos, especialmente na LLA-B. Primeiramente, observamos uma maior expressão de CD38 em leucócitos totais de pacientes com LLA-B em relação a sujeitos saudáveis. Além disso, identificamos que essa maior expressão foi significativa apenas nos pacientes que apresentavam pior evolução clínica ($DRM > 0,1\%$). Estudos relataram que o aumento da expressão de CD38 em blastos está associado a um prognóstico favorável na LLA e na LMA do adulto (*Keyhani et al., 2000*). Por outro lado, na LLA infantil, a expressão de CD38 em células B ou células T não adiciona significância prognóstica para a sobrevida ou sobrevida livre de eventos (*Koehler et al., 1993; Liao et al., 2020*). No mieloma múltiplo, a expressão de CD38 tem sido descrita como um fator prognóstico adverso, apresentando expressão alta e uniforme em plasmócitos malignos e relativamente baixa expressão em células linfóides e mielóides (*Morandi et al., 2018*). Em nossos achados, a alta expressão de CD38 em leucócitos totais de pacientes $DRM > 0,1\%$ pode estar relacionada à sua atividade enzimática produzindo metabólitos da via não canônica adenosinérgica ($NAD^+ > ADPR > AMP > ADO$). A adenosina é uma potente molécula imunossupressora envolvida no escape imune e

enzimas adenosinérgicas canônicas e não canônicas têm sido associadas a pior prognóstico em vários tipos de câncer (Sek et al., 2018; Hammami et al., 2019).

Apesar do crescente conhecimento sobre as funções da CD38, ainda existe considerável controvérsia sobre o significado clínico de sua expressão em malignidades hematopoiéticas na população de blastos e ainda menos relatos na população de células leucocitárias. Vale ressaltar que a expressão de CD38 é uma característica temporal do estado de ativação e/ou estágio de maturação das células podendo ser expressa em células normais e neoplásicas (Malavasi et al., 2008). Diferentemente dos blastos na LLA-T (Tembhare et al., 2020), nas condições do presente trabalho, os blastos apresentam menor expressão de CD38, considerando pacientes DRM>0,1%, quando comparados às células leucocitárias totais e, portanto, uma possível terapia com anticorpo monoclonal anti-CD38 deve ser cuidadosamente avaliado na LLA-B. Portanto, a alta expressão proteica de CD38 em leucócitos no momento do diagnóstico foi relacionada ao aumento da celularidade na DRM e, por consequência, um pior prognóstico em pacientes com LLA-B. Vale ressaltar que esses pacientes DRM>0,1% apresentaram maior expressão de CD38 em leucócitos do que em blastos. Assim, CD38 ainda é um campo de pesquisa em aberto, principalmente como potencial marcador prognóstico, e precisa de avaliação profunda como um potencial alvo terapêutico na LLA-B.

No capítulo 2 desta tese, exploramos o efeito e função da expressão das ectonucleotidases nas subpopulações de linfócitos dos pacientes com LLA-B em amostras de sangue periférico. Diferentemente do capítulo 1, onde exploramos este efeito na população geral de leucócitos, no capítulo 2 observamos o envolvimento das ectonucleotidases em diferentes subpopulações linfocitárias. Primeiramente, observamos um aumento significativo nas populações celulares de linfócitos T CD4+ e T CD8+ no grupo LLA-B. Embora estudos anteriores abordem a questão do número absoluto e função de células T no sangue periférico após quimioterapia em pacientes com leucemias agudas (Bruserud, 1998; Bruserud et al., 1998), bem como relatem uma diminuição no número absoluto de células T em pacientes com LLA (Ran L, 2019), *Le Dieu* e colaboradores caracterizaram células T em sangue periférico de pacientes recém diagnosticados com LMA em comparação com controles saudáveis da mesma idade e descobriram que o número absoluto de células T está aumentado, com amplificação particular de células T CD8+. Curiosamente, *Le Dieu* e colaboradores avaliaram o perfil

de expressão gênica destas células T e detectaram padrões aberrantes de ativação. Assim como observado para a leucemia linfocítica crônica, foi identificado uma disfunção das células T na LMA que pode contribuir para a falha de uma resposta imune do hospedeiro contra blastos leucêmicos (Le Dieu et al., 2009). Semelhante, Bar e colaboradores demonstraram associação entre alta contagem absoluta de linfócitos no momento do diagnóstico e piores resultados na LMA (Bar et al., 2015). Portanto, embora pacientes com LLA-B apresentem um maior número de linfócitos T, esse aumento pode estar associado a fenótipos de exaustão celular e/ou evasão imune.

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 adenosina (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. No câncer, incluindo neoplasias hematológicas como a LLA-B, a superexpressão de ectonucleotidases, principalmente a CD39 e CD73, tem sido associada ao aumento do direcionamento para nichos protegidos, aumento da sobrevivência e proliferação, bem como modulação das respostas imunes em direção à tolerância (Vaisitti et al., 2018, 2019).

Por outro lado, a expressão de CD38, como parte do sistema purinérgico, é mais incipiente e carece de aprofundamento. Dessa forma, o nível de expressão de CD38 nas subpopulações de linfócitos B e células Tregs encontra-se significativamente diminuído no grupo LLA-B se comparado ao grupo controle, independentemente do grupo de risco (padrão, intermediário ou alto). CD38 está envolvida na quimiotaxia e *homing* de leucócitos; está localizada na sinapse imune em contato próximo com os receptores dos linfócitos T e B, monócitos e células NK; além de desempenhar várias outras funções enzimáticas, incluindo atividades NAD⁺glicohidrolase, ADP-ribosil ciclase e ADP-ribose cíclico hidrolase. A expressão de CD38 nas células do sistema imunológico é variável: CD38 é altamente expresso em precursores de células T e em timócitos duplo-positivos CD4⁺CD8⁺. Em contraste, as células T maduras têm baixos níveis de CD38, mas após a ativação mitogênica elas regulam positivamente sua expressão; da mesma forma, os progenitores de células B têm CD38 de superfície, enquanto os linfócitos B maduros e virgens têm CD38 baixo e a ativação induz a re-expressão de CD38. Embora CD38 já tenha sido aplicada na maturação, proliferação e produção de citocinas de

células T e B, seu papel nas células B não está claramente definida, principalmente em comparação com as evidências nas células T que são mais robustas (Hamblin et al., 2002; Fernandes, 2006).

Zupo e colaboradores estudaram a expressão de CD38 nas células B do sangue periférico de pacientes com LLC-B e observaram que algumas células expressaram CD38 em abundância, enquanto a expressão foi baixa a ausente em outro grupo de pacientes. A expressão de CD38 identificou um subconjunto de células B com propriedades funcionais definidas, incluindo a propensão a sofrer apoptose e uma rápida mobilização de cálcio intracelular após reticulação de imunoglobulina de superfície (sIg); enquanto a expressão baixa a ausente de CD38 identificou outro subconjunto de células B com propriedades definidas, incluindo resistência a sofrer apoptose e não responder à estimulação com anticorpos anti-IgM. Essas observações levantam uma série de questões sobre o papel de CD38 na ativação de células B, mobilização de cálcio e apoptose (Zupo et al., 1996). Sabe-se que o nível de expressão de CD38 se correlaciona com a função supressora das células Tregs (X. Feng et al., 2017), onde a baixa expressão pode definir um subconjunto de Treg com capacidade imunossupressora reduzida (Patton et al., 2011; Krejcik et al., 2016; Tai & Anderson, 2016). Portanto, menor expressão de CD38 em linfócitos B pode estar associado a menor ativação dessas células, bem como menor expressão de CD38 em células Tregs pode estar definindo um subconjunto celular com menor capacidade de reduzir a atividade ou eficiência do sistema imunológico, ou maior maturação celular, embora melhor compreensão desses meandros ainda seja necessária.

Com relação a CD39 e CD73, observamos um aumento significativo, no grupo LLA-B, para o nível de expressão de CD39 e CD73, bem como na frequência da dupla marcação CD39+CD73+, na população de células Bregs. Quando classificamos os pacientes em grupos de risco, observamos um aumento significativo no grupo LLA-B risco padrão para o nível de expressão de CD39 na subpopulação de células Bregs. Já foi observado que as células Bregs são capazes de suprimir células T efetoras a partir da produção de ADO e IL-10. De fato, a produção de ADO, pela superexpressão de CD39 e CD73 nas Bregs, não apenas desencadeou a inibição de células T, mas também o aumento da frequência dos próprios linfócitos Bregs (Figueiró et al., 2016). Além disso, Kaku e colaboradores demonstraram um novo papel regulador dos linfócitos Bregs que expressam CD39 e CD73, na colite experimental, através da geração de ADO

de maneira independente de IL-10 (Kaku et al., 2014). Foi observado na LLC que a adaptação metabólica induzida pelo eixo hipóxia-ADO nas células B leucêmicas sintoniza a produção e liberação de citocinas e favorece a aquisição de um fenótipo B regulatório, definido por uma regulação positiva de IL-10 (DiLillo et al., 2013). Achados, portanto, ligam hipóxia e ADO gerado por CD73 em um eixo comum destinado a remodelar um nicho favorável ao tumor com características imunossupressoras e de suporte ao tumor (Serra et al., 2016).

Na população de linfócitos T CD8+, também observamos um aumento significativo na frequência da dupla marcação CD39+CD73+ no grupo LLA-B. Estudo recente destaca que a co-expressão de CD39 e CD103 (que está envolvida na adesão e ativação) identifica um subconjunto de células T CD8+ reativas em tumores humanos sólidos (Duhon et al., 2018). Além disso, evidências mostram que o microambiente tumoral elicia um subconjunto de células T CD8+ funcionalmente exaustas criando condições que induzem a expressão de CD39 na superfície celular, uma molécula imunossupressora que pode ser terapêuticamente direcionada para restaurar a função das células T efetoras (Canale et al., 2018). Foi observado em pacientes com LLC que alta expressão de CD39 em células T CD4+ e CD8+ está associado a um estágio avançado da doença (Pulte et al., 2011). Ainda, em um modelo de linfoma folicular (LF), a hiporesponsividade das células T infiltradas pode ser parcialmente revertida pelo bloqueio dos receptores de ADO ou inibidores da atividade de CD39, o que sugere que o desmantelamento de ATP e a sinalização de ADO poderiam ser responsáveis pela anergia das células T favorecendo a expansão do LF (Hilchey et al., 2009). As células Bregs e os linfócitos T CD8+ também podem estar produzindo mais ADO pela via canônica do sistema purinérgico, visto que há mais CD39 para converter ATP em AMP, substrato da ectonucleotidase CD73 para a produção de ADO. Maior produção de ADO leva a maior imunossupressão e evasão imunológica, podendo esta levar a progressão da LLA-B. Ainda, a expressão de CD39 em células T CD8+ no sangue periférico de pacientes com LLA-B pode estar marcando exaustão e reatividade ou hiporesponsividade, pois esse comportamento já foi observado em tumores sólidos e hematopoiéticos (Hilchey et al., 2009; Y. Lee et al., 2019).

A inflamação é uma resposta imune ao dano e é mediada principalmente por citocinas, que desempenham papéis importantes na modulação da sobrevivência celular, proliferação, diferenciação e resposta imune (B. Zhang et al., 2012; Welner et

al., 2015). As citocinas são classificadas como pró-inflamatórias (por exemplo TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12) e anti-inflamatórias (por exemplo IL-10 e TGF- β) (Zappavigna et al., 2020; Jiménez-Morales et al., 2021). Nossa análise de marcadores inflamatórios no sangue periférico de pacientes com LLA-B (capítulo 2) constatou uma diminuição estatisticamente significativa na concentração de TNF e IL-1 β . Foi demonstrado que TNF é produzido por células B normais e funciona como um fator de crescimento e diferenciação autócrino para tais células (Kehrl et al., 1987; Sung et al., 1988; Rieckmann et al., 1991). Em algumas malignidades, como LLC-B e leucemia de células pilosas, foi sugerido que essa citocina possa representar um fator de crescimento autócrino nessas neoplasias (Cordingley et al., 1988; Luo et al., 1993). O TNF inibe o crescimento de células progenitoras hematopoiéticas normais, mas paradoxalmente aumenta a proliferação de células neoplásicas em pacientes com neoplasias mieloproliferativas, síndrome mielodisplásica e anemia de Fanconi (Verma et al., 2002; Fleischman et al., 2011; Garbati et al., 2016). A IL-1 é reguladora mestre da inflamação, imunidade inata e hematopoiese. Existem duas formas de IL-1, IL-1 α e IL-1 β que apresentam atividades biológicas semelhantes, embora difiram na maneira como são processadas e secretadas (O'Neill, 1995; Carey et al., 2017). A IL-1 β é secretada extracelularmente e sabe-se que pacientes com alta expressão têm risco aumentado de metástase e mau prognóstico em doenças tumorais sólidas (Voronov et al., 2003). Os resultados apresentados sugerem que a menor concentração de TNF no sangue periférico pode estar associado a maior proliferação de células progenitoras hematopoiéticas, porém menor proliferação e diferenciação de células B. Por outro lado, a menor concentração de IL-1 β pode estar definindo um microambiente menos propenso a sobrevivência e crescimento das células neoplásicas na LLA-B. A hipótese dos autores é que mesmo tendo um aumento das células imunes na LLA-B, estamos observando menos citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF e IL-1 β , na circulação dos pacientes e este fator pode estar relacionado a uma possível exaustão imunológica. Mesmo com valores altos de linfócitos circulantes no sangue periférico, provavelmente estas células não conseguem desempenhar de forma eficiente suas funções, como, por exemplo, secreção de citocinas pró-inflamatórias.

Vale ressaltar que citocinas específicas determinam o destino das células T auxiliares (Th) (Zhu & Paul, 2010), sendo a presença de populações funcionais de células Th fundamentais para uma resposta antitumoral eficaz (Flynn & Stockinger,

2003). Já se sabe que na LMA a disfunção das células T é, pelo menos parcialmente, consequência de uma rede de citocinas desregulada e a disfunção das sinapses imunológicas entre as células T ativadas e os blastos da LMA (Le Dieu et al., 2009). Como outra possível hipótese para disfunção das células T a desregulação das citocinas como TNF e IL-1 β pode ser o fator responsável, pelo menos em parte. Portanto, o restabelecimento da homeostase das citocinas (citocinas anti-inflamatórias inibindo a proliferação de células leucêmicas e mantendo sob controle a expressão e função de citocinas pró-inflamatórias) pode significar um maior benefício para os pacientes com LLA-B.

Outro fator importante que tem impacto significativo no curso do câncer é a composição bioquímica do microambiente tumoral e, eventualmente, do sangue periférico, cujo papel é cada vez mais enfatizado no caso das neoplasias hematológicas (Duarte et al., 2018; R. Kumar et al., 2018). Já foi relatado que os nucleotídeos e nucleosídeos de purina são componentes significativos do microambiente da medula óssea na LMA (Rossi et al., 2012). Os nucleotídeos de adenina (ATP) são liberados no espaço extracelular a partir de células necróticas e inflamatórias ou células tumorais (Di Virgilio & Adinolfi, 2017). Ao longo do crescimento neoplásico, os nucleotídeos de adenina e adenosina, componentes abundantes do microambiente tumoral, são potentes moduladores da resposta imune, como, por exemplo, no controle da liberação de citocinas, desempenham um papel fundamental nas interações hospedeiro-câncer e modulam o crescimento de células tumorais (Di Virgilio, 2012; Puchałowicz et al., 2020). Nossa análise de nucleosídeos/nucleotídeos de adenina extracelulares no sangue periférico de pacientes com LLA-B (capítulo 2) constatou um aumento na concentração de AMP e uma diminuição na concentração de ADO. Sabe-se que o AMP pode ser usado como ligante para ativar receptores de adenosina, principalmente o receptor A1 (Rittiner et al., 2012; Puchałowicz et al., 2020). A captação intracelular de adenosina também pode estar ocorrendo, diminuindo sua concentração no espaço extracelular e por consequência minimizando seus efeitos (Belardinelli et al., 1982). A captação oportunista de nutrientes extracelulares através de múltiplos mecanismos endocíticos tem sido descrita como uma característica primária do metabolismo do câncer (Pavlova & Thompson, 2016; Vultaggio-Poma et al., 2020). Por exemplo, a captação de adenosina é o principal efetor da toxicidade do ATP em células do câncer cervical (Mello et al., 2014). Observamos diferenças na expressão das ectonucleotidases CD39

e CD73 e alterações nos metabólitos AMP e ADO; portanto, podemos sugerir que um rearranjo de função pode estar ocorrendo na via canônica de produção de ADO do sistema purinérgico na LLA-B.

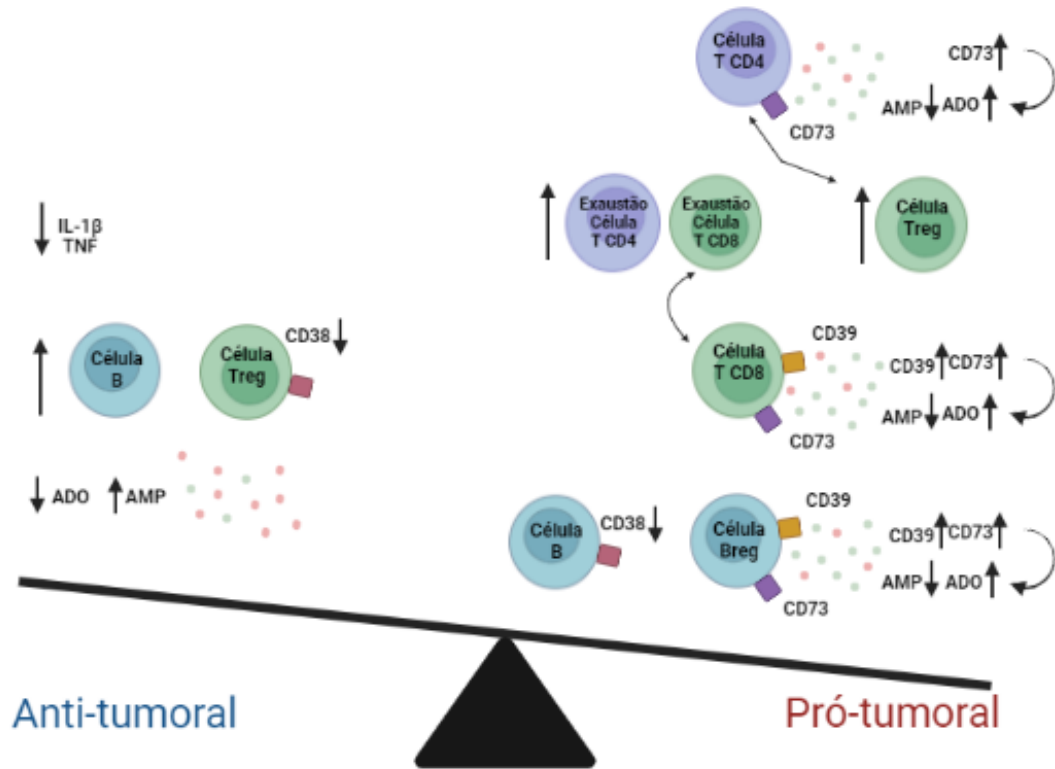
Como limitações no capítulo 1 do nosso estudo, trabalhamos apenas com sangue periférico. Seria interessante avaliar também as amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B, bem como de sujeitos saudáveis, para compararmos com os resultados significativos obtidos nos experimentos *in silico*; o tamanho amostral e o número reduzido de marcadores aplicados *ex vivo* também são limitantes reconhecidos. No capítulo 2 do nosso estudo, não avaliamos o nível de expressão das ectonucleotidases na série neutrofílica, monocítica e células NK, podendo a diferença de expressão de CD38 estar principalmente nesses subconjuntos de células.

Nas análises *in silico* (capítulo 1), 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 289 pacientes com LLA-B, 68,5% apresentavam amostras de medula óssea. Talvez por este motivo não visualizamos diferença significativa na expressão dos genes purinérgicos em amostras de sangue periférico nessa coorte. Já nos experimentos *ex vivo* presentes no capítulo 1 e 2, respectivamente, analisamos amostras de sangue periférico de uma população de 15 pacientes com LLA-B; sendo a população de pacientes dos experimentos do capítulo 1 estratificada ou não em dois grupos: DRM<0,1% (n=6) e DRM>0,1% (n=9), e a população de pacientes dos experimentos do capítulo 2 estratificada ou não em três grupos de risco: padrão (n=6), intermediário (n=4) e alto (n=5). Embora o cálculo do n amostral para os experimentos *ex vivo* de ambos os capítulos tenha se baseado na variação significativa dos valores experimentais em análises semelhantes publicadas, a grande diferença amostral entre as análises *in silico* x *ex vivo* pode estar impactando na relevância estatística dos resultados. Ainda, 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 e leucêmicas), o que difere das análises *ex vivo* onde analisamos subpopulações celulares específicas.

Mesmo não tendo estratificado a coorte de pacientes no experimento *in silico*, achamos interessante estratificar nos experimentos *ex vivo*. Nos experimentos do

capítulo 1, estratificamos os pacientes quanto a presença de DRM. Já nos experimentos do capítulo 2, foi utilizada a estratificação de risco (padrão, intermediário e alto) realizada pelo corpo clínico do Serviço de Hematologia Clínica e do Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), de acordo com o protocolo IC-BFM 2009. Já foi postulado que a DRM pode estar associada a alterações na expressão gênica, tendo um impacto prognóstico significativo (Flotho et al., 2006). Portanto, utilizamos esta variável para associar ao significado prognóstico da expressão gênica das ectonucleotidases. Já os grupos de risco padrão, intermediário e alto são usados clinicamente para planejar melhores tratamentos, sendo baseada em um conjunto de fatores clínicos e biológicos, portanto utilizamos esta estratificação mais robusta para associar ao efeito e função da expressão das ectonucleotidases na população de linfócitos dos pacientes com LLA-B.

Com os resultados dos experimentos *in silico* e *ex vivo* do capítulo 1 desta tese, observamos que a associação entre a expressão do gene *NT5E* e o prognóstico claramente merece maior investigação; porém, podemos sugerir que as medidas da expressão de *NT5E* em amostras de medula óssea podem auxiliar, no futuro, a identificar pacientes com pior prognóstico e mais propensos à progressão da doença. Nossos estudos também apresentam a expressão da proteína CD38 como um biomarcador independente útil que permite prever a evolução da doença, destacando sua relevância não apenas em blastos, mas principalmente em células imunes em amostras de sangue periférico. Futuras investigações experimentais podem tentar entender os mecanismos subjacentes ligados a elevação da expressão de CD38 em células imunes do sangue periférico de pacientes com LLA-B e o porquê isso pode ser um indicativo de pior prognóstico. Com os resultados dos experimentos *ex vivo* do capítulo 2 desta tese, conforme resumido no esquema 1, destacamos o potencial papel da sinalização purinérgica em vários subconjuntos de células imunes e avaliamos o perfil imunológico de pacientes LLA-B no momento do diagnóstico em comparação com sujeitos saudáveis e estratificamos os pacientes de acordo com a alocação de risco.



Esquema 1. Ilustração esquemática representando a nossa hipótese de que são vários mediadores e moduladores imunológicos, bem como a abundância e o estado de ativação de diferentes tipos celulares que ditam em que direção o equilíbrio é inclinado, se anti- ou pró-tumoral. Na direção anti-tumoral, salientamos o papel da expansão das células B; menor concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β ; menor concentração de ADO (molécula imunossupressora) e, por consequência, maior concentração de AMP. Hipotetizamos, ainda, que células Tregs que expressam menos CD38 podem representar uma subpopulação com capacidade imunossupressora reduzida. Já na direção pró-tumoral, salientamos a maior expansão de células T CD4+ e T CD8+ com fenótipo de exaustão; maior expansão de células Tregs. Hipotetizamos que baixa expressão de CD38 em células B pode estar associado a menor ativação dessa subpopulação celular. Ainda, há evidências que nos levam a acreditar que um subconjunto de células T CD8+ funcionalmente exaustas pode criar condições que induzem a expressão de CD39 na superfície celular. Também há evidências que sugerem que a superexpressão de CD39 e CD73 nas células Bregs desencadeia inibição de células T e aumenta a frequência dos próprios linfócitos Bregs. Tanto os Bregs quanto os linfócitos T CD8+ também podem estar produzindo mais ADO pela via canônica de produção de ADO do sistema purinérgico, contribuindo para o perfil pró-tumoral [Imagem de autoria própria, 2023].

É a expressão de vários mediadores e moduladores imunológicos, bem como a abundância e o estado de ativação de diferentes tipos de células que ditam em que direção o equilíbrio é inclinado e se a inflamação promove o crescimento do tumor ou a imunidade antitumoral (Smyth et al., 2006; Lin & Karin, 2007). Em neoplasias estabelecidas esse equilíbrio é profundamente inclinado para a imunidade pró-tumoral,

especialmente no momento do diagnóstico dos pacientes onde ainda não há intervenção terapêutica (Grivennikov et al., 2010). Embora nenhum modulador imunológico único possa reproduzir fielmente a complexidade da imunidade no câncer, sendo difícil avaliar o impacto geral da imunidade e da inflamação nos eventos tumorigênico, uma combinação selecionada de mediadores pode estar envolvida em eventos-chave que levam à progressão do tumor e evasão imunológica. No entanto, é seguro assumir que a modulação imune que promove a neoplasia e a imunidade antitumoral coexistem em diferentes pontos ao longo do caminho do desenvolvimento e progressão neoplásica (Bui & Schreiber, 2007; Swann et al., 2008). No contexto da LLA-B, no momento do diagnóstico e das redes metabólicas específicas das circunstâncias que acompanham esta tese, sugerimos que esse perfil de expressão de ectonucleotidases na população linfocitária esteja inclinado para a exaustão e evasão imune, onde cada tipo celular estaria utilizando de meios heterogêneos de sinalização celular dependendo do contexto metabólico. Portanto, no contexto da LLA-B, esse equilíbrio está profundamente inclinado para a imunidade pró-tumoral, ainda mais no momento do diagnóstico dos pacientes onde ainda não há intervenção terapêutica. Obviamente, com a nossa discussão e esquema final, não temos a pretensão de explicar a complexidade da imunidade no câncer, mas apenas buscar uma didática para as variáveis apresentadas nessa tese. Portanto, entendemos que mais estudos sejam necessários para fornecer informações valiosas sobre as características purinérgicas em pacientes com LLA-B para otimizar a alocação de risco, para evitar o tratamento excessivo ou insuficiente dos pacientes, para propiciar a descoberta de biomarcadores prognósticos mais robustos, bem como o desenvolvimento de novos agentes antileucêmicos e estratégias terapêuticas.

6. CONCLUSÃO

Esta tese de doutorado visou avaliar o papel das ectonucleotidases como possíveis biomarcadores prognósticos e alvos terapêuticos em leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B), com o intuito de propor uma assinatura gênica e proteica dessas enzimas com valor preditivo de desfecho. Através das análises *in silico* e *ex vivo* de duas coortes distintas de amostras de pacientes com LLA-B foi possível identificar que a alta expressão de mRNA *NT5E* é um fator prognóstico independente e adverso na LLA-B e é capaz de estratificar os pacientes para pior prognóstico. Ainda, foi possível identificar que uma maior expressão proteica de CD38 em leucócitos parece estar associado a um pior prognóstico em pacientes com LLA-B, implicando que a expressão de CD38 pode ser um parâmetro para a progressão da doença. A expressão de CD38 em leucócitos tem potencial como indicador prognóstico, em especial, porque está prontamente disponível a partir de uma amostra de sangue periférico, sendo facilmente medida. Além disso, a análise da expressão de CD38 pode permitir a identificação de um subconjunto de pacientes com melhor/pior prognóstico dentro de um grupo de prognóstico presumivelmente ruim/bom (através das estratificações de risco atuais); isso é particularmente importante no manejo de pacientes nos estágios iniciais da doença.

Ainda, ao explorar o efeito e função das ectonucleotidases em subpopulações linfocitárias específicas de pacientes com LLA-B, observamos uma menor expressão de CD38 em linfócitos B e células Tregs e aumento da expressão de CD39 e CD73 na população de células Bregs, indicando que cada tipo celular utiliza de meios heterogêneos de sinalização celular dependendo do contexto metabólico. No contexto da LLA-B, no momento do diagnóstico, acreditamos que esse perfil de expressão de

ectonucleotidases na população linfocitária esteja inclinado para a exaustão e evasão imune.

Em conclusão, a expressão gênica de *NT5E* e proteica de CD38 em leucócitos tem potencial para ser biomarcadores prognósticos em pacientes com LLA-B, podendo ser utilizados para uma melhor estratificação dos pacientes. Ainda, como imunomoduladores, a expressão de ectonucleotidases pode estar associada a estados de ativação, bem como a abundância de diferentes subconjuntos celulares. Observamos um perfil de expressão associado a imunidade pró-tumoral em pacientes com LLA-B no momento do diagnóstico, estando associado à exaustão celular e evasão imune.

A presente tese de doutorado pode contribuir para o entendimento da imunomodulação na LLA-B, bem como trazer contribuições na avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para o prognóstico dessa patologia. Tais descobertas abrem perspectivas para complementar o monitoramento dos pacientes e para o controle da expressão das ectonucleotidases através de interação terapêutica, podendo, dessa forma, ativar o sistema imune contra a progressão da LLA-B. Novos biomarcadores são necessários para aumentar a precisão no prognóstico devido à heterogeneidade desse grupo de neoplasia, para que sejam definidas as medidas de tratamento mais adequadas e, conseqüentemente, para que haja uma melhoria na sobrevida dos pacientes associada ao tratamento da LLA-B.

7. PERSPECTIVAS

Pretende-se avaliar amostras de medula óssea de pacientes com LLA-B, bem como realizar novas análises com um tamanho amostral maior e mais marcadores aplicados *ex vivo*. Também avaliaremos o nível de expressão das ectonucleotidasas na série neutrofílica, monocítica e células NK, podendo a diferença de expressão de CD38, principalmente, estar nesses subconjuntos de células não analisadas na presente tese.

Para confirmar a assinatura proteica de CD38 em amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B como fator prognóstico, pretende-se realizar um estudo retrospectivo (pesquisa quantitativa, observacional, longitudinal, analítica e aleatorizada). O trabalho será auto-controlado do tipo antes e depois, consistindo na análise de dados previamente armazenados de amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LLA-B que foram coletadas no período de utilização do painel de imunofenotipagem ALOT (do inglês, *Acute Leukemia Orientation Tube*) (EuroFlow) pela Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do HCPA. Pretende-se avaliar a expressão de CD38 em subpopulações celulares nas amostras obtidas no momento do diagnóstico e após o tratamento, quando a primeira detecção de DRM (as seguintes DRMs também poderão ser avaliadas, quando disponíveis), e será correlacionada com o prognóstico e dados clínicos e laboratoriais dos respectivos pacientes, como idade, sobrevida, remissão, DRM, alterações citogenéticas e outros, os quais serão disponibilizados pelo Serviço de Hematologia do HCPA.

Visto que as células imunes também são moduladas por vesículas e nanopartículas extracelulares, veículos bioativos importantes que as células leucêmicas usam para transformar seus arredores em um microambiente que suporte seu crescimento e sobrevivência, enquanto inibe o sistema imunológico e a hematopoiese

normal, faz-se necessário mais pesquisas a respeito das ectonucleotidases em vesículas e nanopartículas extracelulares e o papel dessas vesículas e nanopartículas na modulação do sistema imune no contexto da LLA-B. Para isso, pretende-se isolar, utilizando coluna de cromatografia por exclusão de tamanho com *sepharose*, vesículas e nanopartículas extracelulares presentes no plasma de pacientes com LLA-B e comparar com as vesículas e nanopartículas extracelulares de sujeitos saudáveis, quanto as seguintes características: tamanho (nm; utilizando equipamento *NanoSight*), concentração de partículas (n° de partículas/ml; utilizando equipamento *NanoSight*), teor de proteína total ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$; utilizando kit de ensaio de ácido bicinonínico) e fenotipicamente através de marcadores clássicos CD9, CD63 e CD81 e marcadores purinérgicos CD38, CD39 e CD73 (através de citometria de fluxo).

Para avaliar o papel funcional dos linfócitos Bregs derivados das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LLA-B na regulação das respostas dos linfócitos T, podemos realizar experimentos *in vitro*, através de cocultura, inibindo ou não as ectonucleotidases, analisando a secreção de citocinas; ativação, proliferação e morte dos linfócitos, bem como o metabolismo extracelular do ATP. Por fim, para confirmar o impacto do sistema purinérgico como um todo pretende-se realizar uma caracterização a nível proteico dos principais receptores do sistema purinérgico em amostras de sangue periférico de pacientes com LLA-B.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarhus, R., Graeff, R. M., Dickey, D. M., Walseth, T. F., & Lee, H. C. (1995). ADP-ribose cyclase and CD38 catalyze the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30327–30333. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.51.30327>
- Abbracchio, M. P., Burnstock, G., Boeynaems, J.-M., Barnard, E. A., Boyer, J. L., Kennedy, C., Knight, G. E., Fumagalli, M., Gachet, C., Jacobson, K. A., & Weisman, G. A. (2006). International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 281–341. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.3>
- Abousamra, N. K., Salah El-Din, M., Hamza Elzahaf, E., & Esmael, M. E. (2015). Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 56(1), 113–119. <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.907893>
- Al-Absi, B., Razif, M. F. M., Noor, S. M., Saif-Ali, R., Aqlan, M., Salem, S. D., Ahmed, R. H., & Muniandy, S. (2017). Contributions of IKZF1, DDC, CDKN2A, CEBPE, and LMO1 Gene Polymorphisms to Acute Lymphoblastic Leukemia in a Yemeni Population. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 21(10), 592–599. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2017.0084>
- Allard, B., Beavis, P. A., Darcy, P. K., & Stagg, J. (2016). Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.04.001>
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological reviews*, 276(1), 121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Antonioli, L., Blandizzi, C., Pacher, P., & Haskó, G. (2013). Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12), 842–857. <https://doi.org/10.1038/nrc3613>
- Appelbaum, F. R. (2014). 98—Acute Leukemias in Adults. Em J. E. Niederhuber, J. O. Armitage, J. H. Doroshow, M. B. Kastan, & J. E. Tepper (Orgs.), *Abeloff's Clinical Oncology (Fifth Edition)* (p. 1890–1906). Churchill Livingstone. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2865-7.00098-9>
- Armstrong, J. M., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Apasov, S., Smith, P. T., Caldwell, C., Chen, P., Figler, H., Sullivan, G., Fink, S., Linden, J., & Sitkovsky, M. (2001). Gene dose effect reveals no Gs-coupled A2A adenosine receptor reserve in murine T-lymphocytes: Studies of cells from A2A-receptor-gene-deficient mice. *Biochemical Journal*, 354(1), 123–130. <https://doi.org/10.1042/bj3540123>
- Armstrong, S. A., & Look, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(26), 6306–6315. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.047>

- Baden, L. R., Swaminathan, S., Angarone, M., Blouin, G., Camins, B. C., Casper, C., Cooper, B., Dubberke, E. R., Engemann, A. M., Freifeld, A. G., Greene, J. N., Ito, J. I., Kaul, D. R., Lustberg, M. E., Montoya, J. G., Rolston, K., Satyanarayana, G., Segal, B., Seo, S. K., ... Smith, C. (2016). Prevention and Treatment of Cancer-Related Infections, Version 2.2016, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 14(7), 882–913. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2016.0093>
- Bai, A., Moss, A., Rothweiler, S., Serena Longhi, M., Wu, Y., Junger, W. G., & Robson, S. C. (2015). NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8(+) T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nature Communications*, 6, 8819. <https://doi.org/10.1038/ncomms9819>
- Bain, B. J. (2017). WHO Classification of Leukemia☆. *Em Reference Module in Life Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.07356-8>
- Balliot, J., Morgan, M., & Cherven, B. (2019). Caring for the Pediatric, Adolescent, or Young Adult Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(6), 150956. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.150956>
- Bar, M., Othus, M., Park, H. M., Sandhu, V., Chen, X., Wood, B. L., & Estey, E. (2015). Elevated lymphocyte count at time of acute myeloid leukemia diagnosis is associated with shorter remission. *Leukemia & Lymphoma*, 56(11), 3109–3115. <https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1020060>
- Bassan, R., & Hoelzer, D. (2011). Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(5), 532–543. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.1382>
- Belardinelli, L., Fenton, R. A., West, A., Linden, J., Althaus, J. S., & Berne, R. M. (1982). Extracellular action of adenosine and the antagonism by aminophylline on the atrioventricular conduction of isolated perfused guinea pig and rat hearts. *Circulation Research*, 51(5), 569–579. <https://doi.org/10.1161/01.RES.51.5.569>
- Belson, M., Kingsley, B., & Holmes, A. (2007). Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environmental Health Perspectives*, 115(1), 138–145. <https://doi.org/10.1289/ehp.9023>
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., & van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10), 1783–1786.
- Béné, M. C., Nebe, T., Bettelheim, P., Buldini, B., Bumbea, H., Kern, W., Lacombe, F., Lemez, P., Marinov, I., Matutes, E., Maynadié, M., Oelschlagel, U., Orfao, A., Schabath, R., Solenthaler, M., Tschurtschenthaler, G., Vladareanu, A. M., Zini, G., Faure, G. C., & Porwit, A. (2011). Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*, 25(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.312>
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-

American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>

Bhan, A. K., Reinherz, E. L., Poppema, S., McCluskey, R. T., & Schlossman, S. F. (1980). Location of T cell and major histocompatibility complex antigens in the human thymus. *The Journal of Experimental Medicine*, 152(4), 771–782. <https://doi.org/10.1084/jem.152.4.771>

Bieńkowski, M., & Preusser, M. (2015). Prognostic role of tumour-infiltrating inflammatory cells in brain tumours: Literature review. *Current Opinion in Neurology*, 28(6), 647–658. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000251>

Borowitz, M. J., Devidas, M., Hunger, S. P., Bowman, W. P., Carroll, A. J., Carroll, W. L., Linda, S., Martin, P. L., Pullen, D. J., Viswanatha, D., Willman, C. L., Winick, N., Camitta, B. M., & Children's Oncology Group. (2008). Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: A Children's Oncology Group study. *Blood*, 111(12), 5477–5485. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>

Brauneck, F., Weimer, P., Schulze zur Wiesch, J., Weisel, K., Leyboldt, L., Vohwinkel, G., Fritzsche, B., Bokemeyer, C., Wellbrock, J., & Fiedler, W. (2021). Bone Marrow-Resident V δ 1 T Cells Co-express TIGIT With PD-1, TIM-3 or CD39 in AML and Myeloma. *Frontiers in Medicine*, 8, 763773. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.763773>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Bremnes, R. M., Busund, L.-T., Kilvær, T. L., Andersen, S., Richardsen, E., Paulsen, E. E., Hald, S., Khanehkenari, M. R., Cooper, W. A., Kao, S. C., & Dønnem, T. (2016). The Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Development, Progression, and Prognosis of Non-Small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(6), 789–800. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.01.015>

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

Bruserud, O. (1998). Cellular immune responses in acute leukaemia patients with severe chemotherapy-induced leucopenia; characterization of the cytokine repertoire of clonogenic T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 46(4), 221–228. <https://doi.org/10.1007/s002620050481>

Bruserud, O., Ulvestad, E., Berentsen, S., Bergheim, J., & Nesthus, I. (1998). T-lymphocyte functions in acute leukaemia patients with severe chemotherapy-induced cytopenia: Characterization of clonogenic T-cell proliferation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 47(1), 54–62. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.1998.00254.x>

- Bui, J. D., & Schreiber, R. D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: Independent or interdependent processes? *Current Opinion in Immunology*, *19*(2), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.02.001>
- Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: From discovery to current developments. *Experimental Physiology*, *99*(1), 16–34. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2013.071951>
- Burnstock, G., & Di Virgilio, F. (2013). Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*, *9*(4), 491–540. <https://doi.org/10.1007/s11302-013-9372-5>
- Burnstock, G., & Knight, G. E. (2018). The potential of P2X7 receptors as a therapeutic target, including inflammation and tumour progression. *Purinergic Signalling*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11302-017-9593-0>
- Burnstock, G., & Verkhratsky, A. (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, *195*(4), 415–447. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01957.x>
- Butler, M., Sanmugalingam, D., Burton, V. J., Wilson, T., Pearson, R., Watson, R. P., Smith, P., & Parkinson, S. J. (2012). Impairment of adenosine A3 receptor activity disrupts neutrophil migratory capacity and impacts innate immune function in vivo. *European Journal of Immunology*, *42*(12), 3358–3368. <https://doi.org/10.1002/eji.201242655>
- C. Santos, J. (2019). ANÁLISE DA TETRAMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA CD38 POR MEIO DE DOCKING MOLECULAR. <https://doi.org/10.11606/D.95.2019.tde-25062020-130911>
- Campana, D. (2003). Determination of minimal residual disease in leukaemia patients. *British Journal of Haematology*, *121*(6), 823–838. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04393.x>
- Campana, D. (2010). Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2010*, 7–12. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2010.1.7>
- Campana, D., Suzuki, T., Todisco, E., & Kitanaka, A. (2000). CD38 in hematopoiesis. *Chemical Immunology*, *75*, 169–188. <https://doi.org/10.1159/000058768>
- Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells*, *9*(7), E1612. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Canale, F. P., Ramello, M. C., Núñez, N., Araujo Furlan, C. L., Bossio, S. N., Gorosito Serrán, M., Tosello Boari, J., Del Castillo, A., Ledesma, M., Sedlik, C., Piaggio, E., Gruppi, A., Acosta Rodríguez, E. A., & Montes, C. L. (2018). CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells. *Cancer Research*, *78*(1), 115–128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2684>
- Carey, A., Edwards, D. K., Eide, C. A., Newell, L., Traer, E., Medeiros, B. C., Pollyea, D. A., Deininger, M. W., Collins, R. H., Tyner, J. W., Druker, B. J., Bagby, G. C., McWeeney, S. K., & Agarwal, A. (2017). Identification of interleukin-1 by functional

screening as a key mediator of cellular expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Cell reports*, 18(13), 3204–3218. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.018>

Cavalcanti Junior, G. B., Maia, R. C., Dobbin, J. de A., Carriço, M. K., Harab, R. C., Savino, W., & Oliveira, M. do S. P. de. (1997). Importância da aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Rev. bras. anal. clin.*, 159–167.

Chatterjee, D., Tufa, D. M., Baehre, H., Hass, R., Schmidt, R. E., & Jacobs, R. (2014). Natural killer cells acquire CD73 expression upon exposure to mesenchymal stem cells. *Blood*, 123(4), 594–595. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-524827>

Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1), e2014073. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2014.073>

Chillemi, A., Zaccarello, G., Quarona, V., Lazzaretti, M., Martella, E., Giuliani, N., Ferracini, R., Pistoia, V., Horenstein, A. L., & Malavasi, F. (2014). CD38 and bone marrow microenvironment. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 19(1), 152–162. <https://doi.org/10.2741/4201>

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., & Stojilkovic, S. S. (2011). Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological Reviews*, 63(3), 641–683. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003129>

Conter, V., Bartram, C. R., Valsecchi, M. G., Schrauder, A., Panzer-Grümayer, R., Mörlicke, A., Aricò, M., Zimmermann, M., Mann, G., De Rossi, G., Stanulla, M., Locatelli, F., Basso, G., Niggli, F., Barisone, E., Henze, G., Ludwig, W.-D., Haas, O. A., Cazzaniga, G., ... Schrappe, M. (2010). Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*, 115(16), 3206–3214. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248146>

Contreras Yametti, G. P., Ostrow, T. H., Jasinski, S., Raetz, E. A., Carroll, W. L., & Evensen, N. A. (2021). Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Practice and Future Directions. *Cancers*, 13(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/cancers13081847>

Cordingley, F. T., Bianchi, A., Hoffbrand, A. V., Reittie, J. E., Heslop, H. E., Vyakarnam, A., Turner, M., Meager, A., & Brenner, M. K. (1988). Tumour necrosis factor as an autocrine tumour growth factor for chronic B-cell malignancies. *Lancet (London, England)*, 1(8592), 969–971. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91782-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91782-5)

Coustan-Smith, E., Song, G., Clark, C., Key, L., Liu, P., Mehrpooya, M., Stow, P., Su, X., Shurtleff, S., Pui, C.-H., Downing, J. R., & Campana, D. (2011). New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 117(23), 6267–6276. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324004>

Crist, W., Carroll, A., Shuster, J., Jackson, J., Head, D., Borowitz, M., Behm, F., Link, M., Steuber, P., & Ragab, A. (1990). Philadelphia chromosome positive childhood

acute lymphoblastic leukemia: Clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 76(3), 489–494.

Curran, E. K., Godfrey, J., & Kline, J. (2017). Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends in Immunology*, 38(7), 513–525. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.004>

D'Amico, G., Vulcano, M., Bugarin, C., Bianchi, G., Pirovano, G., Bonamino, M., Marin, V., Allavena, P., Biagi, E., & Biondi, A. (2004). CD40 activation of BCP-ALL cells generates IL-10-producing, IL-12-defective APCs that induce allogeneic T-cell anergy. *Blood*, 104(3), 744–751. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-11-3762>

Dander, E., Palmi, C., D'Amico, G., & Cazzaniga, G. (2021). The Bone Marrow Niche in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: The Role of Microenvironment from Pre-Leukemia to Overt Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ijms22094426>

de Andrade Mello, P., Coutinho-Silva, R., & Savio, L. E. B. (2017). Multifaceted Effects of Extracellular Adenosine Triphosphate and Adenosine in the Tumor–Host Interaction and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 8, 1526. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01526>

de Lera Ruiz, M., Lim, Y.-H., & Zheng, J. (2014). Adenosine A2A receptor as a drug discovery target. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(9), 3623–3650. <https://doi.org/10.1021/jm4011669>

Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.-F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1257–1265. <https://doi.org/10.1084/jem.20062512>

Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Surico, N., Dianzani, U., Mehta, K., & Malavasi, F. (2000). CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signaling in human leukocytes. *Chemical Immunology*, 75, 99–120.

Deaglio, S., Morra, M., Mallone, R., Ausiello, C. M., Prager, E., Garbarino, G., Dianzani, U., Stockinger, H., & Malavasi, F. (1998). Human CD38 (ADP-ribosyl cyclase) is a counter-receptor of CD31, an Ig superfamily member. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 160(1), 395–402.

Deaglio, S., Vaisitti, T., Billington, R., Bergui, L., Omede', P., Genazzani, A. A., & Malavasi, F. (2007). CD38/CD19: A lipid raft–dependent signaling complex in human B cells. *Blood*, 109(12), 5390–5398. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-12-061812>

Deaglio, S., Zubiaur, M., Gregorini, A., Bottarel, F., Ausiello, C. M., Dianzani, U., Sancho, J., & Malavasi, F. (2002). Human CD38 and CD16 are functionally dependent and physically associated in natural killer cells. *Blood*, 99(7), 2490–2498. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.7.2490>

Deterre, P., Berthelie, V., Bauvois, B., Dalloul, A., Schuber, F., & Lund, F. (2000). CD38 in T- and B-cell functions. *Chemical Immunology*, 75, 146–168. <https://doi.org/10.1159/000058767>

- Di Virgilio, F. (2005). Purinergic mechanism in the immune system: A signal of danger for dendritic cells. *Purinergic Signalling*, *1*(3), 205–209. <https://doi.org/10.1007/s11302-005-6312-z>
- Di Virgilio, F. (2012). Purines, purinergic receptors, and cancer. *Cancer Research*, *72*(21), 5441–5447. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1600>
- Di Virgilio, F., & Adinolfi, E. (2017). Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, *36*(3), 293–303. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.206>
- Di Virgilio, F., Boeynaems, J.-M., & Robson, S. C. (2009). Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Current opinion in pharmacology*, *9*(4), 507–513. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.06.021>
- DiLillo, D. J., Weinberg, J. B., Yoshizaki, A., Horikawa, M., Bryant, J. M., Iwata, Y., Matsushita, T., Matta, K. M., Chen, Y., Venturi, G. M., Russo, G., Gockerman, J. P., Moore, J. O., Diehl, L. F., Volkheimer, A. D., Friedman, D. R., Lanasa, M. C., Hall, R. P., & Tedder, T. F. (2013). Chronic lymphocytic leukemia and regulatory B cells share IL-10 competence and immunosuppressive function. *Leukemia*, *27*(1), 170–182. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.165>
- Dixit, A., Chatterjee, T., Mishra, P., Kannan, M., Choudhry, D. R., Mahapatra, M., Choudhry, V. P., & Saxena, R. (2007). Disseminated Intravascular Coagulation in Acute Leukemia at Presentation and During Induction Therapy. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, *13*(3), 292–298. <https://doi.org/10.1177/1076029607302435>
- Doherty, G. A., Bai, A., Hanidziar, D., Longhi, M. S., Lawlor, G. O., Putheti, P., Csizmadia, E., Nowak, M., Cheifetz, A. S., Moss, A. C., & Robson, S. C. (2012). CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *European Journal of Immunology*, *42*(11), 3062–3072. <https://doi.org/10.1002/eji.201242623>
- Dores, G. M., Devesa, S. S., Curtis, R. E., Linet, M. S., & Morton, L. M. (2012). Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, *119*(1), 34–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347872>
- Duarte, D., Hawkins, E. D., & Lo Celso, C. (2018). The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. *Blood*, *131*(14), 1507–1511. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-784132>
- Duhen, T., Duhen, R., Montler, R., Moses, J., Moudgil, T., de Miranda, N. F., Goodall, C. P., Blair, T. C., Fox, B. A., McDermott, J. E., Chang, S.-C., Grunkemeier, G., Leidner, R., Bell, R. B., & Weinberg, A. D. (2018). Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8 T cells in human solid tumors. *Nature Communications*, *9*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05072-0>
- Dulphy, N., Henry, G., Hemon, P., Khaznadar, Z., Dombret, H., Boissel, N., Bensussan, A., & Toubert, A. (2014). Contribution of CD39 to the immunosuppressive microenvironment of acute myeloid leukaemia at diagnosis. *British Journal of Haematology*, *165*(5), 722–725. <https://doi.org/10.1111/bjh.12774>

Dwyer, K. M., Deaglio, S., Gao, W., Friedman, D., Strom, T. B., & Robson, S. C. (2007). CD39 and control of cellular immune responses. *Purinergic Signalling*, 3(1–2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9050-y>

Ebert, E. C., & Hagspiel, K. D. (2012). Gastrointestinal manifestations of leukemia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(3), 458–463. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.06908.x>

Elliott, M. R., Chekeni, F. B., Trampont, P. C., Lazarowski, E. R., Kadl, A., Walk, S. F., Park, D., Woodson, R. I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J. J., Harden, T. K., Leitinger, N., & Ravichandran, K. S. (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, 461(7261), 282–286. <https://doi.org/10.1038/nature08296>

Eltzschig, H. K., Sitkovsky, M. V., & Robson, S. C. (2012). Purinergic Signaling during Inflammation. *The New England journal of medicine*, 367(24), 2322–2333. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1205750>

Faderl, S. H., & Kantarjian, H. M. (2008). General Approach to the Therapy of Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. Em E. H. Estey, S. H. Faderl, & H. M. Kantarjian (Orgs.), *Acute Leukemias* (p. 131–135). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72304-2_9

Faderl, S., O'Brien, S., Pui, C.-H., Stock, W., Wetzler, M., Hoelzer, D., & Kantarjian, H. M. (2010). Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 116(5), 1165–1176. <https://doi.org/10.1002/cncr.24862>

Falcão, R. P., & Rego, E. M. (2002). Leucemia linfóide aguda em adultos e crianças: Características morfológicas e imunofenotípicas. *Serie Monograficas da Escola Brasileira de Hematologia*, 9, 25–35.

Fang, F., Yu, M., Cavanagh, M. M., Hutter Saunders, J., Qi, Q., Ye, Z., Le Saux, S., Sultan, W., Turgano, E., Dekker, C. L., Tian, L., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2016). Expression of CD39 on Activated T Cells Impairs their Survival in Older Individuals. *Cell Reports*, 14(5), 1218–1231. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.002>

Farias, M. G., & Castro, S. M. de. (2004). Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 40, 91–98. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442004000200008>

Feng, X., Zhang, L., Acharya, C., An, G., Wen, K., Qiu, L., Munshi, N., Tai, Y.-T., & Anderson, K. C. (2017). Targeting CD38 suppresses induction and function of T regulatory cells to mitigate immunosuppression in multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(15), 4290–4300. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-3192>

Feng, Y.-Y., Griffith, O. L., & Griffith, M. (2017). Clinical implications of neoepitope landscapes for adult and pediatric cancers. *Genome Medicine*, 9(1), 77. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0470-9>

Fernandes, M. (2006). *Expressão de Zap-70 e CD38 em leucemia linfocítica crônica (LLC) e sua correlação com prognóstico* [Doutorado em Hematologia, Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.5.2006.tde-30052006-160411>

Ferrero, E., & Malavasi, F. (1997). Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: Extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and alypsian ADP-ribosyl cyclase. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *159*(8), 3858–3865.

Ferrero, E., Saccucci, F., & Malavasi, F. (2000). The making of a leukocyte receptor: Origin, genes and regulation of human CD38 and related molecules. *Chemical Immunology*, *75*, 1–19. <https://doi.org/10.1159/000058763>

Ferretti, E., Horenstein, A. L., Canzonetta, C., Costa, F., & Morandi, F. (2019). Canonical and non-canonical adenosinergic pathways. *Immunology Letters*, *205*, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2018.03.007>

Feyer, P., & Jordan, K. (2011). Update and new trends in antiemetic therapy: The continuing need for novel therapies. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *22*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq600>

Figueiró, F., Muller, L., Funk, S., Jackson, E. K., Battastini, A. M. O., & Whiteside, T. L. (2016). Phenotypic and functional characteristics of CD39^{high} human regulatory B cells (Breg). *OncoImmunology*, *5*(2), e1082703. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1082703>

Fini, C., Talamo, F., Cherri, S., Coli, M., Floridi, A., Ferrara, L., & Scaloni, A. (2003). Biochemical and mass spectrometric characterization of soluble ecto-5'-nucleotidase from bull seminal plasma. *The Biochemical journal*, *372*, 443–451. <https://doi.org/10.1042/BJ20021687>

Fleischman, A. G., Aichberger, K. J., Luty, S. B., Bumm, T. G., Petersen, C. L., Doratotaj, S., Vasudevan, K. B., LaTocha, D. H., Yang, F., Press, R. D., Loriaux, M. M., Pahl, H. L., Silver, R. T., Agarwal, A., O'Hare, T., Druker, B. J., Bagby, G. C., & Deininger, M. W. (2011). TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*, *118*(24), 6392–6398. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348144>

Fletcher, J. M., Lonergan, R., Costelloe, L., Kinsella, K., Moran, B., O'Farrelly, C., Tubridy, N., & Mills, K. H. G. (2009). CD39⁺Foxp3⁺ regulatory T Cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(11), 7602–7610. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901881>

Flotho, C., Coustan-Smith, E., Pei, D., Iwamoto, S., Song, G., Cheng, C., Pui, C.-H., Downing, J. R., & Campana, D. (2006). Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: Prognostic significance of CASP8AP2. *Blood*, *108*(3), 1050–1057. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-0322>

Flynn, S., & Stockinger, B. (2003). Tumor and CD4 T-cell interactions: Tumor escape as result of reciprocal inactivation. *Blood*, *101*(11), 4472–4478. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3030>

Ford, A. M., Ridge, S. A., Cabrera, M. E., Mahmoud, H., Steel, C. M., Chan, L. C., & Greaves, M. (1993). In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature*, *363*(6427), 358–360. <https://doi.org/10.1038/363358a0>

Forestier, E., Heyman, M., Andersen, M. K., Autio, K., Blennow, E., Borgström, G., Golovleva, I., Heim, S., Heinonen, K., Hovland, R., Johannsson, J. H., Kerndrup, G., Nordgren, A., Rosenquist, R., Swolin, B., Johannsson, B., Nordic Society of Paediatric Haematology, Oncology (NOPHO), Swedish Cytogenetic Leukaemia Study Group (SCLSG), & NOPHO Leukaemia Cytogenetic Study Group (NLCSG). (2008). Outcome of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia in the NOPHO-ALL-1992 protocol: Frequent late relapses but good overall survival. *British Journal of Haematology*, *140*(6), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.06980.x>

Frasca, L., Fedele, G., Deaglio, S., Capuano, C., Palazzo, R., Vaisitti, T., Malavasi, F., & Ausiello, C. M. (2006). CD38 orchestrates migration, survival, and Th1 immune response of human mature dendritic cells. *Blood*, *107*(6), 2392–2399. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2913>

Funaro, A., Horenstein, A. L., Calosso, L., Morra, M., Tarocco, R. P., Franco, L., De Flora, A., & Malavasi, F. (1996). Identification and characterization of an active soluble form of human CD38 in normal and pathological fluids. *International Immunology*, *8*(11), 1643–1650. <https://doi.org/10.1093/intimm/8.11.1643>

Garbati, M. R., Hays, L. E., Rathbun, R. K., Jillette, N., Chin, K., Al-Dhalimy, M., Agarwal, A., Newell, A. E. H., Olson, S. B., & Bagby, G. C. (2016). Cytokine overproduction and crosslinker hypersensitivity are unlinked in Fanconi anemia macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, *99*(3), 455–465. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0515-201R>

Geiger, T. L., & Rubnitz, J. E. (2015). New approaches for the immunotherapy of acute myeloid leukemia. *Discovery Medicine*, *19*(105), 275–284.

German, J. (1995). Bloom's Syndrome. *Dermatologic Clinics*, *13*(1), 7–18. [https://doi.org/10.1016/S0733-8635\(18\)30101-3](https://doi.org/10.1016/S0733-8635(18)30101-3)

Gessi, S., Varani, K., Merighi, S., Fogli, E., Sacchetto, V., Benini, A., Leung, E., MacLennan, S., & Borea, P. A. (2007). Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signalling*, *3*(1–2), 109–116. <https://doi.org/10.1007/s11302-006-9042-y>

Gökbuget, N., & Hoelzer, D. (2009). Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*, *46*(1), 64–75. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2008.09.003>

Grahner, A., Grahner, A., Klein, C., Schilling, E., Wehrhahn, J., & Hauschildt, S. (2011). Review: NAD⁺: a modulator of immune functions. *Innate Immunity*, *17*(2), 212–233. <https://doi.org/10.1177/1753425910361989>

- Greaves, M. (2005). In utero origins of childhood leukaemia. *Early Human Development*, *81*(1), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.10.004>
- Greaves, M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(3), 193–203. <https://doi.org/10.1038/nrc1816>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, *140*(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Hamblin, T. J., Orchard, J. A., Ibbotson, R. E., Davis, Z., Thomas, P. W., Stevenson, F. K., & Oscier, D. G. (2002). CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood*, *99*(3), 1023–1029. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.3.1023>
- Hammami, A., Allard, D., Allard, B., & Stagg, J. (2019). Targeting the adenosine pathway for cancer immunotherapy. *Seminars in Immunology*, *42*, 101304. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101304>
- Harnicar, S., Adel, N., & Jurcic, J. (2009). Modification of vincristine dosing during concomitant azole therapy in adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, *15*(3), 175–182. <https://doi.org/10.1177/1078155208101959>
- Heine, P., Braun, N., Sévigny, J., Robson, S. C., Servos, J., & Zimmermann, H. (2001). The C-terminal cysteine-rich region dictates specific catalytic properties in chimeras of the ectonucleotidases NTPDase1 and NTPDase2. *European Journal of Biochemistry*, *268*(2), 364–373. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.01896.x>
- Hiebert, S. W., Sun, W., Davis, J. N., Golub, T., Shurtleff, S., Buijs, A., Downing, J. R., Grosveld, G., Roussel, M. F., Gilliland, D. G., Lenny, N., & Meyers, S. (1996). The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Molecular and Cellular Biology*, *16*(4), 1349–1355. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.4.1349>
- Hilchey, S. P., Kobie, J. J., Cochran, M. R., Secor-Socha, S., Wang, J.-C. E., Hyrien, O., Burack, W. R., Mosmann, T. R., Quataert, S. A., & Bernstein, S. H. (2009). Human follicular lymphoma CD39⁺-infiltrating T cells contribute to adenosine-mediated T cell hyporesponsiveness. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *183*(10), 6157–6166. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900475>
- Hogan, K. A., Chini, C. C. S., & Chini, E. N. (2019). The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1187. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01187>
- Holling, T. M., Schooten, E., Langerak, A. W., & van den Elsen, P. J. (2004). Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies. *Blood*, *103*(4), 1438–1444. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1491>
- Hong, Z., Wei, Z., Xie, T., Fu, L., Sun, J., Zhou, F., Jamal, M., Zhang, Q., & Shao, L. (2021). Targeting chemokines for acute lymphoblastic leukemia therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, *14*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01060-y>

Horenstein, A. L., Chillemi, A., Zaccarello, G., Bruzzone, S., Quarona, V., Zito, A., Serra, S., & Malavasi, F. (2013). A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology*, 2(9), e26246. <https://doi.org/10.4161/onci.26246>

Horenstein, A. L., Stockinger, H., Imhof, B. A., & Malavasi, F. (1998). CD38 binding to human myeloid cells is mediated by mouse and human CD31. *The Biochemical Journal*, 330 (Pt 3)(Pt 3), 1129–1135. <https://doi.org/10.1042/bj3301129>

Hoskin, D. W., Mader, J. S., Furlong, S. J., Conrad, D. M., & Blay, J. (2008). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International Journal of Oncology*, 32(3), 527–535.

Huang, S., Apasov, S., Koshiba, M., & Sitkovsky, M. (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>

Hubert, S., Rissiek, B., Klages, K., Huehn, J., Sparwasser, T., Haag, F., Koch-Nolte, F., Boyer, O., Seman, M., & Adriouch, S. (2010). Extracellular NAD⁺ shapes the Foxp3⁺ regulatory T cell compartment through the ART2–P2X7 pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2561–2568. <https://doi.org/10.1084/jem.20091154>

Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541–1552. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1400972>

Hussin, J., Sinnott, D., Casals, F., Idaghdour, Y., Bruat, V., Saillour, V., Healy, J., Grenier, J.-C., de Malliard, T., Busche, S., Spinella, J.-F., Larivière, M., Gibson, G., Andersson, A., Holmfeldt, L., Ma, J., Wei, L., Zhang, J., Andelfinger, G., ... Awadalla, P. (2013). Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. *Genome Research*, 23(3), 419–430. <https://doi.org/10.1101/gr.144188.112>

Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)*, 381(9881), 1943–1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)

Inaba, H., & Pui, C.-H. (2010). Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet. Oncology*, 11(11), 1096–1106. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70114-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70114-5)

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. (2020, dezembro 9). *Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil*. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>

Jabbour, E., O'Brien, S., Konopleva, M., & Kantarjian, H. (2015). New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 121(15), 2517–2528. <https://doi.org/10.1002/cncr.29383>

Jeong, Y. M., Cho, H., Kim, T.-M., Kim, Y., Jeon, S., Bychkov, A., & Jung, C. K. (2020). CD73 Overexpression Promotes Progression and Recurrence of Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancers*, 12(10), E3042. <https://doi.org/10.3390/cancers12103042>

Jiang, T., Xu, X., Qiao, M., Li, X., Zhao, C., Zhou, F., Gao, G., Wu, F., Chen, X., Su, C., Ren, S., Zhai, C., & Zhou, C. (2018). Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer*, *18*(1), 267. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4073-7>

Jiménez-Morales, S., Aranda-Uribe, I. S., Pérez-Amado, C. J., Ramírez-Bello, J., & Hidalgo-Miranda, A. (2021). Mechanisms of Immunosuppressive Tumor Evasion: Focus on Acute Lymphoblastic Leukemia. *Frontiers in Immunology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.737340>

Kaku, H., Cheng, K. F., Al-Abed, Y., & Rothstein, T. L. (2014). A novel mechanism of B-cell mediated immune suppression through CD73-expression and adenosine production. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *193*(12), 5904–5913. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400336>

Kalina, T., Flores-Montero, J., van der Velden, V. H. J., Martin-Ayuso, M., Böttcher, S., Ritgen, M., Almeida, J., Lhermitte, L., Asnafi, V., Mendonça, A., de Tute, R., Cullen, M., Sedek, L., Vidriales, M. B., Pérez, J. J., te Marvelde, J. G., Mejstrikova, E., Hrusak, O., Szczepański, T., ... Orfao, A. (2012). EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*, *26*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.122>

Kamimura, T., Miyamoto, T., Harada, M., & Akashi, K. (2011). Advances in therapies for acute promyelocytic leukemia. *Cancer Science*, *102*(11), 1929–1937. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02045.x>

Kawedia, J. D., & Rytting, M. E. (2014). Asparaginase in acute lymphoblastic leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*, *14 Suppl*, S14-17. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2014.06.017>

Kebelmann-Betzing, C., Körner, G., Badiali, L., Buchwald, D., Möricke, A., Korte, A., Köchling, J., Wu, S., Kappelmeier, D., Oettel, K., Henze, G., & Seeger, K. (2001). Characterization of cytokine, growth factor receptor, costimulatory and adhesion molecule expression patterns of bone marrow blasts in relapsed childhood B cell precursor all. *Cytokine*, *13*(1), 39–50. <https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0794>

Kehrl, J. H., Miller, A., & Fauci, A. S. (1987). Effect of tumor necrosis factor alpha on mitogen-activated human B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *166*(3), 786–791. <https://doi.org/10.1084/jem.166.3.786>

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

Kinlen, L. J., & Stiller, C. (1993). Population mixing and excess of childhood leukemia. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, *306*(6882), 930. <https://doi.org/10.1136/bmj.306.6882.930-a>

Kishimoto, H., Hoshino, S., Ohori, M., Kontani, K., Nishina, H., Suzawa, M., Kato, S., & Katada, T. (1998). Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron. *The*

Journal of Biological Chemistry, 273(25), 15429–15434.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15429>

Klamer, S., & Voermans, C. (2014). The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adhesion & Migration*, 8(6), 563–577.
<https://doi.org/10.4161/19336918.2014.968501>

Knapp, K., Zebisch, M., Pippel, J., El-Tayeb, A., Müller, C. E., & Sträter, N. (2012). Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): Insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure (London, England: 1993)*, 20(12), 2161–2173.
<https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.001>

Koehler, M., Behm, F., Hancock, M., & Pui, C. H. (1993). Expression of activation antigens CD38 and CD71 is not clinically important in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 7(1), 41–45.

Kong, Y., Chang, Y.-J., Liu, Y.-R., Wang, Y.-Z., Jiang, Q., Jiang, H., Qin, Y.-Z., Hu, Y., Lai, Y.-Y., Duan, C.-W., Hong, D.-L., & Huang, X.-J. (2014). CD34+CD38-CD58- cells are leukemia-propagating cells in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 28(12), Article 12.
<https://doi.org/10.1038/leu.2014.228>

Kong, Y., Jia, B., Zhao, C., Claxton, D. F., Sharma, A., Annageldiyev, C., Fotos, J. S., Zeng, H., Paulson, R. F., Prabhu, K. S., & Zheng, H. (2019). Downregulation of CD73 associates with T cell exhaustion in AML patients. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0728-3>

Kong, Y., Yoshida, S., Saito, Y., Doi, T., Nagatoshi, Y., Fukata, M., Saito, N., Yang, S. M., Iwamoto, C., Okamura, J., Liu, K. Y., Huang, X. J., Lu, D. P., Shultz, L. D., Harada, M., & Ishikawa, F. (2008). CD34+CD38+CD19+ as well as CD34+CD38-CD19+ cells are leukemia-initiating cells with self-renewal capacity in human B-precursor ALL. *Leukemia*, 22(6), 1207–1213. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.83>

Koziak, K., Sévigny, J., Robson, S. C., Siegel, J. B., & Kaczmarek, E. (1999). Analysis of CD39/ATP diphosphohydrolase (ATPDase) expression in endothelial cells, platelets and leukocytes. *Thrombosis and Haemostasis*, 82(5), 1538–1544.

Krejcik, J., Casneuf, T., Nijhof, I. S., Verbist, B., Bald, J., Plesner, T., Syed, K., Liu, K., van de Donk, N. W. C. J., Weiss, B. M., Ahmadi, T., Lokhorst, H. M., Mutis, T., & Sasser, A. K. (2016). Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), 384–394. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-687749>

Kumar, R., Godavarthy, P. S., & Krause, D. S. (2018). The bone marrow microenvironment in health and disease at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(4), jcs201707. <https://doi.org/10.1242/jcs.201707>

Kumar, V. (2013). Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: Where to go? *Purinergic Signalling*, 9(2), 145–165.
<https://doi.org/10.1007/s11302-012-9349-9>

- Lai, R., Hirsch-Ginsberg, C. F., & Bueso-Ramos, C. (2000). Pathologic Diagnosis of Acute Lymphocytic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *14*(6), 1209–1235. [https://doi.org/10.1016/S0889-8588\(05\)70183-0](https://doi.org/10.1016/S0889-8588(05)70183-0)
- Larson, R. A., & Anastasi, J. (2008). Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification. In E. H. Estey, S. H. Faderl, & H. M. Kantarjian (Eds.), *Acute Leukemias* (p. 109–118). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-72304-2_7
- Le Dieu, R., Taussig, D. C., Ramsay, A. G., Mitter, R., Miraki-Moud, F., Fatah, R., Lee, A. M., Lister, T. A., & Gribben, J. G. (2009). Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood*, *114*(18), 3909–3916. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-206946>
- Lee, H. C., Zocchi, E., Guida, L., Franco, L., Benatti, U., & DeFlora, A. (1993). Production and Hydrolysis of Cyclic ADP-Ribose at the Outer Surface of Human Erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *191*(2), 639–645. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1265>
- Lee, Y., Park, J., Park, S.-H., & Shin, E.-C. (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), 195.2-195.2.
- Lemmens, R., Vanduffel, L., Teuchy, H., & Culic, O. (1996). Regulation of proliferation of LLC-MK2 cells by nucleosides and nucleotides: The role of ecto-enzymes. *The Biochemical Journal*, *316* (Pt 2), 551–557. <https://doi.org/10.1042/bj3160551>
- Liao, C., Shen, D.-Y., Xu, X.-J., Song, H., Xu, W.-Q., Zhao, F.-Y., Yang, S.-L., & Tang, Y.-M. (2020). High CD38 expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia is not associated with prognosis. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, *27*(2), 277–284. <https://doi.org/10.3233/CBM-190946>
- Lim, J. Y.-S., Bhatia, S., Robison, L. L., & Yang, J. J. (2014). Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, *120*(7), 955–962. <https://doi.org/10.1002/cncr.28531>
- Lin, W.-W., & Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *Journal of Clinical Investigation*, *117*(5), 1175–1183. <https://doi.org/10.1172/JCI31537>
- Liu, L., Chang, Y.-J., Xu, L.-P., Zhang, X.-H., Wang, Y., Liu, K.-Y., & Huang, X.-J. (2018). T cell exhaustion characterized by compromised MHC class I and II restricted cytotoxic activity associates with acute B lymphoblastic leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *190*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.02.009>
- Liu, Y. J., & Arpin, C. (1997). Germinal center development. *Immunological Reviews*, *156*, 111–126. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb00963.x>
- Lohr, L. (2008). Chemotherapy-induced nausea and vomiting. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *14*(2), 85–93. <https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e31816a0f07>

- Long, J., Liu, S., Li, K., Zhou, X., Zhang, P., & Zou, L. (2014). High proportion of CD34⁺/CD38⁻ cells is positively correlated with poor prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *55*(3), 611–617. <https://doi.org/10.3109/10428194.2013.807924>
- Longhi, M. S., Moss, A., Bai, A., Wu, Y., Huang, H., Cheifetz, A., Quintana, F. J., & Robson, S. C. (2014). Characterization of Human CD39⁺ Th17 Cells with Suppressor Activity and Modulation in Inflammatory Bowel Disease. *PLOS ONE*, *9*(2), e87956. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087956>
- Lu, X.-X., Chen, Y.-T., Feng, B., Mao, X.-B., Yu, B., & Chu, X.-Y. (2013). Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1 α in gastric carcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *19*(12), 1912–1918. <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i12.1912>
- Luczyński, W., Stasiak-Barmuta, A., Hendo, E., Kovalchuk, O., Krawczuk-Rybak, M., Malinowska, I., Mitura-Lesiuk, M., Chyczewski, L., Matysiak, M., Kowalczyk, J., & Jaworowski, R. (2006). Low expression of costimulatory molecules and mRNA for cytokines are important mechanisms of immunosuppression in acute lymphoblastic leukemia in children? *Neoplasma*, *53*(4), 301–304.
- Luo, Y. P., Huang, Z. G., & Qian, H. J. (1993). Tumor necrosis factor and interleukin 6 in acute leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, *32*(2), 85–87.
- Malard, F., & Mohty, M. (2020). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *395*(10230), 1146–1162. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)33018-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)33018-1)
- Malavasi, F., Deaglio, S., Damle, R., Cutrona, G., Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (2011). CD38 and chronic lymphocytic leukemia: A decade later. *Blood*, *118*(13), 3470–3478. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-275610>
- Malavasi, F., Deaglio, S., Funaro, A., Ferrero, E., Horenstein, A. L., Ortolan, E., Vaisitti, T., & Aydin, S. (2008). Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiological Reviews*, *88*(3), 841–886. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2007>
- Malavasi, F., Funaro, A., Alessio, M., DeMonte, L. B., Ausiello, C. M., Dianzani, U., Lanza, F., Magrini, E., Momo, M., & Roggero, S. (1992). CD38: A multi-lineage cell activation molecule with a split personality. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, *22*(2), 73–80. <https://doi.org/10.1007/BF02591400>
- Maliszewski, C. R., Delespesse, G. J., Schoenborn, M. A., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Poindexter, K., & Birks, C. (1994). The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *153*(8), 3574–3583.
- Mannelli, F. (2016). Immunophenotyping of Acute Leukemias – From Biology to Clinical Application. *Em Flow Cytometry—Select Topics*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/62332>
- Mariathasan, S., & Monack, D. M. (2007). Inflammasome adaptors and sensors: Intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, *7*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1038/nri1997>

- Mello, P. de A., Filippi-Chiela, E. C., Nascimento, J., Beckenkamp, A., Santana, D. B., Kipper, F., Casali, E. A., Nejar Bruno, A., Pაცეც, J. D., Zerbini, L. F., Wink, M. R., Lenz, G., & Buffon, A. (2014). Adenosine uptake is the major effector of extracellular ATP toxicity in human cervical cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(19), 2905–2918. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-01-0042>
- Minor, M., Alcedo, K. P., Battaglia, R. A., & Snider, N. T. (2019). Cell type- and tissue-specific functions of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 317(6), C1079–C1092. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00285.2019>
- Moorman, A. V. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews*, 26(3), 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.01.001>
- Moorman, A. V., Ensor, H. M., Richards, S. M., Chilton, L., Schwab, C., Kinsey, S. E., Vora, A., Mitchell, C. D., & Harrison, C. J. (2010). Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *The Lancet. Oncology*, 11(5), 429–438. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70066-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70066-8)
- Morandi, F., Airoidi, I., Marimpietri, D., Bracci, C., Faini, A. C., & Gramignoli, R. (2019). CD38, a Receptor with Multifunctional Activities: From Modulatory Functions on Regulatory Cell Subsets and Extracellular Vesicles, to a Target for Therapeutic Strategies. *Cells*, 8(12), E1527. <https://doi.org/10.3390/cells8121527>
- Morandi, F., Horenstein, A. L., Costa, F., Giuliani, N., Pistoia, V., & Malavasi, F. (2018). CD38: A Target for Immunotherapeutic Approaches in Multiple Myeloma. *Frontiers in Immunology*, 9, 2722. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02722>
- Moreau, C., Liu, Q., Graeff, R., Wagner, G. K., Thomas, M. P., Swarbrick, J. M., Shuto, S., Lee, H. C., Hao, Q., & Potter, B. V. L. (2013). CD38 Structure-Based Inhibitor Design Using the N1-Cyclic Inosine 5'-Diphosphate Ribose Template. *PLOS ONE*, 8(6), e66247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066247>
- Mori, H., Colman, S. M., Xiao, Z., Ford, A. M., Healy, L. E., Donaldson, C., Hows, J. M., Navarrete, C., & Greaves, M. (2002). Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), 8242–8247. <https://doi.org/10.1073/pnas.112218799>
- Moriyama, T., Relling, M. V., & Yang, J. J. (2015). Inherited genetic variation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 125(26), 3988–3995. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-580001>
- Mrózek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(5), 991–1010, v. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.07.001>
- Mullighan, C. G. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2012, 389–396. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2012.1.389>

- Naik, J., Themeli, M., de Jong-Korlaar, R., Ruiter, R. W. J., Poddighe, P. J., Yuan, H., de Bruijn, J. D., Ossenkoppele, G. J., Zweegman, S., Smit, L., Mutis, T., Martens, A. C. M., van de Donk, N. W. C. J., & Groen, R. W. J. (2019). CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *104*(3), e100–e103. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.192757>
- Nakagawara, K., Mori, M., Takasawa, S., Nata, K., Takamura, T., Berlova, A., Tohgo, A., Karasawa, T., Yonekura, H., & Takeuchi, T. (1995). Assignment of CD38, the gene encoding human leukocyte antigen CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase), to chromosome 4p15. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *69*(1–2), 38–39. <https://doi.org/10.1159/000133933>
- Nata, K., Takamura, T., Karasawa, T., Kumagai, T., Hashioka, W., Tohgo, A., Yonekura, H., Takasawa, S., Nakamura, S., & Okamoto, H. (1997). Human gene encoding CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase): Organization, nucleotide sequence and alternative splicing. *Gene*, *186*(2), 285–292. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00723-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00723-8)
- Noble, A., Mehta, H., Lovell, A., Papaioannou, E., & Fairbanks, L. (2016). IL-12 and IL-4 activate a CD39-dependent intrinsic peripheral tolerance mechanism in CD8(+) T cells. *European Journal of Immunology*, *46*(6), 1438–1448. <https://doi.org/10.1002/eji.201545939>
- Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K., Huang, X., Caldwell, S., Liu, K., Smith, P., Chen, J.-F., Jackson, E. K., Apasov, S., Abrams, S., & Sitkovsky, M. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(35), 13132–13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>
- Ohta, A., Kini, R., Ohta, A., Subramanian, M., Madasu, M., & Sitkovsky, M. (2012). The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Frontiers in Immunology*, *3*, 190. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00190>
- Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2001). Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature*, *414*(6866), 916–920. <https://doi.org/10.1038/414916a>
- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., & Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*, *84*(2), 321–330. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80986-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80986-1)
- O'Neill, L. A. (1995). Interleukin-1 signal transduction. *International Journal of Clinical & Laboratory Research*, *25*(4), 169–177. <https://doi.org/10.1007/BF02592694>
- Papanikolaou, A., Papafotika, A., Murphy, C., Papamarcaki, T., Tsolas, O., Drab, M., Kurzchalia, T. V., Kasper, M., & Christoforidis, S. (2005). Cholesterol-dependent lipid assemblies regulate the activity of the ecto-nucleotidase CD39. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(28), 26406–26414. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413927200>

- Parry-Jones, N., Matutes, E., Morilla, R., Brito-Babapulle, V., Wotherspoon, A., Swansbury, G. J., & Catovsky, D. (2007). Cytogenetic abnormalities additional to t(11;14) correlate with clinical features in leukaemic presentation of mantle cell lymphoma, and may influence prognosis: A study of 60 cases by FISH. *British Journal of Haematology*, *137*(2), 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06526.x>
- Pastorczak, A., Domka, K., Fidyk, K., Poprzeczko, M., & Firczuk, M. (2021). Mechanisms of Immune Evasion in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers*, *13*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/cancers13071536>
- Patton, D. T., Wilson, M. D., Rowan, W. C., Soond, D. R., & Okkenhaug, K. (2011). The PI3K p110 δ Regulates Expression of CD38 on Regulatory T Cells. *PLoS ONE*, *6*(3), e17359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017359>
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, *91*(11), 1645–1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>
- Paulsson, K., Forestier, E., Lilljebjörn, H., Heldrup, J., Behrendtz, M., Young, B. D., & Johansson, B. (2010). Genetic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(50), 21719–21724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006981107>
- Paulsson, K., & Johansson, B. (2009). High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *48*(8), 637–660. <https://doi.org/10.1002/gcc.20671>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell metabolism*, *23*(1), 27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pavón, E. J., Zumaquero, E., Rosal-Vela, A., Khoo, K.-M., Cerezo-Wallis, D., García-Rodríguez, S., Carrascal, M., Abian, J., Graeff, R., Callejas-Rubio, J.-L., Ortego-Centeno, N., Malavasi, F., Zubiaur, M., & Sancho, J. (2013). Increased CD38 expression in T cells and circulating anti-CD38 IgG autoantibodies differentially correlate with distinct cytokine profiles and disease activity in systemic lupus erythematosus patients. *Cytokine*, *62*(2), 232–243. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.02.023>
- PDQ Pediatric Treatment Editorial Board. (2002). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®): Health Professional Version. Em *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65763/>
- Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., & Virgilio, F. D. (2008). Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. *PLOS ONE*, *3*(7), e2599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002599>
- Petrova, V., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Melino, G., & Amelio, I. (2018). The hypoxic tumour microenvironment. *Oncogenesis*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>

- Puchałowicz, K., Tarnowski, M., Tkacz, M., Chlubek, D., Kłos, P., & Dziedziejko, V. (2020). Extracellular Adenine Nucleotides and Adenosine Modulate the Growth and Survival of THP-1 Leukemia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(12), 4425. <https://doi.org/10.3390/ijms21124425>
- Puente, X. S., Jares, P., & Campo, E. (2018). Chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma: Crossroads of genetic and microenvironment interactions. *Blood*, *131*(21), 2283–2296. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-10-764373>
- Pui, C. H., Campana, D., & Evans, W. E. (2001). Childhood acute lymphoblastic leukaemia—Current status and future perspectives. *The Lancet. Oncology*, *2*(10), 597–607. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00516-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00516-2)
- Pui, C.-H., Relling, M. V., & Downing, J. R. (2004). Acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *350*(15), 1535–1548. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023001>
- Pui, C.-H., Robison, L. L., & Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *371*(9617), 1030–1043. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60457-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60457-2)
- Pulte, D., Furman, R. R., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H. F., Ballard, H. S., Olson, K. E., Kizer, J. R., & Marcus, A. J. (2011). CD39 Expression on T Lymphocytes Correlates With Severity of Disease in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, *11*(4), 367–372. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2011.06.005>
- Quail, D. F., & Joyce, J. A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, *19*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1038/nm.3394>
- Quarona, V., Zaccarello, G., Chillemi, A., Brunetti, E., Singh, V. K., Ferrero, E., Funaro, A., Horenstein, A. L., & Malavasi, F. (2013). CD38 and CD157: A long journey from activation markers to multifunctional molecules. *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, *84*(4), 207–217. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21092>
- Ramakers, B. P., Wever, K. E., Kox, M., van den Broek, P. H., Mbuyi, F., Rongen, G., Masereeuw, R., van der Hoeven, J. G., Smits, P., Riksen, N. P., & Pickkers, P. (2012). How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans in vivo. *Critical Care Medicine*, *40*(9), 2609–2616. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318259205b>
- Ran L. (2019). Prognostic Significance of Peripheral Blood Lymphocyte Subsets in Patients with Hematologic Malignancies. *China Biotechnology*, *39*(9), 50–57. <https://doi.org/10.13523/j.cb.20190907>
- Resta, R., Yamashita, Y., & Thompson, L. F. (1998). Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunological Reviews*, *161*, 95–109. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1998.tb01574.x>
- Reusing, S. B., Manser, A. R., Enczmann, J., Mulder, A., Claas, F. H., Carrington, M., Fischer, J. C., Borkhardt, A., Babor, F., & Uhrberg, M. (2016). Selective downregulation of HLA-C and HLA-E in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *174*(3), 477–480. <https://doi.org/10.1111/bjh.13777>

- Ribeiro, R. C., Abromowitch, M., Raimondi, S. C., Murphy, S. B., Behm, F., & Williams, D. L. (1987). Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *70*(4), 948–953.
- Rieckmann, P., D'Alessandro, F., Nordan, R. P., Fauci, A. S., & Kehrl, J. H. (1991). IL-6 and tumor necrosis factor-alpha. Autocrine and paracrine cytokines involved in B cell function. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *146*(10), 3462–3468.
- Rittiner, J. E., Korboukh, I., Hull-Ryde, E. A., Jin, J., Janzen, W. P., Frye, S. V., & Zylka, M. J. (2012). AMP Is an Adenosine A1 Receptor Agonist. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(8), 5301–5309. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291666>
- Rizzari, C., Conter, V., Starý, J., Colombini, A., Moericke, A., & Schrappe, M. (2013). Optimizing asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Current Opinion in Oncology*, *25 Suppl 1*, S1-9. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32835d7d85>
- Romero-Ramírez, H., Morales-Guadarrama, M. T., Pelayo, R., López-Santiago, R., & Santos-Argumedo, L. (2015). CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinase-mediated apoptosis. *Immunology*, *144*(2), 271–281. <https://doi.org/10.1111/imm.12370>
- Rose-Inman, H., & Kuehl, D. (2017). Acute Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, *31*(6), 1011–1028. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.006>
- Rossi, L., Salvestrini, V., Ferrari, D., Di Virgilio, F., & Lemoli, R. M. (2012). The sixth sense: Hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood*, *120*(12), 2365–2375. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422378>
- Sakhinia, E., Farhangpour, M., Tholouli, E., Liu Yin, J. A., Hoyland, J. A., & Byers, R. J. (2006). Comparison of gene-expression profiles in parallel bone marrow and peripheral blood samples in acute myeloid leukaemia by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Pathology*, *59*(10), 1059–1065. <https://doi.org/10.1136/jcp.2005.031161>
- Salzer, W. L., Devidas, M., Carroll, W. L., Winick, N., Pullen, J., Hunger, S. P., & Camitta, B. A. (2010). Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984–2001: A report from the children's oncology group. *Leukemia*, *24*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.261>
- Santoemma, P. P., & Powell, D. J. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *16*(6), 807–820. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1040960>
- Savic, V., Stefanovic, V., Ardaillou, N., & Ardaillou, R. (1990). Induction of ecto-5'-nucleotidase of rat cultured mesangial cells by interleukin-1 beta and tumour necrosis factor-alpha. *Immunology*, *70*(3), 321–326.
- Saze, Z., Schuler, P. J., Hong, C.-S., Cheng, D., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (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>
- Schena, F., Volpi, S., Faliti, C. E., Penco, F., Santi, S., Proietti, M., Schenk, U., Damonte, G., Salis, A., Bellotti, M., Fais, F., Tenca, C., Gattorno, M., Eibel, H., Rizzi,

M., Warnatz, K., Idzko, M., Ayata, C. K., Rakhmanov, M., ... Traggiai, E. (2013). Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell Reports*, 3(6), 1824–1831. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.022>

Schmiegelow, K., Vestergaard, T., Nielsen, S. M., & Hjalgrim, H. (2008). Etiology of common childhood acute lymphoblastic leukemia: The adrenal hypothesis. *Leukemia*, 22(12), 2137–2141. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.212>

Schuler, P. J., Saze, Z., Hong, C.-S., Muller, L., Gillespie, D. G., Cheng, D., Harasymczuk, M., Mandapathil, M., Lang, S., Jackson, E. K., & Whiteside, T. L. (2014). Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 177(2), 531–543. <https://doi.org/10.1111/cei.12354>

Schultz, K. R., Bowman, W. P., Aledo, A., Slayton, W. B., Sather, H., Devidas, M., Wang, C., Davies, S. M., Gaynon, P. S., Trigg, M., Rutledge, R., Burden, L., Jorstad, D., Carroll, A., Heerema, N. A., Winick, N., Borowitz, M. J., Hunger, S. P., Carroll, W. L., & Camitta, B. (2009). Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A children's oncology group study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(31), 5175–5181. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.21.2514>

Schumacher, H. R., Alvares, C. J., Blough, R. I., & Mazzella, F. (2002). Acute leukemia. *Clinics in Laboratory Medicine*, 22(1), 153–192. [https://doi.org/10.1016/S0272-2712\(03\)00071-4](https://doi.org/10.1016/S0272-2712(03)00071-4)

Sędek, Ł., Theunissen, P., Sobral da Costa, E., van der Sluijs-Gelling, A., Mejstrikova, E., Gaipa, G., Sonsala, A., Twardoch, M., Oliveira, E., Novakova, M., Buracchi, C., van Dongen, J. J. M., Orfao, A., van der Velden, V. H. J., Szczepański, T., & EuroFlow Consortium. (2019). Differential expression of CD73, CD86 and CD304 in normal vs. Leukemic B-cell precursors and their utility as stable minimal residual disease markers in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Immunological Methods*, 475, 112429. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2018.03.005>

Sek, K., Mølck, C., Stewart, G. D., Kats, L., Darcy, P. K., & Beavis, P. A. (2018). Targeting Adenosine Receptor Signaling in Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), E3837. <https://doi.org/10.3390/ijms19123837>

Serra, S., Horenstein, A. L., Vaisitti, T., Brusa, D., Rossi, D., Laurenti, L., D'Arena, G., Coscia, M., Tripodo, C., Inghirami, G., Robson, S. C., Gaidano, G., Malavasi, F., & Deaglio, S. (2011). CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood*, 118(23), 6141–6152. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-374728>

Serra, S., Vaisitti, T., Audrito, V., Bologna, C., Buonincontri, R., Chen, S.-S., Arruga, F., Brusa, D., Coscia, M., Jaksic, O., Inghirami, G., Rossi, D., Furman, R. R., Robson, S. C., Gaidano, G., Chiorazzi, N., & Deaglio, S. (2016). Adenosine signaling mediates hypoxic responses in the chronic lymphocytic leukemia microenvironment. *Blood Advances*, 1(1), 47–61. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000984>

Sevilla, D. W., Colovai, A. I., Emmons, F. N., Bhagat, G., & Alobeid, B. (2010). Hematogones: A review and update. *Leukemia & Lymphoma*, *51*(1), 10–19. <https://doi.org/10.3109/10428190903370346>

Shafat, M. S., Gnanaswaran, B., Bowles, K. M., & Rushworth, S. A. (2017). The bone marrow microenvironment—Home of the leukemic blasts. *Blood Reviews*, *31*(5), 277–286. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.03.004>

Shandilya, M., Sharma, S., Das, P. P., Charak, S., Shandilya, M., Sharma, S., Das, P. P., & Charak, S. (2020). Molecular-Level Understanding of the Anticancer Action Mechanism of Anthracyclines. *Em Advances in Precision Medicine Oncology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94180>

Short, N. J., Jabbour, E., Albitar, M., de Lima, M., Gore, L., Jorgensen, J., Logan, A. C., Park, J., Ravandi, F., Shah, B., Radich, J., & Kantarjian, H. (2019). Recommendations for the Assessment and Management of Measurable Residual Disease in Adults With Acute Lymphoblastic Leukemia: A Consensus of North American Experts. *American journal of hematology*, *94*(2), 257–265. <https://doi.org/10.1002/ajh.25338>

Shubinsky, G., & Schlesinger, M. (1997). The CD38 lymphocyte differentiation marker: New insight into its ectoenzymatic activity and its role as a signal transducer. *Immunity*, *7*(3), 315–324. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80353-2](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80353-2)

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *72*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

Sison, E. A. R., & Brown, P. (2013). Does hematopoietic stem cell transplantation benefit infants with acute leukemia? *Hematology*, *2013*(1), 601–604. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2013.1.601>

Sitkovsky, M., & Lukashev, D. (2005). Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nature Reviews. Immunology*, *5*(9), 712–721. <https://doi.org/10.1038/nri1685>

Smyth, M. J., Dunn, G. P., & Schreiber, R. D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: The roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in Immunology*, *90*, 1–50. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7)

Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M. W. L., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2011). CD73-Deficient Mice Have Increased Antitumor Immunity and Are Resistant to Experimental Metastasis. *Cancer Research*, *71*(8), 2892–2900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246>

Stagg, J., & Smyth, M. J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*, *29*(39), 5346–5358. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.292>

Stanworth, S. J., Estcourt, L. J., Powter, G., Kahan, B. C., Dyer, C., Choo, L., Bakrania, L., Llewelyn, C., Littlewood, T., Soutar, R., Norfolk, D., Copplestone, A., Smith, N.,

Kerr, P., Jones, G., Raj, K., Westerman, D. A., Szer, J., Jackson, N., ... Murphy, M. F. (2013). A No-Prophylaxis Platelet-Transfusion Strategy for Hematologic Cancers. *New England Journal of Medicine*, 368(19), 1771–1780. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1212772>

Stein, P., Peiper, S., Butler, D., Melvin, S., Williams, D., & Stass, S. (1983). Granular acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*, 79(4), 426–430. <https://doi.org/10.1093/ajcp/79.4.426>

Studd, J. B., Yang, M., Li, Z., Vijayakrishnan, J., Lu, Y., Yeoh, A. E.-J., Paulsson, K., & Houlston, R. S. (2019). Genetic predisposition to B-cell acute lymphoblastic leukemia at 14q11.2 is mediated by a CEBPE promoter polymorphism. *Leukemia*, 33(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0184-z>

Stumpel, D. J. P. M., Schotte, D., Lange-Turenhout, E. a. M., Schneider, P., Seslija, L., de Menezes, R. X., Marquez, V. E., Pieters, R., den Boer, M. L., & Stam, R. W. (2011). Hypermethylation of specific microRNA genes in MLL-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia: Major matters at a micro scale. *Leukemia*, 25(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.282>

Sung, S. S., Jung, L. K., Walters, J. A., Chen, W., Wang, C. Y., & Fu, S. M. (1988). Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cell lines and tonsillar B cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 168(5), 1539–1551. <https://doi.org/10.1084/jem.168.5.1539>

Surprenant, A., & North, R. A. (2009). Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual Review of Physiology*, 71, 333–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630>

Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(2), 652–656. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708594105>

Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N., Jaffe, E., Pileri, S., Stein, H., Thiele, J., & Vardiman, J. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* [WEB SITE]. https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/786623

Szczepański, T., Orfão, A., van der Velden, V. H., San Miguel, J. F., & van Dongen, J. J. (2001). Minimal residual disease in leukaemia patients. *The Lancet. Oncology*, 2(7), 409–417. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(00\)00418-6](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(00)00418-6)

Tai, Y.-T., & Anderson, K. C. (2016). A new era of immune therapy in multiple myeloma. *Blood*, 128(3), 318–319. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-719856>

Tembhare, P. R., Sriram, H., Khanka, T., Chatterjee, G., Panda, D., Ghogale, S., Badrinath, Y., Deshpande, N., Patkar, N. V., Narula, G., Bagal, B., Jain, H., Sengar, M., Khattry, N., Banavali, S., Gujral, S., & Subramanian, P. G. (2020). Flow cytometric evaluation of CD38 expression levels in the newly diagnosed T-cell acute lymphoblastic leukemia and the effect of chemotherapy on its expression in measurable residual disease, refractory disease and relapsed disease: An implication for anti-CD38

immunotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1), e000630. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000630>

Tenca, C., Merlo, A., Zarcone, D., Saverino, D., Bruno, S., De Santanna, A., Ramarli, D., Fabbì, M., Pesce, C., Deaglio, S., Ciccone, E., Malavasi, F., & Grossi, C. E. (2003). Death of T cell precursors in the human thymus: A role for CD38. *International Immunology*, 15(9), 1105–1116. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg111>

Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: A comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, 7(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>

Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: More than just a “danger signal”. *Science Signaling*, 2(56), pe6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.256pe6>

Treviño, L. R., Yang, W., French, D., Hunger, S. P., Carroll, W. L., Devidas, M., Willman, C., Neale, G., Downing, J., Raimondi, S. C., Pui, C.-H., Evans, W. E., & Relling, M. V. (2009). Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, 41(9), 1001–1005. <https://doi.org/10.1038/ng.432>

Tripathi, A., Lin, E., Xie, W., Flaifel, A., Steinharter, J. A., Stern Gatof, E. N., Bouchard, G., Fleischer, J. H., Martinez-Chanza, N., Gray, C., Mantia, C., Thompson, L., Wei, X. X., Giannakis, M., McGregor, B. A., Choueiri, T. K., Agarwal, N., McDermott, D. F., Signoretti, S., & Harshman, L. C. (2020). Prognostic significance and immune correlates of CD73 expression in renal cell carcinoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(2), e001467. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001467>

Vaisitti, T., Arruga, F., & Deaglio, S. (2018). Targeting the Adenosinergic Axis in Chronic Lymphocytic Leukemia: A Way to Disrupt the Tumor Niche? *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 1167. <https://doi.org/10.3390/ijms19041167>

Vaisitti, T., Arruga, F., Guerra, G., & Deaglio, S. (2019). Ectonucleotidases in Blood Malignancies: A Tale of Surface Markers and Therapeutic Targets. *Frontiers in Immunology*, 10, 2301. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02301>

Valent, P., Bonnet, D., De Maria, R., Lapidot, T., Copland, M., Melo, J. V., Chomienne, C., Ishikawa, F., Schuringa, J. J., Stassi, G., Huntly, B., Herrmann, H., Soulier, J., Roesch, A., Schuurhuis, G. J., Wöhrer, S., Arock, M., Zuber, J., Cerny-Reiterer, S., ... Eaves, C. (2012). Cancer stem cell definitions and terminology: The devil is in the details. *Nature Reviews. Cancer*, 12(11), 767–775. <https://doi.org/10.1038/nrc3368>

van de Donk, N. W. C. J., Richardson, P. G., & Malavasi, F. (2018). CD38 antibodies in multiple myeloma: Back to the future. *Blood*, 131(1), 13–29. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-740944>

van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., van der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepański, T., Kalina, T., de Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., ... Orfao, A. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive

and malignant leukocytes. *Leukemia*, 26(9), Article 9.
<https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>

Verma, A., Deb, D. K., Sassano, A., Uddin, S., Varga, J., Wickrema, A., & Plataniias, L. C. (2002). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase mediates the suppressive effects of type I interferons and transforming growth factor-beta on normal hematopoiesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(10), 7726–7735.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M106640200>

Voronov, E., Shouval, D. S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C. A., & Apte, R. N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2645–2650. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437939100>

Vultaggio-Poma, V., Sarti, A. C., & Di Virgilio, F. (2020). Extracellular ATP: A Feasible Target for Cancer Therapy. *Cells*, 9(11), 2496.
<https://doi.org/10.3390/cells9112496>

Wang, J. C. Y., & Dick, J. E. (2005). Cancer stem cells: Lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*, 15(9), 494–501. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.004>

Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R., & Orkin, S. H. (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *The EMBO Journal*, 16(14), 4374–4383.
<https://doi.org/10.1093/emboj/16.14.4374>

Wang, L., Wang, H., Li, P., Lu, Y., Xia, Z., Huang, H., & Zhang, Y. (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), 1381–1388.
<https://doi.org/10.1007/s00277-015-2359-2>

Wang, W., Gao, L., Li, Y., Li, Z.-L., Gong, M., Huang, F.-Z., Chen, Y.-R., Zhang, C.-X., Gao, Y.-Y., & Ma, Y.-G. (2016). The application of CD73 in minimal residual disease monitoring using flow cytometry in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 57(5), 1174–1181.
<https://doi.org/10.3109/10428194.2015.1070153>

Wang, Y., Chen, J., Li, J., Deng, J., Rui, Y., Lu, Q., Wang, M., Tong, N., Zhang, Z., & Fang, Y. (2013). Association of three polymorphisms in ARID5B, IKZF1 and CEBPE with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. *Gene*, 524(2), 203–207. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.028>

Welner, R. S., Amabile, G., Bararia, D., Czibere, A., Yang, H., Zhang, H., Pontes, L. L. D. F., Ye, M., Levantini, E., Ruscio, A. D., Martinelli, G., & Tenen, D. G. (2015). Treatment of chronic myelogenous leukemia by blocking cytokine alterations found in normal stem and progenitor cells. *Cancer cell*, 27(5), 671–681.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.04.004>

Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 46(10), 317–352.
<https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>

- Wieten, E., van der Linden-Schrever, B. E. M., Sonneveld, E., Veerman, A. J., & Pieters, R. (2011). CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *25*(8), 1374–1376. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.174>
- Witkowski, M. T., Dolgalev, I., Evensen, N. A., Ma, C., Chambers, T., Roberts, K. G., Sreeram, S., Dai, Y., Tikhonova, A. N., Lasry, A., Qu, C., Pei, D., Cheng, C., Robbins, G. A., Pierro, J., Selvaraj, S., Mezzano, V., Daves, M., Lupo, P. J., ... Aifantis, I. (2020). Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*, *37*(6), 867–882.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.04.015>
- Woo, J. S., Alberti, M. O., & Tirado, C. A. (2014). Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Experimental Hematology & Oncology*, *3*, 16. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-3-16>
- Woodward, E. L., Olsson, M. L., Johansson, B., & Paulsson, K. (2014). Allelic variants of PRDM9 associated with high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *166*(6), 947–949. <https://doi.org/10.1111/bjh.12914>
- World Health Organization. (2001). *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC.
- World Health Organization. (2009, março 15). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* [WEB SITE]. https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/786623
- Xu, L., Liu, L., Yao, D., Zeng, X., Zhang, Y., Lai, J., Zhong, J., Zha, X., Zheng, R., Lu, Y., Li, M., Jin, Z., Hebbar Subramanyam, S., Chen, S., Huang, X., & Li, Y. (2021). PD-1 and TIGIT Are Highly Co-Expressed on CD8+ T Cells in AML Patient Bone Marrow. *Frontiers in Oncology*, *11*, 686156. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.686156>
- Yegutkin, G. G. (2008). Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1783*(5), 673–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>
- Yegutkin, G. G. (2014). Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *49*(6), 473–497. <https://doi.org/10.3109/10409238.2014.953627>
- Yu, N., Zhang, Y., Li, J., Gu, W., Yue, S., Li, B., Meng, F., Sun, H., Haag, R., Yuan, J., & Zhong, Z. (2021). Daratumumab Immunopolymersome-Enabled Safe and CD38-Targeted Chemotherapy and Depletion of Multiple Myeloma. *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, *33*(39), e2007787. <https://doi.org/10.1002/adma.202007787>
- Yu, X., Zhang, Z., Wang, Z., Wu, P., Qiu, F., & Huang, J. (2016). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *18*(5), 497–506. <https://doi.org/10.1007/s12094-015-1391-y>

- Zamora, A. E., Crawford, J. C., Allen, E. K., Guo, X. J., Bakke, J., Carter, R. A., Abdelsamed, H. A., Moustaki, A., Li, Y., Chang, T.-C., Awad, W., Dallas, M. H., Mullighan, C. G., Downing, J. R., Geiger, T. L., Chen, T., Green, D. R., Youngblood, B. A., Zhang, J., & Thomas, P. G. (2019). Pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia generate abundant and functional neoantigen-specific CD8⁺ T cell responses. *Science Translational Medicine*, *11*(498), eaat8549. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat8549>
- Zamora, A. E., Crawford, J. C., & Thomas, P. G. (2018). Hitting the Target: How T Cells Detect and Eliminate Tumors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *200*(2), 392–399. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701413>
- Zappavigna, S., Cossu, A. M., Grimaldi, A., Bocchetti, M., Ferraro, G. A., Nicoletti, G. F., Filosa, R., & Caraglia, M. (2020). Anti-Inflammatory Drugs as Anticancer Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms21072605>
- Zawitkowska, J., Lejman, M., Romiszewski, M., Matysiak, M., Ćwiklińska, M., Balwierz, W., Owoc-Lempach, J., Kazanowska, B., Derwich, K., Wachowiak, J., Niedźwiecki, M., Adamkiewicz-Drożyńska, E., Trelińska, J., Młynarski, W., Kołtan, A., Wysocki, M., Tomaszewska, R., Szczepański, T., Płonowski, M., ... Kowalczyk, J. (2020). Results of two consecutive treatment protocols in Polish children with acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports*, *10*(1), 20168. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75860-6>
- Zhang, B., Ho, Y. W., Huang, Q., Maeda, T., Lin, A., Lee, S., Hair, A., Holyoake, T. L., Huettner, C., & Bhatia, R. (2012). Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, *21*(4), 577. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.018>
- Zhang, B., Song, B., Wang, X., Chang, X.-S., Pang, T., Zhang, X., Yin, K., & Fang, G.-E. (2015). The expression and clinical significance of CD73 molecule in human rectal adenocarcinoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(7), 5459–5466. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3212-x>
- Zhang, Y., & Rowley, J. D. (2013). Chapter 75—Leukemias, Lymphomas, and Other Related Disorders. Em D. Rimoïn, R. Pyeritz, & B. Korf (Orgs.), *Emery and Rimoïn's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition)* (p. 1–44). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-383834-6.00079-3>
- Zhong, X., Malhotra, R., Woodruff, R., & Guidotti, G. (2001). Mammalian plasma membrane ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1, CD39, is not active intracellularly. The N-glycosylation state of CD39 correlates with surface activity and localization. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(44), 41518–41525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104415200>
- Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Peripheral CD4⁺ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunological Reviews*, *238*(1), 247–262. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00951.x>

Ziegler, M. (2000). New functions of a long-known molecule. Emerging roles of NAD in cellular signaling. *European Journal of Biochemistry*, 267(6), 1550–1564. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01187.x>

Zimmermann, H. (2000). Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4–5), 299–309. <https://doi.org/10.1007/s002100000309>

Zimmermann, H. (2021). History of ectonucleotidases and their role in purinergic signaling. *Biochemical Pharmacology*, 187, 114322. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114322>

Zimmermann, H., Zebisch, M., & Sträter, N. (2012). Ye. *Purinergic Signalling*, 8(3), 437–502. <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9309-4>




Zocchi, E., Franco, L., Guida, L., Benatti, U., Bargellesi, A., Malavasi, F., Lee, H. C., & De Flora, A. (1993). A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 196(3), 1459–1465. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2416>

Zubiaur, M., Fernández, O., Ferrero, E., Salmerón, J., Malissen, B., Malavasi, F., & Sancho, J. (2002). CD38 is associated with lipid rafts and upon receptor stimulation leads to Akt/protein kinase B and Erk activation in the absence of the CD3-zeta immune receptor tyrosine-based activation motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 13–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M107474200>

Zupo, S., Isnardi, L., Megna, M., Massara, R., Malavasi, F., Dono, M., Cosulich, E., & Ferrarini, M. (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), 1365–1374.

9. ANEXOS

9.1 Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

		
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós Graduação Carta de Aprovação		
Projeto 2018/0401		
Pesquisadores:		
<i>Vitória Brum da Silva Nunes</i> ALESSANDRA APARECIDA PAZ VITÓRIA BRUM DA SILVA NUNES	<i>F.F.</i> FABRÍCIO FIGUEIRÓ	<i>Liane Esteves Daudt</i> LIANE ESTEVES DAUDT <i>Fabiane Spagnol Pedrazzani</i> FABIANE SPAGNOL PEDRAZZANI
<i>Ana Maria Oliveira Battastini</i> ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI	<i>Mariela Granero Farias</i> MARIELA GRANERO FARIAS	
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).		
Impresso do sistema AGHU-Pesquisa por CRISTIAN FIDALGO CABRAL em 22/10/2018 21:03:47		

9.2 Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)



Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados Institucionais

Título do Projeto

<p>Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.</p>	<p>Cadastro no GPPG</p>
--	-------------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar as informações institucionais que serão coletadas em bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas em atividades acadêmicas e científicas, no contexto do projeto de pesquisa aprovado.

Porto Alegre, 11 de Julho de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Vitória Brum da Silva Nunes	<i>Vitória Brum da Silva Nunes</i>
Alessandra Aparecida Paz	<i>Alessandra Paz</i>
Liane Esteves Daudt	<i>Liane Esteves Daudt</i>
Mariela Granero Farias	<i>Mariela G. Farias</i>
Fabiane Spagnol Pedrazzani	<i>Fabiane Spagnol</i>
Ana Maria Oliveira Battastini	<i>Ana Maria O. Battastini</i>
Fabrício Figueiró	<i>F. Figueiró</i>

9.3 Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas

Título do Projeto	Cadastro no GPPG
Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.	

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos materiais biológicos estão mantidos em biorepositórios, bem como de suas respectivas informações associadas, contidas em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 11 de Julho de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Vitória Brum da Silva Nunes	
Alessandra Aparecida Paz	
Liane Esteves Daudt	
Mariela Granero Farias	
Fabiane Spagnol Pedrazzani	
Ana Maria Oliveira Battastini	
Fabício Figueiró	

9.4 Termo de Compromisso para Utilização de Dados do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)



Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

Termo de Compromisso para Utilização de Dados

Título do Projeto

Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.	Cadastro no GPPG
---	------------------

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados em prontuários e bases de dados do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima.

Porto Alegre, 11 de Julho de 2018.

Nome dos Pesquisadores	Assinatura
Vitória Brum da Silva Nunes	
Alessandra Aparecida Paz	
Liane Esteves Daudt	
Mariela Granero Farias	
Fabiane Spagnol Pedrazzani	
Ana Maria Oliveira Battastini	
Fabício Figueiró	

9.5 Formulário de Delegação de Funções do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)



HOSPITAL DE
CLINICAS
PORTO ALEGRE RS



FORMULÁRIO DE DELEGAÇÃO DE FUNÇÕES

Titulo:	Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação.	
Cadastro GPPG:		
Pesquisador Responsável (PR):	Alessandra Aparecida Paz	CAAE:

Nome	Formação	Assinatura	Rubrica	Funções atribuídas (ver lista abaixo)	Período delegação Início Fim
Vitória Brum da Silva Nunes	Biomédica			1, 2, 4, 5, 6, 7, 10	15/06/2018 01/03/2020
Fabício Figueró	Farmac. Bioquímica			5, 6, 10, 11, 12	15/06/2018 01/03/2020
Ana Maria Oliveira Battastini	Farmac. Bioquímica			5, 6, 10, 11, 12	15/06/2018 01/03/2020
Fabiane Spagnol Pedrazzani	Farmac. Bioquímica			4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	15/06/2018 01/03/2020
Mariela Granero Farias	Farmac. Bioquímica			4, 5, 6, 7, 8, 9, 10	15/06/2018 01/03/2020
Liane Esteves Daudt	Mestranda em Farmacologia			5, 6, 8, 9, 10	15/06/2018 01/03/2020

Funções Atribuídas:

- | | | |
|---|--|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Cadastrar e atualizar projeto 2. Realizar comunicação com o CEP 3. Assinar documentos de encaminhamento ao CEP 4. Conduzir processo de consentimento 5. Organizar material do estudo | <ol style="list-style-type: none"> 6. Realizar consultas de pesquisa 7. Realizar entrevistas de pesquisa 8. Realizar exames de pesquisa 9. Aplicar instrumentos de coleta de dados 10. Analisar dados coletados | <ol style="list-style-type: none"> 11. Gerenciar estudo 12. Gerenciar recursos financeiros do estudo 13. Outra: _____ 14. Outra: _____ 15. Outra: _____ |
|---|--|--|

Declaração do Pesquisador Responsável:

Confirmo que as pessoas listadas são qualificadas e foram devidamente treinadas para as funções atribuídas. Delego as respectivas funções, as quais serão realizadas sob minha supervisão. Entendo que sou o responsável final pela condução da pesquisa.

9.6 Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Plataforma Brasil para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

1. Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES PURINÉRGICOS PARA LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA) E SUA RELAÇÃO COM A IMUNOMODULAÇÃO			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 46			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Alessandra Aparecida Paz			
6. CPF: 892.446.130-34	7. Endereço (Rua, n.º): JOAO PESSOA 437 centro 1003 PORTO ALEGRE RIO GRANDE DO SUL 90040000		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (51) 9739-3221	10. Outro Telefone:	11. Email: ales.paz@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p> <p style="text-align: center;">Data: <u>20</u> / <u>06</u> / <u>18</u></p> <p style="text-align: right;">  Assinatura HCPA Dra. Alessandra Aparecida Paz CREMERS 24200 Chefe do Serviço de Hematologia Clínica </p>			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Hospital de Clínicas de Porto Alegre		13. CNPJ: 87.020.517/0001-20	14. Unidade/Orgão:
15. Telefone: (51) 3359-7640		16. Outro Telefone:	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p> <p>Responsável: _____ CPF: _____</p> <p>Cargo/Função: _____</p> <p>Data: _____ / _____ / _____</p> <p style="text-align: right;">Assinatura _____</p>			
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			

9.7 Parecer Consubstanciado do CEP da Plataforma Brasil para o projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS BIOMARCADORES PURINÉRGICOS PARA LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA (LLA) E SUA RELAÇÃO COM A IMUNOMODULAÇÃO

Pesquisador: Alessandra Aparecida Paz

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 93973218.1.1001.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.968.192

Apresentação do Projeto:

A LLA é uma doença caracterizada por uma proliferação descontrolada de células clonais e por impedir a maturação de células progenitoras linfoides na medula óssea, resultando em leucocitose. A modulação do sistema imune, no contexto das neoplasias hematológicas, está associada, pelo menos em parte, por alterações no sistema purinérgico. Este sistema é composto por enzimas como a ectonucleotidase CD39 (ENTPDase1/CD39), a ecto-5'-nucleotidase CD73 (ecto-5'-NT/CD73) e a adenosina deaminase/CD26 (ADA). A adenosina (ADO), nucleosídeo extracelular resultante da degradação do ATP, pode participar na criação de condições favoráveis que promovem o crescimento e a sobrevivência do câncer, enquanto suprime as respostas imunitárias do hospedeiro. Em humanos, linfócitos B ativados são capazes de produzir AMP e consequentemente adenosina, pela presença de CD39 e CD73 na membrana plasmática, onde a subpopulação CD38^{high} CD39^{high} é capaz de inibir a proliferação de linfócitos T_H17. Nesse contexto, linfócitos T_H17 têm sido descritos por expressar a enzima CD39 em sua membrana, com baixa expressão de CD73. As células imunes também são moduladas pelos exossomos, vesículas extracelulares originadas do compartimento endossomal das células. Alguns estudos têm sugerido que exossomos podem imunizar contra o desafio tumoral, enquanto outros têm demonstrado a capacidade de inibir o sistema imune pela formação de citocinas e adenosina, criando um ambiente pró-tumoral. O objetivo do presente projeto é investigar as características fenotípicas de linfócitos B e T regulatórios (Breg e Treg) e o perfil inflamatório associado a

nucleotídeos/nucleosídeos da adenina, exossomos e citocinas em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA). As amostras de sangue periférico utilizadas serão provenientes de pacientes com LLA submetidos a diagnóstico por imunofenotipagem no setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Serão analisados os marcadores CD39, CD38, CD73 e CD26 nos linfócitos Bregs e Tregs através de imunofenotipagem, além disso, estes marcadores serão incorporados aos painéis já utilizados (segundo recomendações do EuroFlow), a fim de aumentar a precisão no diagnóstico da LLA. Além disso, será analisada a secreção de citocinas (IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 e TNF- α) pelo método de ELISA e metabolismo do ATP por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Os exossomos serão isolados pela técnica de ultracentrifugação e caracterizados para os marcadores CD39, CD38, CD73 e CD26 através da técnica de citometria de fluxo. O presente projeto almeja aumentar a compreensão da imunomodulação em pacientes com LLA, bem como investigar possíveis biomarcadores diagnósticos e prognósticos dessa doença.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar as características de imunomodulação de linfócitos B e T regulatórios (Breg e Treg) associado a nucleotídeos/nucleosídeos da adenina, exossomos e citocinas em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA).

Objetivos Secundários:

- I- Investigar a importância dos novos marcadores imunofenotípicos CD26, CD38, CD39 e CD73 para o diagnóstico diferencial e prognóstico da LLA, analisando sua expressão em linfócitos Breg e Treg periféricos.
- II- Incorporar os marcadores CD26, CD38, CD39 e CD73 na imunofenotipagem das células monoclonais aos painéis já utilizados, seguindo o regimento interno do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
- III- Avaliar o perfil de citocinas e de nucleotídeos/nucleosídeos da adenina em plasma de pacientes com LLA.
- IV- Avaliar a secreção de exossomos em pacientes com LLA, a expressão dos marcadores CD26, CD38, CD39 e CD73 nessas vesículas e uma possível correlação com os linfócitos B e T regulatórios.

Riscos: Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa não são conhecidos, porém há desconfortos associados a punção para coleta de sangue: desconforto e leve sensação dolorosa no momento da coleta.

Benefícios: Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são indiretos, pois a participação na pesquisa não trará benefícios diretos aos participantes, porém, contribuirá para o aumento do conhecimento sobre o assunto estudado e, se aplicável, poderá beneficiar futuros pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresentado é um projeto de mestrado do PPG de Bioquímica da UFRGS. Serão incluídos pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) para avaliação de marcadores associados a imunomodulação. A proposta é bastante interessante e inovadora. Esse projeto trará contribuições para o entendimento da imunomodulação na leucemia linfocítica aguda, podendo auxiliar de forma significativa para a compreensão do papel dos exossomos nesse contexto bem como trará contribuições na avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para o diagnóstico dessa patologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE para casos e TCLE para controles.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.881.999 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 28/09/2018. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 24/08/2018 TCLEs 28/09/2018 e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- Este projeto está aprovado para inclusão de 46 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1158032.pdf	28/09/2018 11:30:34		Aceito
Outros	VERSAO2_carta_ao_Cep_pendencias_respondidas_28092018.docx	28/09/2018 11:29:38	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MODIFICADO_modelo_de_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_tcle_para_responsaveis.pdf	28/09/2018 11:29:13	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MODIFICADO_modelo_de_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_tcle_para_responsaveis_CONTROLE.pdf	28/09/2018 11:29:03	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	MODIFICADO_modelo_de_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_tcle_para_adultos_CONTROLE.pdf	28/09/2018 11:28:52	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	MODIFICADO_modelo_de_termo_de_consentimento_livre_e_esclarecido_tc	28/09/2018 11:28:37	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito

Justificativa de Ausência	le_para_adultos.pdf	28/09/2018 11:28:37	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Outros	carta_ao_CEP_pendencias_respondidas.docx	24/08/2018 18:40:16	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	MODIFICADO_Projeto_Vitoria24082018.pdf	24/08/2018 18:39:31	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Vitoria_plataforma_brasil.pdf	24/08/2018 18:28:59	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Outros	continuacao.pdf	11/07/2018 15:18:57	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Outros	delegacao_de_funcoes.pdf	11/07/2018 15:18:06	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_Vitoria_Nunes.pdf	11/07/2018 15:14:11	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	material_biologico_e_informacoes_associadas.pdf	11/07/2018 15:10:25	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Outros	utilizacao_de_dados.pdf	11/07/2018 15:10:04	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Outros	dados_institucionais.pdf	11/07/2018 15:08:53	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	11/07/2018 15:05:31	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	19/06/2018 17:39:37	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	19/06/2018 17:34:09	VITORIA BRUM DA SILVA NUNES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 18 de Outubro de 2018

Assinado por:
Marcia Mocellin Raymundo
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília **CEP:** 90.035-903
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 **Fax:** (51)3359-7640 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

9.8 Parecer do Projeto de Mestrado do PPG – Bioquímica intitulado “Avaliação de possíveis biomarcadores purinérgicos para leucemia linfóide aguda (LLA) e sua relação com a imunomodulação” que foi associado ao projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

**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

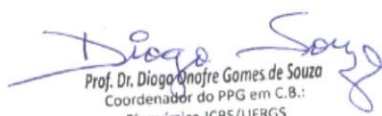
- Pertinentes
 Sugestões de alterações:

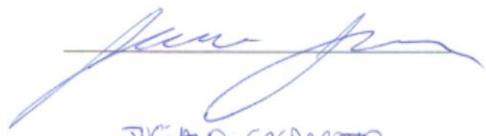
PARECER FINAL:

- Aprovado
 Diligência

Porto Alegre, 22 de 05 de 2018

Atenciosamente,


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


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

9.9 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

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.

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: _____

9.10 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle: Responsáveis do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

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 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

Assinatura

Local e Data: _____

9.11 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Pacientes LLA do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

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.

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: _____

9.12 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Pacientes LLA: Responsáveis do projeto 2018/0401 (CAAE:93973218110015327)

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 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

Assinatura

Local e Data: _____

9.14 Acordo entre Instituições do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)



Acordo entre instituições sobre operacionalização, compartilhamento, utilização do material biológico humano armazenado em Biorrepositório

Título do projeto: Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para Leucemia Linfocítica Aguda e sua relação com a imunomodulação
Número do CAAE:

Este documento visa esclarecer as questões sobre operacionalização, compartilhamento e utilização do material biológico humano e informações associadas armazenados em Biorrepositório de pesquisa referentes ao projeto "Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para Leucemia Linfocítica Aguda e sua relação com a imunomodulação" coordenado pelo (a) pesquisador (a) Alessandra Aparecida Paz e em colaboração com o pesquisador da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Fabrício Figueiró. Este documento visa atender Resolução do Conselho Nacional de CNS 466/2012, a (CNS) 441/2011 e a Portaria do Ministério da Saúde 2201/2011.

O projeto tem como objetivo geral entender o comportamento e características de uma proteína, CD38, presente em células imunes da medula óssea e sangue periférico que parece ter um papel importante na progressão da Leucemia Linfocítica Aguda. Dentre os procedimentos do estudo, será realizada a coleta de amostras de aspirado de medula óssea e sangue periférico e de informações do prontuário e de exames dos pacientes, como idade, resposta ao tratamento, avaliação da Doença Residual Mínima, sobrevida e alterações citogenéticas. As amostras serão coletadas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e posteriormente enviadas para o Laboratório de Imunobioquímica do Câncer do Departamento de Bioquímica da UFRGS, onde serão analisadas, conforme previsto no protocolo. As informações serão coletadas e armazenadas no Google Drive institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os pesquisadores devem realizar a coleta de amostras de acordo com as boas práticas clínicas de maneira a garantir a qualidade e quantidade suficientes e adequadas para realização das análises previstas.

Os pesquisadores devem atender às normas sanitárias e de biossegurança pertinentes às atividades do projeto, assim como atender aspectos de segurança e qualidade na pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Após a coleta e processamento, cada alíquota da amostra e suas respectivas informações associadas serão codificadas de maneira a garantir a confidencialidade das informações e dos participantes de pesquisa.

O envio do material biológico e, quando for caso das informações associadas, será realizado de maneira a preservar a integridade das amostras e conforme as normativas nacionais e/ou internacionais de transporte de amostras biológicas em pesquisa.

Os custos referentes ao envio do material biológico são de responsabilidade dos pesquisadores.

As amostras serão mantidas nos respectivos centros sob responsabilidade dos pesquisadores representantes aqui listados até a realização dos testes previstos no protocolo de pesquisa. Após as análises previstas, as amostras e informações associadas serão:

(X) armazenadas no Laboratório de Imunobioquímica do Câncer do Departamento de Bioquímica da UFRGS, sob responsabilidade do Professor Fabrício Figueiró durante 10 anos.

descartadas conforme as normativas de descarte de material biológico vigentes.

Durante a execução do projeto de pesquisa, a compilação e gerenciamento dos dados e informações ficarão sob responsabilidade do (a) pesquisador (a) Vitória Brum da Silva Nunes, no Google Drive institucional do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Os dados coletados e resultados obtidos a partir desse projeto de pesquisa serão:

Acessados igualmente por todos os centros participantes da pesquisa.

Cada centro terá acesso apenas às informações referentes ao seu respectivo centro.

Apenas o centro coordenador terá acesso a todos os dados do estudo. Caso o centro coordenador seja uma instituição internacional, os pesquisadores brasileiros deverão ter acesso irrestrito ao material biológico e informações associadas a ele em qualquer etapa da realização do projeto bem como aos resultados gerados, assim que disponíveis, conforme preconizado pelas normativas brasileiras.

No caso de dissolução da parceria firmada por esse acordo, as amostras biológicas e informações associadas coletadas até o momento serão partilhadas entre as instituições da seguinte maneira:

Cada centro terá acesso aos dados coletados em seu respectivo centro.

Os centros compartilham igualmente os dados coletados até o momento.

No caso de dissolução da parceria, alunos ou equipe de pesquisa que estejam envolvidos em atividades acadêmicas ficam autorizados a concluir atividades previstas.

Em caso de exploração de questões científicas não relacionadas a esse projeto, um novo projeto de pesquisa deverá ser encaminhado para apreciação de Comitê de Ética em Pesquisa, e quando for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.

O uso de informações oriundas dessa pesquisa em estudos futuros deverá ser firmado por meio de novo acordo entre os centros participantes.

Os dados e informações referentes a esse projeto de pesquisa estarão sujeitos a auditorias realizadas por órgãos sanitários ou órgãos regulatórios internos ou externos ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O participante poderá retirar a sua participação do projeto de pesquisa em qualquer etapa do estudo. Neste caso, o material biológico coletado será destruído como parte da

saída do participante, ou devolvido, se este for o desejo do mesmo. As informações associadas serão excluídas do banco de dados, no entanto, em casos de publicações de resultados parciais ou finais já publicados, essas informações associadas não poderão ser excluídas das fontes originais.

A perda ou destruição do material coletado e/ou informações associadas serão informadas aos responsáveis pelo projeto, participantes da pesquisa e Comitê de Ética em Pesquisa.

De acordo com as normativas brasileiras, fica vedado a qualquer uma das instituições o patenteamento e utilização comercial de material biológico humano.

DocuSigned by:
Alessandra Aparecida Paz
F44CCE11E0F84CA...

Alessandra Aparecida Paz

Pesquisador Responsável no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DocuSigned by:
Fabício Figueiró
15DC4AB37AA84D6...

Fabício Figueiró

Pesquisador Responsável na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Data: 17/02/2022

9.15 Declaração de Conhecimento e Cumprimento da Lei Geral de Proteção de Dados para Pesquisas Avaliadas pelo CEP do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

DocuSign Envelope ID: 2ACA31AD-AEF7-44EB-9F99-2757CE15A139



HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE DIRETORIA DE PESQUISA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HCPA

DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO E CUMPRIMENTO DA LEI GERAL DE PROTEÇÃO DE DADOS PARA PESQUISAS AVALIADAS PELO CEP HCPA

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

Os pesquisadores declaram conhecer e cumprir os requisitos da Lei Geral de Proteção de Dados (Lei N° 13.709, de 14 de agosto de 2018) quanto ao tratamento de dados pessoais e dados pessoais sensíveis que serão utilizados para a execução do presente projeto de pesquisa.

Declaram estar cientes que o acesso e o tratamento dos dados deverão ocorrer de acordo com o descrito na versão do projeto aprovada pelo CEP HCPA.

Nome	Assinatura
Vitória Brum da Silva Nunes	
Camila Kehl Dias	
Alexia Nedel Sant'Ana	
Juliete Nathali Scholl	
Fabrcio Figueiró	
Ana Paula Alegretti	
Mariela Granero Farias	
Monalisa Sosnoski	
Mariana Bohms Michalowski	
Liane Daudt	
Alessandra Aparecida Paz	

Data 28/02/2022

9.16 Delegação de Funções do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)



Delegação de Funções

Projeto de Pesquisa: 2022-0094 - Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda e sua relação com a imunomodulação

CAAE:

Pesquisador Responsável: ALESSANDRA APARECIDA PAZ

Nome	Formação	Funções atribuídas	Período delegação	
			Início	Fim
LIANE ESTEVES DAUDT	MEDICINA A CADASTRAR	GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
		GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
		GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
MARIELA GRANERO FARIAS	FARMÁCIA - ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS A CADASTRAR	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
ANA PAULA ALEGRETTI	FARMÁCIA - BIOQUÍMICA A CADASTRAR	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
MARIANA BOHNS MICHALOWSKI	MEDICINA A CADASTRAR	GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
		GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
		GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
FABRÍCIO FIGUEIRÓ	FARMÁCIA A CADASTRAR	GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
		GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
MONALISA SOSNOSKI	ENFERMAGEM A CADASTRAR	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
ALEXIA NEDEL SANTANA	BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
CAMILA KEHL DIAS	BIOMEDICINA	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
ALESSANDRA APARECIDA PAZ	HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA	GERENCIAR ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
VITÓRIA BRUM DA SILVA NUNES	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026
		CADASTRAR E ATUALIZAR PROJETO	01/01/2022	01/01/2026
		CONDUZIR PROCESSO DE CONSENTIMENTO	01/01/2022	01/01/2026
		ORGANIZAR MATERIAL DO ESTUDO	01/01/2022	01/01/2026
JULIETE NATHALI SCHOLL	BIOMEDICINA	ANALISAR DADOS COLETADOS	01/01/2022	01/01/2026

Declaração do Pesquisador Responsável:

Confirmando que as pessoas listadas são qualificadas e foram devidamente treinadas para as funções atribuídas. Delego as respectivas funções, as quais serão realizadas sob minha supervisão. Entendo que sou o responsável final pela condução da pesquisa.

ALESSANDRA APARECIDA PAZ

02/03/2022

9.17 Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Plataforma Brasil para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

DocuSign Envelope ID: 4DE64483-D3AE-4145-AB5C-83F9C2B15638



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

20220094

1. Projeto de Pesquisa: AVALIAÇÃO DE CD38 COMO POSSÍVEL BIOMARCADOR PURINÉRGICO PARA LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA) E SUA RELAÇÃO COM A IMUNOMODULAÇÃO			
2. Número de Participantes da Pesquisa: 594			
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 2. Ciências Biológicas, Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Alessandra Aparecida Paz			
6. CPF: 892.446.130-34	7. Endereço (Rua, n.º): JOAO PESSOA 437 centro 1003 PORTO ALEGRE RIO GRANDE DO SUL 90040000		
8. Nacionalidade: BRASILEIRO	9. Telefone: (51) 9739-3221	10. Outro Telefone:	11. Email: ales.paz@gmail.com
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: 22/06/2022		<p>DocuSigned by: <i>Alessandra Aparecida Paz</i> Assinatura</p>	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
12. Nome: Hospital de Clínicas de Porto Alegre	13. CNPJ: 87.020.517/0001-20	14. Unidade/Orgão:	
15. Telefone: (51) 3359-7640	16. Outro Telefone:		
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 466/12 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: <u>URSULA DA SILVEIRA MATTE</u> CPF: <u>676.962.010-34</u>			
Cargo/Função: <u>ASSESSORA - DIRETORIA DE PESQUISA</u>			
Data: <u>23</u> / <u>06</u> / <u>22</u>		<p>HCPA <u>Ursula Matte</u> Assinatura Assinatura da Diretoria de Pesquisa</p>	
PATROCINADOR PRINCIPAL			

9.18 Parecer Consubstanciado do CEP da Plataforma Brasil para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Alessandra Aparecida Paz

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60106922.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.549.407

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1970450.pdf", de 14/07/2022.

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

Trata-se de um projeto de pesquisa acadêmico, do PPG CB-Bioquímica UFRGS, em colaboração com a Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A leucemia linfocítica aguda (LLA) é uma neoplasia maligna resultante da proliferação clonal de células associadas aos estágios precoces de maturação linfóide. O sistema purinérgico está envolvido na imunomodulação, foi observado um aumento da expressão proteica de CD38, em leucócitos do sangue periférico de pacientes com LLA-B com pior prognóstico. Além disso, parece que os linfócitos regulatórios, principalmente B regulatórios (Breg), estão envolvidos com a produção de nucleotídeos extracelulares do sistema purinérgico. As células imunes também podem ser moduladas por exossomos, vesículas extracelulares originadas do compartimento

endossomal das células; esses fatores podem ser responsáveis pela criação de microambientes imunossupressores nos pacientes com LLA. O objetivo do presente projeto é investigar as características fenotípicas e a funcionalidade imunomoduladora em pacientes com LLA, com ênfase no papel da CD38 na progressão neoplásica. Serão analisadas amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de pacientes com LLA diagnosticados pela Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Também serão analisadas amostras de SP de sujeitos saudáveis provenientes do Banco de Sangue do HCPA, constituindo o grupo controle. Será analisado o marcador CD38 nos linfócitos Breg através de imunofenotipagem. Ainda, será realizado cultura de células mononucleares do SP e da MO de pacientes com LLA e do SP de sujeitos saudáveis, bem como co-cultura de linfócitos Breg () com linfócitos T efetores () na presença, ou não, de daratumumab (anti-CD38). A avaliação da secreção de citocinas será feito pelo método de CBA; o metabolismo do ATP por HPLC; e a ativação, proliferação e morte celular serão analisadas por marcadores CD69, Ki67 e caspase-3-ativa, respectivamente. Exossomos serão isolados do plasma de pacientes com LLA e sujeitos saudáveis utilizando gradientes de Optiprep™, após o isolamento os exossomos serão caracterizados fenotipicamente e funcionalmente. Além disso, será analisado retrospectivamente arquivos de citometria de fluxo provenientes da Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do HCPA a fim de avaliar a expressão de CD38 em subpopulações celulares e correlacionar com fatores prognósticos. O presente projeto almeja aumentar a compreensão a respeito da ectonucleotidase CD38 nas células mononucleares do SP e da MO de pacientes com LLA, sobretudo nos linfócitos Breg e em exossomos e o papel dessas células e vesículas na modulação do sistema imune no contexto da LLA. O anticorpo monoclonal anti-CD38 (Daratumumab) será utilizado como estratégia de tratamento nas culturas de células neoplásicas e linfócitos imunocompetentes. O entendimento do sistema imune no contexto purinérgico pode abrir perspectivas interessantes como ferramenta para prognóstico e terapia para pacientes com LLA.

Este trabalho será uma pesquisa quantitativa, observacional, longitudinal, analítica e aleatorizada. O estudo prospectivo será de caráter experimental e do tipo controlado e antes e depois, com a análise de amostras de aspirado de medula óssea e sangue periférico de pacientes com LLA fornecidas pela Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do HCPA. As amostras antes e depois serão coletadas no momento do diagnóstico e na avaliação da primeira DRM,

respectivamente. O grupo controle saudável será composto de amostras de sangue periférico de doadores voluntários que estejam realizando doação de sangue no Serviço de Hemoterapia do HCPA. Tamanho amostral: 17 indivíduos por grupo.

O estudo retrospectivo será uma pesquisa quantitativa, observacional, longitudinal, analítica e aleatorizada. O trabalho será auto-controlado do tipo antes e depois, consistindo na análise de dados previamente armazenados de amostras de sangue periférico e medula óssea de pacientes com LLA (LLA-B/LLA-T) que foram coletadas no período de utilização do painel de imunofenotipagem ALOT (do inglês, Acute Leukemia Orientation Tube) (Euroflow) pela Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do HCPA. Tamanho amostral: 560 pacientes.

O projeto será realizado no Laboratório de Imunobioquímica do Câncer (Laboratório 22) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e na Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

O objetivo do presente projeto é investigar o papel da CD38 na imunomodulação e progressão neoplásica em pacientes com leucemia linfocítica aguda (LLA).

Objetivos Específicos

I. Expandir a caracterização do sistema imune com ênfase no sistema purinérgico em células imunes de pacientes com LLA;

II. Avaliar o perfil de nucleosídeos e nucleotídeos da adenina no plasma de pacientes com LLA;

III. Analisar a secreção de citocinas; ativação, proliferação e morte das células; bem como o metabolismo extracelular do ATP das células imunocompetentes após a inibição da enzima CD38;

IV. Avaliar as características fenotípicas e o papel funcional dos linfócitos Breg derivados das células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea de pacientes com LLA na regulação das respostas dos linfócitos T, através de co-cultura, inibindo ou não a CD38, analisando a secreção de citocinas; ativação, proliferação e morte dos linfócitos, bem como o metabolismo extracelular do ATP;

V. Caracterizar exossomos derivados de plasma de pacientes com LLA através da expressão de CD38 e da atividade enzimática pelo metabolismo do NAD;

VI. Realizar um estudo retrospectivo de dados previamente coletados e armazenados pela Unidade de Hematologia e Citometria de Fluxo do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Serviço de Hematologia do HCPA para identificar a expressão de CD38 em diferentes subpopulações celulares no sangue periférico e na medula óssea de pacientes com LLA, e correlacionar com os respectivos prognósticos, evolução e dados clínicos e laboratoriais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos que o paciente pode sentir no evento de uma punção de medula e coleta de sangue a serem realizadas para diagnóstico, avaliação da doença residual mínima e exames de rotina. As coletas podem gerar desconforto, porém não serão realizadas punções além das programadas para diagnóstico, detecção da doença residual mínima e exames laboratoriais que o paciente virá a realizar. Portanto, quando o paciente tiver agendado uma punção de medula ou coleta de sangue serão aspirados 4mL a mais, podendo aumentar o tempo de desconforto.

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

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores apresentam a seguinte justificativa para realização do estudo:

Apesar de já existirem marcadores imunofenotípicos predefinidos nos painéis diagnósticos para LLA-B e LLA-T, ainda há uma grande necessidade de novos biomarcadores prognósticos para serem incluídos na rotina laboratorial, visto que os fatores prognósticos clínicos seriam obtidos anteriormente ao tratamento e teriam como objetivo nortear a escolha da melhor opção terapêutica para cada paciente. Combinar a informação de diversos fatores prognósticos pode possibilitar predições individualizadas e mais acuradas do que as clássicas classificações em

grupos de risco. Através de experimentos ex vivo em andamento, observamos um aumento na expressão da ectonucleotidase CD38 em leucócitos no grupo de pacientes com LLA-B com pior prognóstico, em amostras de sangue periférico, com possível impacto na resposta imune. Faz-se necessário entender o papel das ectonucleotidasas, principalmente da CD38, nas células mononucleares do sangue periférico e da medula óssea de pacientes com LLA, sobretudo nos linfócitos Breg e em exossomos e o papel dessas células e vesículas na imunomodulação no contexto da LLA. A imunofenotipagem tem importante poder diagnóstico e potencial como fator prognóstico na LLA, pois permite entender o nível de imunocompetência dos pacientes, abrindo também perspectivas para a modulação farmacológica do sistema imune e purinérgico, buscando aumentar a taxa de sobrevivência. A hipótese do presente projeto é que marcadores envolvidos com a sinalização purinérgica, principalmente CD38, podem estar alterados em linfócitos regulatórios e que esta alteração está envolvida com a incapacidade do sistema imune em controlar a progressão neoplásica. Alteração na sinalização extracelular mediada, principalmente, por ATP, NAD⁺ e ADO pode modular a secreção de vesículas extracelulares e o perfil de citocinas destes pacientes. CD38 parece estar envolvida com pior prognóstico principalmente nos pacientes com LLA-B, podendo caracterizar subgrupo da doença com comportamento mais agressivo, por este motivo a inibição dessa ectonucleotidase com daratumumab (anti-CD38) pode ser um potencial tratamento. Portanto, o presente projeto almeja entender a imunomodulação no contexto purinérgico para abrir perspectivas como ferramenta para prognóstico e terapia para pacientes com LLA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os autores solicitam dispensa do TCLE para os controles saudáveis do estudo prospectivo, e para os participantes adultos do estudo retrospectivo, com as seguintes justificativas:

“Posto que os indivíduos saudáveis que estarão doando sangue no Serviço de Hemoterapia do HCPA irão assinar o TCI, o qual prevê a utilização de parte do material coletado que seria descartado para fins de pesquisa, e que não haverá coleta de nenhum dado pessoal como nome, idade ou outros exames, solicita-se a dispensa de TCLE para os indivíduos doadores das amostras que irão compor o grupo controle do estudo prospectivo.” “Além disso, uma vez que os participantes do estudo retrospectivo não necessitarão realizar nenhuma coleta de material biológico, e que o resultado da pesquisa não acarretará em possíveis repercussões diagnósticas e/ou prognósticas diretas para o indivíduo ou familiares, solicita-se também, a dispensa de TCLE para os pacientes maiores de idade do estudo retrospectivo. Ainda, vários pacientes não são mais

atendidos pelo Serviço de Hematologia do HCPA e seus dados de contato podem estar desatualizados, além de alguns terem vindo a óbito, assim, estabelecer contato com seus familiares poderia gerar desconforto desnecessário. Em relação aos pacientes menores de idade do estudo retrospectivo, em situações que não seja possível efetuar contato com os responsáveis após 3 tentativas em turnos diferentes, estende-se a solicitação da dispensa de TCLE.”

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer N.º 5.526.903 foram respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 14/07/2022. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para inclusão ou revisão de registros de 594 participantes neste centro.

- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para “Aprovado”, configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.

- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1970450.pdf	14/07/2022 16:21:47		Aceito
Outros	Resposta_ao_parecer_5526903.docx	14/07/2022 16:21:01	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_PRONTO.docx	14/07/2022 16:20:31	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
Outros	ANEXO_6_Roteiro_de_ligacao.docx	14/07/2022 16:19:23	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_5_TCLE_meio_eletronico.docx	14/07/2022 16:19:11	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXOS_1_E_2_TCLE_adultos_e_responsaveis.docx	14/07/2022 16:18:34	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto_20220094_Alessandra.pdf	24/06/2022 10:32:48	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
Outros	Declaracao_LGPD_datada_e_assinada.pdf	22/06/2022 15:57:13	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ANEXO_3_TCI.docx	22/06/2022 15:47:55	Alessandra Aparecida Paz	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	ANEXO_4_Acordo_entre_instituicoes.pdf	22/06/2022 15:47:15	Alessandra Aparecida Paz	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 28 de Julho de 2022

Assinado por:
Têmis Maria Félix
(Coordenador(a))

9.19 Parecer do Projeto de Doutorado do PPG – Bioquímica intitulado “Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) e sua relação com a imunomodulação” que foi associado ao projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

PPG-Ciências
Biológicas
Bioquímica

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

Parecer de Projeto de Doutorado

O projeto da aluna **Vitória Brum da Silva Nunes**, intitulado: “**Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) e sua relação com a imunomodulação**”, orientado pelo Prof. Dr. **Fabício 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, 18 de junho de 2020

Considerações:

O projeto apresenta mérito científico e é exequível.

Atenciosamente,

Prof. Guilhian Leipnitz

Prof. Guilhian Leipnitz
Coordenador Substituto do PPG em C.B.:
Bioquímica-ICBS/UFRGS

Prof. Carlos Alberto Gonçalves
Coordenador do PPG em C.B.:
Bioquímica-ICBS/UFRGS

PARECER COSUBSTANCIADO

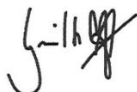
O projeto de pesquisa intitulado “Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para leucemia linfocítica aguda do tipo B (LLA-B) e sua relação com a imunomodulação”, da aluna **Vitória Brum da Silva Nunes**, sob a orientação do Prof. Dr. **Fabrcio Figueiró**, vinculado ao PPG Ciências Biológicas – Bioquímica desta Universidade, apresentado para apreciação da Comissão de Pós-Graduação, apresenta:

- Um tema relevante e com mérito científico uma vez que propõe é investigar as características fenotípicas e a funcionalidade imunomoduladora em pacientes com leucemia linfocítica aguda linhagem B (LLA-B), com ênfase no papel da NADase/CD38 na progressão neoplásica.
- Uma introdução fundamentada e com objetivos adequados ao estudo proposto. A metodologia é coerente para que os objetivos sejam alcançados, havendo até este momento uma infraestrutura adequada no Departamento para sua realização.
- Um cronograma de execução que prevê o período de 48 meses para a realização do projeto.

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

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

Parecer aprovado em 18.06.2020



Prof. Guilhian Leipnitz

Prof. Guilhian Leipnitz
Coordenador Substituto do PPG em C.B.:
Bioquímica-ICBS/UFRGS



Prof. Carlos Alberto Gonçalves
Coordenador do PPG em C.B.:
Bioquímica-ICBS/UFRGS

9.20 Plano de Seleção e Recrutamento de Participantes de Projetos de Pesquisa Desenvolvidos no HCPA para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)



Plano de seleção e recrutamento de participantes de projetos de pesquisa desenvolvidos no HCPA

Orientações:

Uma vez atendidas todas as exigências éticas, regulatórias e logísticas, a aprovação do projeto implicará na aprovação da inclusão do número de participantes conforme informado no projeto e detalhado abaixo. Qualquer alteração nesta previsão deverá ser previamente comunicada e justificada ao CEP e as alterações implementadas apenas quando autorizadas.

Projeto:

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

Pesquisador Responsável: ALESSANDRA APARECIDA PAZ

Nº de participantes efetivos previstos para serem incluídos no centro HCPA: 594

Nº estimado de pessoas que serão convidadas a participar do estudo para alcançar o número efetivo de participantes previstos acima (incluir todo o screening): 100

Nº de participantes previstos para serem incluídos no total de centros quando o estudo for multicêntrico ou envolver coparticipação: 594

Informações sobre o recrutamento

INTERNO

- **Busca ativa em banco de dados próprios do grupo de pesquisa:** Não
- **Encaminhamento por outros profissionais da saúde:** Não
- **Busca ativa a partir de query na base de dados do HCPA:** Sim
- **Critérios e/ou parâmetros de busca que serão adotados para a(s) solicitação(ões) de query(ies):**
Será solicitada uma query inicial para obter o contato dos responsáveis pelos pacientes com LLA, para que então possa ser solicitado o consentimento para a utilização dos dados do paciente no estudo retrospectivo, de acordo com o seguinte detalhamento conforme a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD): Filtros: diagnóstico de LLA; Colunas: nome do paciente, nome do responsável e número de contato.
- **Busca ativa a partir do(s) Serviço(s) Assistencial(is) do HCPA:** Sim
- **Serviço(s) Assistencial(is) que serão recrutados os participantes do projeto de pesquisa:**
Pendente de Aprovação em 28/02/2022, Serviço de Hematologia Clínica

EXTERNO

- **Busca ativa em outras instituições:** Não
- **Encaminhamento por outros profissionais de saúde:** Não
- **Divulgação na mídia (sendo o conteúdo previamente aprovado pelo CEP):** Não
- **Detalhamento de ações envolvidas no recrutamento de pacientes:**
Dos 594 participantes da pesquisa, 560 constituirão o número amostral do estudo retrospectivo. Nesse caso, será solicitada dispensa de TCLE para os participantes maiores de idade, e para aqueles menores de idade em que não se consiga realizar contato com os responsáveis após 3 tentativas em turnos diferentes. Para fazer contato com os responsáveis, será solicitada uma query inicial na base de dados do HCPA. Para o estudo prospectivo, o número amostra será de 34 indivíduos no total, sendo 17 pacientes recrutados no Serviço de Hematologia Clínicas, e outros 17 que irão compor o grupo controle saudável. Será solicitada dispensa de TCLE também para os 17 indivíduos deste grupo controle, pois este será composto de pessoas que estarão doando sangue no Serviço de Hematoterapia do HCPA, onde os mesmos assinarão o Termo de Consentimento Informado (TCI) do serviço, o qual prevê a utilização de parte do material coletado que seria descartado para fins de pesquisa, além de não haver coleta de nenhum dado pessoal de indivíduos desse grupo. Assim, os 100 indivíduos que compõem o número estimado de pessoas que serão convidadas a participar do estudo para alcançar o número efetivo de participantes previstos acima, seria uma estimativa de pacientes que serão abordados ativamente para assinatura ou envio de TCLE, sendo estes 17 pacientes com LLA que serão recrutados no Serviço de Hematologia Clínica, e os responsáveis pelos pacientes menores de idade que irão participar do estudo retrospectivo.

9.21 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Adultos do projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (adultos)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 60106922000005327

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

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

Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá a coleta de 4mL de amostra de aspirado de medula e 4mL de sangue periférico, que serão coletados no mesmo momento que você realizar o diagnóstico e em outro momento de coleta para avaliação da Doença Residual Mínima, a qual corresponde ao número de células leucêmicas detectáveis após o tratamento. Portanto a coleta do segundo tubo só será realizada se você já necessitar da coleta de um primeiro tubo para diagnóstico ou avaliação da efetividade do seu tratamento, caso seja diagnosticado tendo Leucemia Linfocítica Aguda. Além disso, gostaríamos da sua autorização para acessar o seu prontuário para consultar sexo, idade, diagnóstico, resultados de exames de imunofenotipagem (exame realizado para estudar a população de células leucêmicas e direcionar o diagnóstico e tratamento), e outros exames pertinentes a caracterização do tipo de leucemia que você pode vir a apresentar.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos que você pode sentir no evento de uma punção de medula e coleta de sangue a serem realizadas para diagnóstico, avaliação da Doença Residual Mínima e exames de rotina. As coletas podem gerar desconforto, porém não serão realizadas punções além das programadas para diagnóstico, detecção da Doença Residual Mínima e exames laboratoriais que você virá a realizar. Portanto, quando você tiver agendada uma punção de medula ou coleta de sangue serão aspirados 4mL a mais, podendo aumentar o tempo de desconforto.

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

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 poderá 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.

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, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fabrício Figueiró, pelo telefone (51) 3308-5554, ou com a pesquisadora Vitória Brum da Silva Nunes pelo telefone (51) 3308-5553, ou com a pesquisadora Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51) 3359-8317 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, pelo telefone (51) 3359-6246, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 5º andar do Bloco C do HCPA, Avenida Protásio Alves, 211 – Portão 4, de segunda à sexta, das 8h às 17h. O CEP é um órgão colegiado, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, cuja finalidade é avaliar, emitir parecer e acompanhar os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, em seus aspectos éticos e metodológicos, realizados no âmbito da instituição.

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: _____

**9.22 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Responsáveis do projeto 2022/0094
(CAAE:60106922000005327)**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (responsáveis)

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 60106922000005327

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

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

Se você autorizar, a participação na pesquisa envolverá a coleta de 4mL de amostra de aspirado de medula e 4mL de sangue periférico, que serão coletados no mesmo momento que você realizar o diagnóstico e em outro momento de coleta para avaliação da Doença Residual Mínima, a qual corresponde ao número de células leucêmicas detectáveis após o tratamento. Portanto a coleta do segundo tubo de aspirado de medula só será realizada se a pessoa pela qual você é responsável já necessitar da coleta de um primeiro tubo para diagnóstico ou avaliação da efetividade do tratamento, caso seja diagnosticado tendo Leucemia Linfocítica Aguda. Além disso, gostaríamos da sua autorização para acessar o prontuário para consultar sexo, idade, diagnóstico, resultados de exames de imunofenotipagem (exame realizado para estudar a população de células leucêmicas e direcionar o diagnóstico e tratamento), e outros exames pertinentes a caracterização do tipo de leucemia que a pessoa pela qual você é responsável pode vir a apresentar.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são os mesmos que o paciente pode sentir no evento de uma punção de medula e coleta de sangue a serem realizadas para diagnóstico, avaliação da Doença Residual Mínima e exames de rotina. As coletas podem gerar desconforto, porém não serão realizadas punções além das programadas para diagnóstico, detecção da Doença Residual Mínima e exames laboratoriais que o paciente virá a realizar. Portanto, quando o paciente tiver agendada uma punção de medula ou coleta de sangue serão aspirados 4mL a mais, podendo aumentar o tempo de desconforto.

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

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatório. Caso você decida não autorizar, ou ainda, desistir da participação e retirar a autorização, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que a pessoa pela qual você é responsável recebe ou poderá vir a receber na instituição. Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos. Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da participação na pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome ou da pessoa pela qual você é responsável não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fabrício Figueiró, pelo telefone (51) 3308-5554, ou com a pesquisadora Vitória Brum da Silva Nunes pelo telefone (51) 3308-5553, ou com a pesquisadora Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51) 3359-8317 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, pelo telefone (51) 3359-6246, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 5º andar do Bloco C do HCPA, Avenida Protásio Alves, 211 – Portão 4, de segunda à sexta, das 8h às 17h. O CEP é um órgão colegiado, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, cuja finalidade é avaliar, emitir parecer e acompanhar os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, em seus aspectos éticos e metodológicos, realizados no âmbito da instituição.

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

Nome do responsável

Assinatura

Nome do participante

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Assinatura

Local e Data: _____

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 60106922000005327

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

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

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

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

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

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

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

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

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou

seja, o seu nome ou da pessoa pela qual você é responsável não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Fabrício Figueiró, pelo telefone (51) 3308-5554, ou com a pesquisadora Vitória Brum da Silva Nunes pelo telefone (51) 3308-5553, ou com a pesquisadora Alessandra Aparecida Paz, pelo telefone (51) 3359-8317 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, pelo telefone (51) 3359-6246, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 5º andar do Bloco C do HCPA, Avenida Protásio Alves, 211 – Portão 4, de segunda à sexta, das 8h às 17h. O CEP é um órgão colegiado, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, cuja finalidade é avaliar, emitir parecer e acompanhar os projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, em seus aspectos éticos e metodológicos, realizados no âmbito da instituição.

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

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o termo

Assinatura

Local e Data: _____

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

Nº do projeto GPPG ou CAAE: 60106922000005327

Bom dia/Boa tarde, o meu nome é Vitória Brum da Silva Nunes, sou pesquisadora do projeto que está sendo realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre “Avaliação de CD38 como possível biomarcador purinérgico para Leucemia Linfocítica Aguda e sua relação com a imunomodulação”. Poderia falar com o Sr/ a Sra [responsável pela paciente participante]?

O objetivo do projeto é entender o comportamento e características de uma proteína, CD38, presente em células imunes da medula óssea e sangue periférico que parece ter um papel importante na progressão da Leucemia Linfocítica Aguda. Estou ligando para convidar o (a) senhor (a) a participar desta pesquisa, pois verificamos que a pessoa pela qual você é responsável [nome do paciente] realizou acompanhamento no Serviço de Hematologia após o diagnóstico de Leucemia Linfocítica Aguda. Se tiver interesse em participar, você ou a pessoa pela qual você é responsável não precisará responder a quaisquer perguntas, apenas estará dando consentimento para termos acesso aos exames realizados no período de acompanhamento pelo Serviço de Hematologia e ao prontuário.

Ressaltamos que caso não tenha interesse em participar, isto não interfere em nada no atendimento da pessoa pela qual você é responsável, ou em consultas e exames já agendados. Se estiver de acordo, perguntar em qual contato de preferência gostaria de receber o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do projeto, onde constam as informações detalhadas.

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

Gostaria de participar: () Sim () Não

Em caso de concordância aplicar o instrumento. Se não aceitar, agradecer pelo tempo e atenção.

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

Pesquisadora Responsável: Alessandra Aparecida Paz

Contato disponibilizado: (51) 3359-8317

Observação: Este roteiro é apenas um guia para o diálogo, sendo que os pesquisadores tomarão todo o cuidado para evitar qualquer constrangimento, bem como responderão perguntas ou dúvidas adicionais que se apresentem durante a ligação.

Dados a serem preenchidos pelo pesquisador depois da ligação: Participante, dia da ligação, hora da ligação, gravação da ligação (Sim/Não), pesquisador que realizou a ligação e assinatura do Pesquisador.

9.25 Termo de Consentimento Informado (TCI) do Serviço de Hemoterapia – Doação de Sangue para o projeto 2022/0094 (CAAE:60106922000005327)

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO (TCI)

SERVIÇO DE HEMOTERAPIA – Doação de Sangue

Eu, abaixo assinado, autorizo a utilização do meu sangue doado em qualquer paciente que dele necessite, na produção de insumo e hemoderivados a partir do plasma excedente não utilizado para fins transfusionais, além da utilização de parte do material coletado, que porventura seria descartado, para fins de pesquisa e/ou controle laboratorial (assegurando o anonimato e confidencialidade de suas informações conforme normas técnicas vigentes). Autorizo também a incorporação de meu nome em um registro de doadores. A equipe explicou-me de forma clara a natureza e o objetivo destes procedimentos e me foi dada oportunidade de fazer perguntas, sendo todas elas respondidas completa e satisfatoriamente. Confirmando que me foi disponibilizado material sobre doenças infecciosas transmitidas através da transfusão de sangue. Fui informado de que poderei sentir efeitos adversos do procedimento tais como sudorese, tonturas, náuseas, vômitos e, raramente, podem surgir alterações cardíacas e respiratórias. Autorizo também, a realização de todos os testes laboratoriais exigidos por lei para detecção das seguintes infecções transmitidas pelo sangue: hepatites B e C, sífilis, Chagas, HIV, HTLV, e estou ciente de que poderei ser chamado para repetição de testes.

Data:

Horário:

Nome (em letra de forma) do Doador ou Responsável

Documento de Identificação

Assinatura do Doador ou Responsável

Grau de parentesco do responsável

Responsável pela aplicação do termo

Apesar do profissional de saúde poder dar-lhe todas as informações necessárias e aconselhar-lhe, você deve participar do processo de decisão sobre o procedimento e ter sua parcela de responsabilidade pela conduta adotada. Esse formulário atesta sua aceitação do procedimento recomendado.

9.26 Artigos científicos publicados como autora e em coautoria durante o período do doutorado:

1. Solari JIG, Filippi-Chiela E, Pilar ES, **Nunes V**, Gonzalez EA, Figueiró F, Andrade CF, Klamt F. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) related to immunogenic cell death are differentially triggered by clinically relevant chemotherapeutics in lung adenocarcinoma cells. *BMC cancer*. 20,474 (2020).
<https://doi.org/10.1186/s12885-020-06964-5>
2. **da Silva Nunes VB**, Dias CK, De Bastiani MA, Farias MG, Spagnol F, Alegretti AP, Daudt LE, Michalowski MB, Battastini AMO, Paz AA, Figueiró F. *NT5E* gene and CD38 protein as potential prognostic biomarkers for childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Purinergic Signal*. 2022 Jun; 18(2):211-222. Doi: 10.1007/s11302-022-09841-x. Epub 202 Mar 2. PMID: 35235138; PMCID: PMC9123135.
3. **Brum da Silva Nunes V**, Kehl Dias C, Nathali Scholl J, Nedel Sant'Ana A, de Fraga Dias A, Granero Farias M, Alegretti AP, Sosnoski M, Esteves Daudt L, Bohns Michalowski M, Oliveira Battastini AM, Paz AA, Figueiró F. Lymphocytes from B-acute lymphoblastic leukemia patients present differential regulation of the adenosinergic axis depending on risk stratification. *Discov Oncol*. 2022 Dec 30; 13(1):143. doi: 10.1007/s12672-022-00602-1. PMID: 36581667; PMCID: PMC9800668.