

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

Camila Kehl Dias

**AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS  
DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

Porto Alegre

2022

Camila Kehl Dias

**AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS  
DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Porto Alegre

2022

## CIP - Catalogação na Publicação

Dias, Camila Kehl  
AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM  
DIFERENTES PERFIS DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS /  
Camila Kehl Dias. -- 2022.  
124 f.  
Orientador: Fabrício Figueiró.

Coorientador: Fábio Klamt.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Leucemias Agudas. 2. Células Tronco da Leucemia.  
3. Fenótipo Slow-Cycling. 4. Imunometabolismo. 5.  
Checkpoints Imunes. I. Figueiró, Fabrício, orient.  
II. Klamt, Fábio, coorient. III. Título.

Camila Kehl Dias

**AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS  
DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

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

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Figueiró

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Aprovada em: 12/04/2022

Composição da banca:

Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto – P.P.G Bioquímica – ICBS/UFRGS – relatora

Prof. Dr. Eduardo Cremonese Filippi Chiela – P.P.G Ciências Morfológicas – ICBS/UFRGS

Prof. Dr. Diogo André Pilger – P.P.G. Farmácia – UFRGS

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFRGS, ao Departamento de Bioquímica e aos professores e funcionários que me auxiliaram e me inspiraram na minha trajetória.

Sou muito grata aos meus orientadores Fabrício e Fábio, por tudo que me ensinaram e pela confiança depositada em mim. Não seria a pesquisadora que sou hoje sem os seus ensinamentos e apoio.

Agradeço aos médicos colaboradores do HCPA Alessandra, Liane, Mariana, Rebeca e Thomas, esta pesquisa não teria sido possível sem vocês. Em especial, agradeço à Mariela e à Ana Paula, por me ensinarem tanto sobre imunofenotipagem, citometria de fluxo e leucemias, a ajuda e expertise de vocês foi imprescindível para este trabalho.

Agradeço aos colaboradores bioinformatas Henrique e Vinícius por me ajudarem a realizar as análises que eu tinha em mente e pelos ensinamentos e companheirismo.

Agradeço aos colaboradores deste trabalho e amigos do Lab 22 Juliete, Augusto, Vitória e Alexia por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar, pelo aprendizado e compartilhamento. A participação de vocês no trabalho foi essencial. Agradeço também aos demais colegas e amigos do Lab 22 e do Lab 24F pela companhia, conversas e risadas.

Agradeço à minha família por estarem sempre presentes e por me perguntarem “como vão as mitocôndrias?”. Em especial, agradeço aos meus pais, Luciani e Alcides, por acreditarem em mim e terem me proporcionado tanto na vida. Também agradeço ao meu namorado Guilherme, por ser meu porto-seguro e me apoiar tanto. Vocês são as estrelas que me guiam.

Agradeço aos meus amigos por estarem sempre comigo, por proporcionarem infinitas risadas e por sempre me lembrarem que, para eles, eu sou um exemplo de cientista.

Finalmente, o agradecimento mais importante eu dedico aos pacientes que aceitaram participar do estudo ou permitir que seus protegidos participassem do estudo. Esse estudo definitivamente não teria sido possível sem eles e tudo que realizamos foi dedicado a melhorar o cenário de pessoas como eles no futuro.

“Escolher escrever é rejeitar o silêncio.”

Chimamanda Ngozi Adichie

## SUMÁRIO

PARTE I.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Leucemias.....	15
1.2 Leucemia Linfocítica Aguda tipo B.....	16
1.3 Leucemia Mieloide Aguda.....	18
1.4. Reprogramação metabólica.....	20
1.5 Heterogeneidade tumoral.....	22
1.6 <i>Checkpoints</i> Imunes nas Leucemias.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
PARTE II.....	28
PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	29
1. Análises bioinformáticas.....	29
2. Amostras.....	31
3. Desenho experimental.....	33
4. Análise de dados.....	40
CAPÍTULO I.....	41
RESULTADOS.....	41
1. Análises de bioinformática.....	41
2. Dados epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo.....	47
3. Alvos selecionados para avaliação de expressão gênica.....	48
4. Imunofenotipagem.....	50
5. Citometrias com sondas metabólicas.....	56
CAPÍTULO II.....	60
RESULTADOS.....	60
1. Análises de bioinformática.....	60
2. Dados epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo.....	67
3. Alvos selecionados para avaliação de expressão gênica.....	68

4. Imunofenotipagem e análise das subpopulações de blastos.....	69
5. Citometrias com sondas metabólicas .....	76
6. Tratamento com CPI-613 .....	79
PARTE III .....	81
DISCUSSÃO .....	82
1. Análises bioinformáticas.....	84
2. Expressão gênica de painel de genes selecionados.....	85
3. Imunofenotipagem das populações blásticas .....	88
4. Imunofenotipagem de populações de células imunes.....	90
5. Citometria de fluxo e metabolismo.....	91
CONCLUSÃO .....	93
PERSPECTIVAS.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXO A: Carta de Aprovação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Projeto.....	118
ANEXO B: Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre do Projeto .....	119
ANEXO C: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos .....	120
ANEXO D: TCLE Adultos .....	121
ANEXO E: TCLE Responsáveis.....	123



PARTE I

## RESUMO

Alterações relevantes como: reprogramação metabólica, mudança no perfil de expressão gênica, proteica e interação com células do sistema imune são observadas nas células precursoras mieloides e linfoides presentes na medula óssea, como a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e a Leucemia Linfocítica Aguda (LLA-B). Dessa forma, é necessário investigar formas de identificar e atingir as células que são consideradas as maiores responsáveis pela resistência e recorrência, dentre as diferentes populações neoplásicas. Por isso, neste projeto, propusemos a avaliação de características do metabolismo e de diversos marcadores de células *slow-cycling* ou marcadores de *Leukemia Stem Cells (LSCs)*. Primeiramente, analisamos dados de expressão gênica disponíveis publicamente de pacientes de LMA e LLA-B, onde comparamos a expressão de diversos marcadores associados com as *LSCs* e as células *slow-cycling* em amostras recorrentes de medula e amostras primárias de medula. Observamos um enriquecimento de expressão de genes da assinatura de *LSCs* e células *slow-cycling* nas amostras recorrentes, assim como identificamos grupos de genes, diferentes para LLA-B e LMA, que apresentam potencial como biomarcadores de *LSCs* ou células *slow-cycling* e para detecção da Doença Residual Mínima (DRM). Além disso, observamos conjuntos de vias enriquecidas nas amostras recorrentes que podem indicar processos metabólicos relevantes para a persistência de células leucêmicas após o tratamento. Em seguida, analisamos amostras de medula de pacientes com LMA ou LLA-B no momento do diagnóstico e no momento da primeira avaliação da DRM. As análises foram realizadas antes e após o tratamento dos pacientes de forma a identificar possíveis alterações nas populações celulares mediante tratamento. Esta abordagem permitiu uma análise única sobre as populações tumorais de cada paciente e como elas respondem ao tratamento. Adicionalmente, a análise dos resultados estratificados de acordo com o risco designado no momento do diagnóstico possibilitou a visualização de diferentes perfis entre os pacientes, que, eventualmente, podem contribuir para estratégias de alocação de risco e prognóstico. Analisamos a expressão gênica de um conjunto de genes de interesse por estarem envolvidos em vias metabólicas e processos biológicos relevantes aos fenótipos *slow-cycling* e de *LSCs* e observamos diferenças de expressão entre diagnóstico e DRM, a maioria dos genes analisados apresentou aumento de expressão na DRM. Realizamos uma análise populacional dos blastos dos pacientes de LLA-B e LMA por imunofenotipagem, observando a expressão de marcadores de interesse e de *checkpoints* imunes. As populações mais imaturas de blastos (CD34+) apresentaram maior expressão dos marcadores analisados, em geral. Também observamos a expressões de *checkpoints* imunes em populações de células imunes (monócitos, linfócitos e neutrófilos) destes mesmos pacientes, quando possível. Por fim, observamos características do metabolismo das células nestas amostras, antes e após o tratamento, em relação à glicólise, metabolismo de ácidos graxos, fosforilação oxidativa. Também observamos a capacidade de quimiorresistência diferencial entre células *slow-* e *fast-cycling*. O entendimento do funcionamento diferencial das *LSCs* e das células *slow-cycling* em relação às outras populações de células leucêmicas é crucial não apenas para encontrar tratamentos que as atinjam especificamente, como também para identificá-las propriamente, com as ferramentas atuais de diagnóstico, além de abrir caminho para novos alvos de tratamento que compreendem a complexidade da heterogeneidade tumoral.

Palavras-chave: Leucemia Linfocítica Aguda B, LLA-B, Leucemia Mieloide Aguda, LMA, Imunometabolismo, Fenótipo *Slow-Cycling*, *Leukemia Stem Cells*, *Checkpoints* Imunes.

## ABSTRACT

Relevant alterations such as: metabolic reprogramming, changes in gene and protein expression profile and interaction with immune system cells are observed in myeloid and lymphoid precursor cells present in the bone marrow, in Acute Myeloid Leukemia (AML) and Acute Lymphocytic Leukemia (ALL-B). Thus, it is necessary to investigate ways to identify and target the cells that are considered responsible for resistance and recurrence, among the different neoplastic populations. Therefore, in this project, we proposed the evaluation of metabolic characteristics and of several slow-cycling cell markers or Leukemia Stem Cells (LSCs) markers. First, we analyzed publicly available gene expression data from AML and ALL-B patients, where we compared the expression of several markers associated with LSCs and slow-cycling cells in recurrent bone marrow samples and primary bone marrow samples. We observed an enrichment of gene expression signature of LSCs and slow-cycling cells in the recurrent samples, as well as identified groups of genes, different for ALL-B and AML, that have potential as biomarkers for LSCs or slow-cycling cells and for detection of Minimal Residual Disease (MRD). Furthermore, we observed sets of enriched pathways in the recurrent samples that may indicate metabolic processes relevant to the persistence of leukemic cells after treatment. We then analyzed bone marrow samples from patients with AML or B-ALL at the time of diagnosis and at the time of the first MRD assessment. Analyses were performed before and after treatment of patients in order to identify possible changes in cell populations upon treatment. This approach allowed for a unique analysis of each patient's neoplastic populations and how they respond to treatment. Additionally, the analysis of results stratified according to the risk assigned at the time of diagnosis made it possible to visualize different profiles among patients, which, eventually, may contribute to risk allocation and prognosis strategies. We analyzed the gene expression of a set of genes of interest because they are involved in metabolic pathways and biological processes relevant to slow-cycling and LSCs phenotypes and we observed differences in expression between diagnosis and MRD, most of the analyzed genes showed increased expression in MRD. We performed a population analysis of blasts from B-ALL and AML patients by immunophenotyping, observing the expression of markers of interest and immune checkpoints. The most immature populations of blasts (CD34+) showed higher expression of the analyzed markers, in general. We also observed the expression of immune checkpoints in populations of immune cells (monocytes, lymphocytes and neutrophils) from these same patients, when possible. Finally, we observed characteristics of cell metabolism in these samples, before and after treatment, in relation to glycolysis, fatty acid metabolism and oxidative phosphorylation. We also observed differential chemoresistance between slow- and fast-cycling cells. Understanding the differential functioning of LSCs and slow-cycling cells in relation to other leukemic cell populations is crucial not only to find treatments that specifically target them, but also to identify them properly, with current diagnostic tools, in addition to pave the way for new treatment targets that comprehend the complexity of tumor heterogeneity.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia type B, B-ALL, Acute Myeloid Leukemia, AML, Immunometabolism, Slow-Cycling Phenotype, Leukemia Stem Cells, Immune Checkpoints.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos primers *foward* e *reverse* utilizados para amplificação do painel de genes aplicado às amostras de pacientes do HCPA. Página 38.

Tabela 2 – Dados epidemiológicos dos pacientes de LMA da coorte HCPA incluídos no estudo. Página 47.

Tabela 3 – Dados epidemiológicos dos pacientes de LLA-B incluídos no estudo. Página 66.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATRA Ácido Trans-retinóico

CCA Centro Cirúrgico Ambulatorial

CFDA Diacetato de 6-carboxifluoresceína

CTE Cadeia Transportadora de Elétrons

CTH Células Tronco Hematopoiéticas

CSC *Cancer Stem Cell*

DRM Doença Residual Mínima

DX Diagnóstico

FSC *Foward Scatter*

GAPDH Glideraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCPA Hospital de Clínicas de Porto Alegre

INCA Instituto Nacional do Câncer

LLA Leucemia Linfocítica Aguda

LLA-B Leucemia Linfocítica Aguda do tipo B

LLA-T Leucemia Linfocítica Aguda do tipo T

LMA Leucemia Mieloide Aguda

LMA M0 Leucemia Mieloblástica Aguda indiferenciada

LMA M1 Leucemia Mieloblástica Aguda com maturação mínima

LMA M2 Leucemia Mieloblástica Aguda com maturação

LMA M3 Leucemia Promielocítica Aguda

LMA M4 Leucemia Mielomonocítica Aguda

LMA M5 Leucemia Monocítica Aguda

LMA M6 Leucemia Eritroide Aguda

LMA M7 Leucemia Megacarioblástica Aguda  
LSC *Leukemia Stem Cell*  
MFI *Mean Fluorescence Intensity*  
MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade  
NGS *Next Generation Sequencing*  
OXPHOS Fosforilação Oxidativa  
PBS Tampão fosfato-salino  
PDH Piruvato Desidrogenase  
SNC Sistema Nervoso Central  
SFB Soro Fetal Bovino  
PCR *Polimerase Chain Reaction*  
RQ-PCR *Real-time Quantitative Polimerase Chain Reaction*  
RT-PCR *Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*  
SMD Síndrome Mielodisplásica  
SSC *Side Scatter*  
TCA Ácido Tricarboxílico  
TCGA *The Cancer Genome Atlas*  
TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  
TCR *T Cell Receptor*  
TMO Transplante de Medula Óssea

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença complexa e multifatorial, de forma crescente e ao longo do tempo são encontrados mais fatores que agregam no processo de células normais tornarem-se cancerosas. Nos anos 2000 surgia a primeira tentativa de enumerar estes fatores, com o artigo *Hallmarks of Cancer* de Douglas Hanahan e Robert Weinberg. Em primeiro momento, os autores citam como características adquiridas fundamentais para o câncer a evasão da apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a sinais anti-crescimento, angiogênese sustentada, potencial replicativo ilimitado e invasão de tecidos e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Onze anos depois as marcas-registradas do câncer foram revisitadas, sendo agregadas a desregulação energética celular e a evasão imune. Além disso, são citadas características que possibilitam a aquisição de *hallmarks* como a inflamação pró-tumoral e a instabilidade genômica (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Mais recentemente, em 2022, são discutidos como novas *hallmarks* o desbloqueio da plasticidade fenotípica e a senescência e como novas características possibilitadoras a reprogramação epigenética não-mutacional e os microbiomas polimórficos (HANAHAN, 2022). O aumento, neste intervalo de vinte anos, do conhecimento sobre a etiologia, desenvolvimento e progressão do câncer nos mostram que o câncer não pode ser definido por poucos parâmetros ou características, de forma simplificada. A crescente variabilidade de opiniões no “campo” das *hallmarks* do câncer mostra a importância da compreensão da heterogeneidade neoplásica, de modo a tentar compreender melhor este conjunto de doenças (PAVLOVA; THOMPSON, 2016; SANCHO; BARNEDA; HEESCHEN, 2016; SENGA; GROSE, 2021). Finalmente, é essencial que estes novos conceitos e conhecimentos sejam aplicados na realidade clínica dos pacientes que enfrentam o câncer, promovendo uma constante atualização dos parâmetros de diagnóstico, prognóstico e tratamento.

Considerando os *hallmarks* do câncer aqui apresentados, destacamos a desregulação metabólica, a evasão do sistema imune, a plasticidade fenotípica e a reprogramação epigenética não-mutacional. Este trabalho trará resultados que englobam os *hallmarks* e leva em consideração características da biologia celular de células de leucemias agudas que se relacionam com os *hallmarks* citados. Além disso, abordamos estas questões sempre levando em consideração a heterogeneidade tumoral, ou seja, levando em consideração a possibilidade de existência de diferentes formas de expressão de cada *hallmark* em um mesmo paciente.

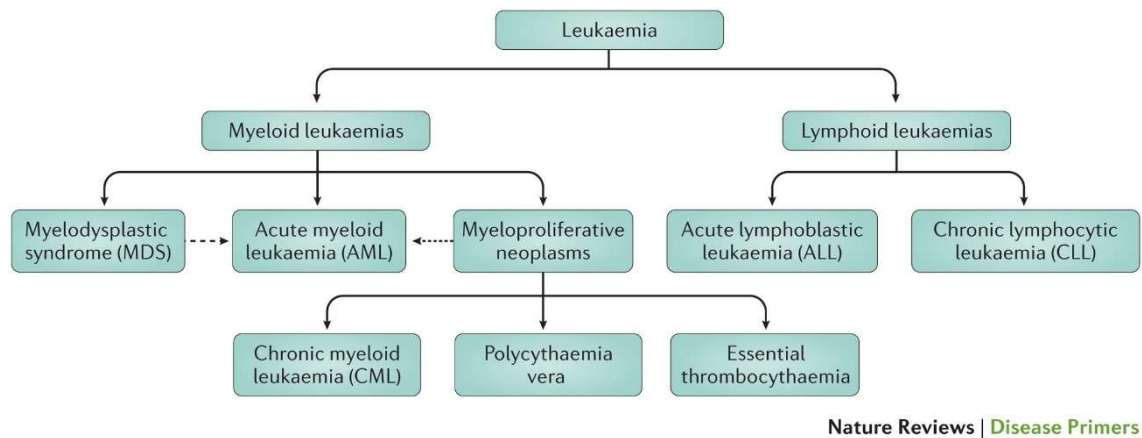
Acreditamos na importância da avaliação personalizada de cada paciente para melhorar os resultados no diagnóstico, prognóstico e tratamento das leucemias agudas.

### 1.1 Leucemias

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), a leucemia é uma doença que acomete os precursores das células sanguíneas. Sendo sua principal característica o acúmulo de células cancerosas na medula óssea, levando a supressão da presença e atividade das células normais por estas. Em 2020, no Brasil, as leucemias foram estimadas como o 9º câncer mais incidente em homens, totalizando 5.920 novos casos e 2,6% de todos os novos casos. Em 2019, as leucemias foram o décimo câncer com maior mortalidade no Brasil. Estima-se que em 2020 deve ter havido 950 novos casos de leucemias no Rio Grande do Sul. As taxas brutas de incidência estimadas para 2020 das leucemias no Rio Grande do Sul são de 7,67 casos a cada 100.000 habitantes para homens e 6,17 casos a cada 100,000 habitantes para mulheres. O Rio Grande do Sul está entre os estados com maiores taxas ajustadas de incidência de leucemias nos homens (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2020).

Existem duas formas de leucemias agudas a leucemia mieloide aguda (LMA) e a leucemia linfocítica aguda (LLA); também podemos destacar a leucemia mieloide crônica (LMC), que é um tipo de mieloproliferação, e a leucemia linfocítica crônica (LLC), que é um tipo de linfoproliferação (Fig. 1) (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). A leucemia linfocítica aguda (LLA) é considerada um tipo agressivo de leucemia, com predomínio de precursores de linfócitos alterados na medula óssea, capazes de invadir gânglios linfáticos, baço, fígado e o sistema nervoso central (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017). Este é o tipo mais comum em crianças, representando 28% dos casos nos Estados Unidos, sendo também o grupo que melhor responde às terapias atuais (SIEGEL *et al.*, 2022). É importante destacar que a LLA se divide, principalmente, nos tipos B e T, referentes ao tipo de linfócito que o precursor alterado daria origem (SWERDLOW *et al.*, 2016). A leucemia mieloide aguda (LMA), por sua vez, é o tipo mais comum das leucemias agudas em adultos, onde há a proliferação exacerbada de células chamadas de blastos, de característica mieloide (PELCOVITS; NIROULA, 2020). Este é o tipo mais comum em adultos, responsável por 80% dos casos de leucemias em adultos, sendo que os pacientes acima de 60 anos apresentam o pior prognóstico (VAKITI; MEWAWALLA, 2021). Já as leucemias linfocítica crônica (LLC) e mieloide crônica (LMC)

apresentam progressão muito lenta, sendo mais comuns em adultos e raras em crianças (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2018).



**Figura 1:** Representação esquemática dos subtipos de leucemias mieloides e linfocítica, ou linfóides. Retirado de (KHWAJA *et al.*, 2016).

Estima-se que em 2022, nos Estados Unidos, ocorram 60.650 novos casos de leucemias sendo 6.150 devido a LLA, 20.1600 devido a LLC, 20.050 devido a LMA e 8.860 devido a LMC. Estima-se, também, que ocorrerão 24.000 mortes por leucemias nos Estados Unidos em 2022. Sendo 1.520 mortes devidas a LLA, 4.060 mortes devidas a LLC, 11.180 mortes devidas a LMA e 1.130 mortes devidas a LMC. As leucemias foram o segundo tipo de câncer com maior mortalidade nas faixas etárias abaixo de 20 anos e de 20-39 anos nos homens nos Estados Unidos. Foram também o segundo tipo de câncer com maior mortalidade na faixa etária abaixo de 20 anos e o quinto na faixa etária de 20-39 e de acima de 80 anos nas mulheres (SIEGEL *et al.*, 2022).

## 1.2 Leucemia Linfocítica Aguda tipo B

A Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) é uma doença maligna dos precursores linfóides presentes na medula óssea, que pode acometer pacientes de todas as idades. A maioria dos casos se dá em crianças (TERWILLIGER; ABDUL-HAY, 2017) e a taxa de recuperação é considerada excelente para este grupo etário (HOHTARI *et al.*, 2019; SIEGEL *et al.*, 2022). Entretanto, estima-se que aproximadamente 20% dos pacientes entram em recidiva (NICOLAE SAVA *et al.*, 2019). O pico de ocorrência da LLA é entre dois e cinco anos de idade (PUI; EVANS, 2013). Os adultos caracterizam a menor parte dos casos de LLA, porém a taxa de



recuperação deste grupo etário ainda não é ideal levando a maior mortalidade (HOHTARI *et al.*, 2019). A resposta primária ao tratamento é preditiva do risco de remissão do paciente com LLA, sendo utilizada como um fator de decisão do curso de tratamento de pacientes (CAMPANA, 2012). A detecção da Doença Residual Mínima (DRM) é atualmente a forma de determinar o prognóstico mais efetiva tanto para casos de LLA em adultos quanto em crianças (BOROWITZ *et al.*, 2008; SCHRAPPE, MARTIN *et al.*, 2011). A detecção da DRM é realizada por citometria de fluxo ou técnicas envolvendo PCR, o que possibilita a detecção de células anormais da LLA com maior sensibilidade em comparação ao exame da morfologia celular por microscopia (INABA; GREAVES; MULLIGHAN, 2013).

### 1.2.1 Tratamento e estratificação de risco na LLA-B

Um dos principais protocolos de tratamento para pacientes de LLA-B e utilizado na maioria dos pacientes participantes do estudo prospectivo deste trabalho é o IC-BFM 2009. Este protocolo foi estabelecido por um estudo clínico nos anos 2000, e é constantemente otimizado de forma a melhorar as taxas de sucesso do tratamento. Consiste na combinação de esteroides (prednisona ou dexametasona) e os anti-metabólitos metotrexato ou mercaptopurina na terapia de indução (SCHRAPPE, M. *et al.*, 2000). A estratégia de tratamento varia de acordo com o risco que pode ser *standard* (baixo), intermediário ou alto. Características que são incluídas na estimativa do risco (de recorrência) são: idade, contagem de leucócitos, número de blastos no dia 8 de tratamento, presença ou não de blastos no dia 15 por detecção da DRM, hiperploídia alta ou baixa, e as alterações citogenéticas t(9;22) ou t(4;11) (CAMPBELL *et al.*, 2009).

Diversas características impactam no prognóstico para os pacientes de LLA-B, não estando associadas à fenótipos celulares específicos, mas sim às populações mais representativas; aqui serão citadas algumas das mais relevantes. Dentre as anormalidades citogenéticas estão a presença do cromossomo Filadélfia (Ph) ocasionada pela translocação (9;22), que ocorre em 20-30% dos pacientes adultos e 5% dos pediátricos, conferindo pior prognóstico; também são relevantes a deleção de *IKZF1* e rearranjos de *MLL* (translocação (4;11)), ambas representando um pior prognóstico (LOGHAVI; KUTOK; JORGENSEN, 2015). Algumas alterações são mais comuns em pacientes pediátricos como alta ou baixa hiperploídia, enquanto o fenótipo Ph, Ph-like e da fusão dos genes *ETV6/RUNX1* são mais

frequentes nos pacientes adultos. Estas características auxiliam na determinação do risco, quando disponível a pesquisa por alterações citogenéticas; porém, não estabelecem a base da LLA em uma minoria substancial de pacientes pediátricos (INABA; MULLIGHAN, 2020) e em um número maior ainda de pacientes adultos. A recorrência ainda é a principal causa de falha no tratamento de adultos com LLA e ocorre em quase metade dos pacientes que atingem a remissão transitória (ALDOSS; STEIN, 2018).

A detecção da DRM é a forma de acompanhar a efetividade do tratamento e possibilita alterar a estratificação de risco dos pacientes ao longo do tempo, dependendo da resposta ao tratamento, após a estratificação inicial realizada no momento do diagnóstico como descrito acima (KRUSE *et al.*, 2020). Nesse contexto, foi demonstrado que a resposta a prednisona, alocação de risco e detecção da DRM por citometria de fluxo nos dias 15 e 33 (D15 e D33) após o início do tratamento são os fatores mais importantes que preveem o prognóstico em pacientes de LLA-B pediátrica (RADU *et al.*, 2020). A citometria de fluxo é considerada o método mais rápido e acessível dentre os disponíveis (outros incluem RQ-PCR, RT-PCR e NGS) para detecção da DRM, além disso esta técnica permite acompanhamento personalizado da expressão de diferentes marcadores em cada paciente (KRUSE *et al.*, 2020; VAN DONGEN *et al.*, 2012).

### 1.3 Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é caracterizada pelo crescimento descontrolado e exagerado de células indiferenciadas, chamadas de blastos, de característica mieloide. Existe uma subclassificação das LMA em oito subtipos: M0 e M1, mieloblásticas imaturas; M2, mieloblástica madura; M3, pró-mielocítica; M4, mielomonocítica; M5, monocítica; M5, eritroleucemia; e M7, megacariocítica (HAMERSCHLAK, 2008). Esta é a classificação de 2008 realizada pela OMS e a utilizada neste trabalho (VARDIMAN *et al.*, 2009). Porém, é importante ressaltar que há uma classificação das neoplasia mieloides da OMS mais recente, de 2016, que se baseia na presença de mutações e translocações específicas (ARBER *et al.*, 2016). A remissão (ou não) de pacientes com LMA depende de alguns fatores como idade do paciente, resposta à terapia, e características citogenéticas (BENNETT; ANDERSEN; CASSILETH, 1991). A análise do cariótipo das células blásticas da LMA também auxilia no diagnóstico, em que a divisão em três grupos define o prognóstico como favorável, intermediário ou

desfavorável (GRIMWADE *et al.*, 1998; TALLMAN; GILLILAND; ROWE, 2005a). A detecção de rearranjos, principalmente, dos genes *MLL* (*MLL-PDT*) e *FLT3* (*FLT3-IDT*) também é bastante utilizada como valor prognóstico desfavorável para pacientes com LMA (SHIMADA *et al.*, 2008).

### 1.3.1 Tratamento e estratificação de risco na LMA

Um dos principais protocolos de tratamento para pacientes de LMA e o utilizado na maioria dos pacientes participantes do estudo prospectivo deste trabalho é o regime “7+3”. Este consiste em sete dias de infusão intravenosa contínua de citarabina, antimetabólito análogo da citosina, e 3 dias de injeções de danorubicina, antineoplásico da classe das antraciclinas (BERNARD *et al.*, 1973; CROWTHER *et al.*, 1973; ELLISON *et al.*, 1968). Esse foi o primeiro protocolo a atingir uma taxa de remissão de 63% para LMA, porém apenas 35-40% sobrevivem a longo prazo (5 anos ou mais sem recidivas) (ROWE, 2022).

Um dos maiores empecilhos atualmente no tratamento das LMAs é a recidiva, ocorrendo em 40-50% dos pacientes mais jovens e na maioria dos pacientes mais idosos. O prognóstico de pacientes com recidiva é sempre pior e depende, principalmente, do momento de recidiva (inicial ou tardio) (THOL; GANSER, 2020). Além disso, há a possibilidade de realizar o Transplante de Medula Óssea (TMO), porém os pacientes que passam pelo TMO também correm o risco de recidivar. Destes pacientes, 40% apresentam recidiva após o TMO e pelo menos 20% dos pacientes que passaram pelo TMO e recidivaram sobrevivem após 5 anos (ARFONS *et al.*, 2009). Novamente, a análise citogenética é bastante aplicada para complementar a determinação do prognóstico, com as mutações em *NPM1* (a mais frequente), *CEBPA*, *TP53*, *RUNX1* ou *ASXL1* (ARBER *et al.*, 2016), havendo também genes que apresentam mutações “*targetable*” como *FLT3*, *IDH1* ou *IDH2*. Entretanto, é provável que a frequência de variantes alélicas de mutações mude ao longo do tempo, com clones menos frequentes tornando-se mais dominantes e clones dominantes diminuindo em frequência (DÖHNER *et al.*, 2017; THOL; GANSER, 2020).

Apenas o subtipo M3 de LMA, promielocítica, apresenta um protocolo de tratamento distinto. Neste caso, a combinação do ácido *all-trans-retinoico* (ATRA) com antraciclinas em altas doses cumulativas resulta em bons desfechos para pacientes adultos e pediátricos (TESTI *et al.*, 2015). O protocolo, estabelecido em 2008, leva em conta a contagem total de leucócitos

para determinação do risco e inclui uma etapa de indução e duas de consolidação. Uma etapa seguinte de manutenção com mercaptopurina, metotrexato ou ATRA é realizada após negativização da DRM (GIBSON *et al.*, 2008). Também se aplica a investigação citogenética na busca da translocação (15;17) que gera o rearranjo dos genes *PML-RARA*, a presença desta alteração determina o uso de ATRA no tratamento (CHAUFFAILLE *et al.*, 2001).

#### 1.4. Reprogramação metabólica

O principal evento de reprogramação metabólica conhecido é o chamado efeito Warburg, que explica a adição à glicólise apresentada por células do câncer. Esta alteração no metabolismo permite o suporte do metabolismo anabólico necessário para as taxas aumentadas de proliferação apresentadas pelas células do câncer (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; WARBURG, 1956). Diversas outras rotas do metabolismo estão alteradas no câncer, especialmente nas leucemias, como o metabolismo de aminoácidos e de ácidos graxos. Além de representarem uma fonte alternativa para reciclagem de ATP, a atividade destas vias também garante o reposicionamento de precursores para as vias anabólicas como os intermediários do ciclo do TCA e da via das pentoses-fosfato (CASTRO; SAMPAIO-MARQUES; LUDOVICO, 2019; STÄUBERT *et al.*, 2015). Atualmente se sabe que a reprogramação metabólica pode levar as células do câncer a outros fenótipos que não apenas o clássico relacionado ao efeito Warburg, por exemplo, fenótipos que utilizam a fosforilação oxidativa em células resistentes ao tratamento em linhagens celulares de linfoma (GUIÈZE *et al.*, 2019). A mitocôndria, centro da fosforilação oxidativa na célula, já foi apontada como alvo terapêutico no tratamento da LLC. Isso porque ao mesmo tempo que o metabolismo oxidativo pode conferir resistência às células do câncer, ele também é fonte de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (JITSCHIN *et al.*, 2014). A produção de EROS afeta vias de sinalização atreladas a estas moléculas que estão relacionadas à proliferação, progressão tumoral e metástase (KALYANARAMAN *et al.*, 2018). Além disso, é na mitocôndria onde ocorre a  $\beta$ -oxidação, via que também é bastante estudada como potencial alvo terapêutico nas leucemias, devido à sua importância para as células leucêmicas (CASTRO; SAMPAIO-MARQUES; LUDOVICO, 2019; SAMUDIO; KONOPLEVA, 2015). Ademais, a mitocôndria já foi citada como um alvo de tratamento, devido ao seu papel central no metabolismo e sinalização, especialmente nas *Leukemia Stem Cells*, portanto drogas que atingem o metabolismo mitocondrial podem apresentar potencial no tratamento das leucemias (PANUZZO *et al.*,

2020). Por exemplo, a droga CPI-613, que já está sendo utilizado em estudos clínicos com LMA em combinação com quimioterápicos, que é inibidora da piruvato desidrogenase e da  $\alpha$ -ceto-glutarato desidrogenase e afeta o metabolismo mitocondrial (PARDEE *et al.*, 2018a; ZACHAR *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 Reprogramação metabólica na LMA

Já foram apontadas diferenças importantes entre o metabolismo das células tronco hematopoiéticas (CTH), células saudáveis da medula, e as *Leukemia Stem Cells (LSCs)*, células que potencialmente são responsáveis pela resistência à terapia e recidiva da leucemia (MESBAHI *et al.*, 2022). As CTH normais apresentam alto perfil glicolítico e baixos níveis de fosforilação oxidativa e metabolismo de aminoácidos e lipídeos. Uma reprogramação fisiológica ocorre após maturação e entrada na corrente sanguínea destas células, onde as taxas glicolíticas baixam e a fosforilação oxidativa atinge níveis moderados, juntamente com o metabolismo de lipídeos (SIMSEK *et al.*, 2010). As *LSCs* da LMA, por sua vez, apresentam perfil mais oxidativo, tanto do metabolismo de aminoácidos quanto do de lipídeos, do que glicolítico (JONES, C. L. *et al.*, 2018; PANUZZO *et al.*, 2020). Também foi observado que o mesmo fenômeno de mudança de fenótipo metabólico ocorre na população geral de blastos que migra para a corrente sanguínea (que em geral não são *LSCs*). Estes blastos demonstram taxas aumentadas de glicólise, metabolismo de lipídeos e de aminoácidos; porém, nem sempre as taxas de fosforilação oxidativa também estão aumentadas (CHEN, W. L. *et al.*, 2014; MESBAHI *et al.*, 2022), o que pode ser devido à heterogeneidade tumoral ou ao momento na carcinogênese que estas células se encontram.

#### 1.4.2 Reprogramação metabólica na LLA-B

A literatura acerca da plasticidade metabólica apresentada na LLA-B não é tão extensa quanto a da LMA, principalmente devido às maiores taxas de sucesso dos tratamentos (principalmente em pacientes pediátricos, que são a maioria). Porém, já foi apontado que a recidiva na LLA-B deve estar, pelo menos parcialmente, atrelada à resistência ao tratamento proporcionada por reprogramações metabólicas (ANSELMINI *et al.*, 2020). Um estudo relatou associação de alta expressão de ácido graxo sintase (*FASN*) com pior prognóstico em pacientes pediátricos de LLA (GHAEIDAMINI *et al.*, 2020). Similar a achados na LMA, outro estudo

identificou que células de LLA-B com alta reciclagem de NADH/NAD<sup>+</sup> apresentaram maior capacidade de fosforilação oxidativa e essa população encontrava-se enriquecida em células iniciadoras da leucemia (CHEN, C. *et al.*, 2021).

## 1.5 Heterogeneidade tumoral

A heterogeneidade tumoral implica a existência de diferentes subpopulações de células que compõem certo câncer e que podem interagir entre si, inclusive de forma sinérgica (TABASSUM; POLYAK, 2015). Em primeiro momento, dois modelos foram propostos para explicar a origem da heterogeneidade tumoral: o modelo de evolução clonal e o modelo de células tronco tumorais (do inglês *Cancer Stem Cells* ou *CSCs*) (SHACKLETON *et al.*, 2009). Atualmente o conceito de heterogeneidade evoluiu a ponto de considerar as relações entre diferentes tipos celulares dentro do microambiente tumoral, as relações entre diferentes populações de cada tipo celular entre si mesmas (heterogeneidades intra-tumorais), e as diferentes composições populacionais entre pacientes/sujeitos (heterogeneidade inter-tumoral) (ARNONE *et al.*, 2020; KANZAKI; PIETRAS, 2020; MCGRANAHAN; SWANTON, 2017). Quando discorremos sobre heterogeneidade intra-tumoral acerca da população de células tumorais, consideram-se, principalmente, fatores como: marcadores de superfície, anormalidades (epi)genéticas, taxas de crescimento e apoptose (PRASETYANTI; MEDEMA, 2017). Todas essas características contribuem para o *fitness* celular, que é medido de acordo com o número de descendentes que um fenótipo específico gera em um dado período. Os fenótipos com melhor *fitness* são os que tendem a resistir ao tratamento e perduram, provavelmente evoluindo de forma dinâmica neste espaço de tempo, gerando recorrência (LENZ *et al.*, 2021).

### 1.5.1 *Cancer Stem Cells*

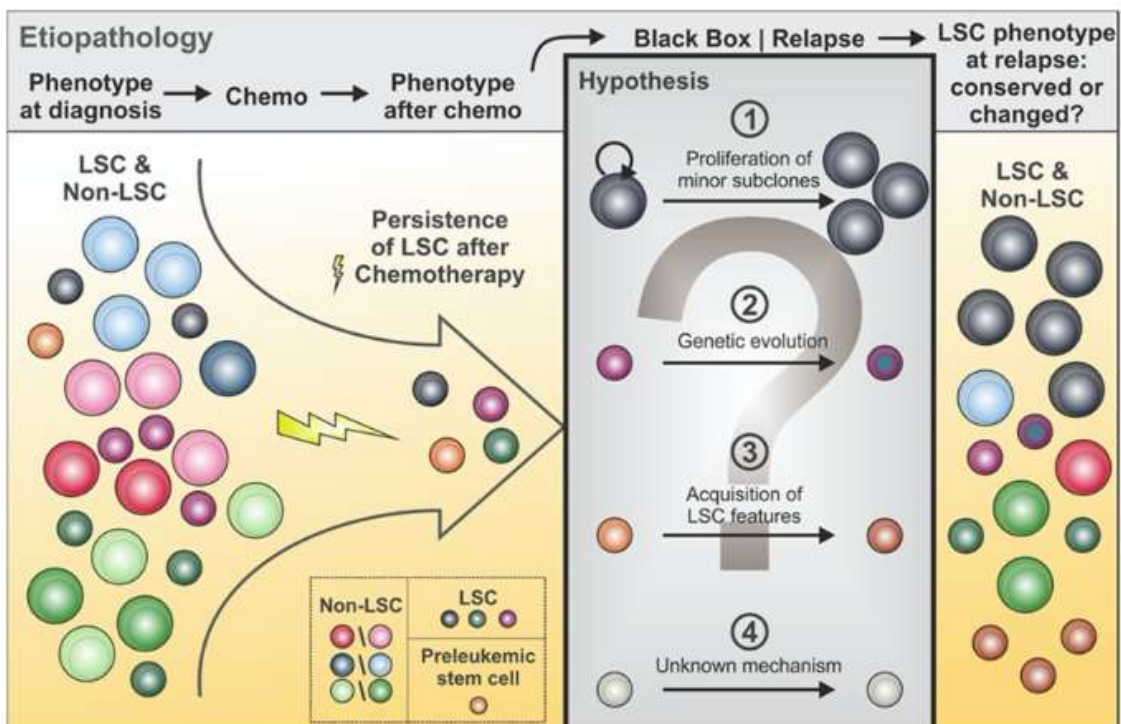
O modelo das *CSCs* sugere que apenas uma pequena população do total das células tumorais tenha a capacidade de repovoar o tumor após um tratamento, por exemplo, e seriam estas as células tronco tumorais (REYA *et al.*, 2001). As *CSCs* são também conhecidas por serem mais resistentes do que outras populações de células tumorais e, portanto, responsáveis pela resistência ao tratamento (KONRAD *et al.*, 2016). As células tronco tumorais foram

primeiramente descritas em leucemias, através da identificação de células capazes de iniciar leucemia mieloide aguda em camundongos imunodeficientes (LAPIDOT *et al.*, 1994).

### 1.5.1.1 Leukemia Stem Cells

Devido ao fato de terem sido identificadas em primeiro momento nas leucemias, as *CSCs* em leucemias geralmente são referidas como *Leukemia Stem Cells (LSCs)*, seguindo o mesmo raciocínio por trás das *CSCs* (LAPIDOT *et al.*, 1994). Primeiramente, acreditava-se que apenas as CTH normais após processo de transformação seriam capazes de gerar *LSCs*. Porém, já é aceito que progenitores mais comprometidos também podem readquirir o potencial de autorrenovação, que as CTH apresentam, através de inúmeras mudanças em expressão gênica. Mesmo que este processo requeira mais passos para ocorrer do que a transformação de uma célula menos comprometida, não deixa de ser um processo possível de ocorrer no surgimento da leucemia (WANG, J. C. Y.; DICK, 2005).

Diversos marcadores já foram propostos para identificação das *CSCs* e/ou *LSCs*, aqui citamos alguns, como o fenótipo  $CD34^+CD38^-$ , a expressão de CD133, e de CD271 (FOERSTER *et al.*, 2019; GLUMAC; LEBEAU, 2018; JIANG *et al.*, 2016; LAPIDOT *et al.*, 1994a; PEREGO *et al.*, 2018), todos associados a estados de maior indiferenciação.



**Figura 2: Representação esquemática dos processos que levam a perpetuação das LSCs na medula e possíveis eventos ocasionados pelo tratamento, principalmente pela quimioterapia.** Retirada de: (ARNONE *et al.*, 2020).

A população CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> foi a primeira forma de identificar as LSCs na LMA em 1997, a principal explicação, na época, era por ser um fenótipo bastante imaturo. Afinal, a perda de expressão de CD34 e o ganho de expressão de CD38 caracterizam uma curva de maturação comum para a maioria das células que se originam da medula óssea. Devido à maior presença de LSCs neste fenótipo mais imaturo (CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) surgiu a hipótese de que todas LSCs surgiriam de células tronco normais (BONNET; DICK, 1997). Após anos de pesquisa na área, foi demonstrado que não necessariamente as LSCs são originadas de células tronco tumorais e que elas podem estar presentes em compartimentos CD34<sup>-</sup> (TAUSSIG *et al.*, 2010). Essencialmente, as LSCs encontram-se na população mais imatura dentre as presentes nos blastos de cada paciente, porém não exclusivamente, já que um mesmo paciente pode apresentar mais de uma população de LSCs (BLAIR; SUTHERLAND, 2000; SARRY *et al.*, 2011). Isso se deve, principalmente, pela possível heterogeneidade de clones e a capacidade de desdiferenciação apresentada por alguns fenótipos celulares. Especialmente nas leucemias, a heterogeneidade de populações é exacerbada devido à presença dos diferentes clones em diferentes estágios de diferenciação, incluindo suas respectivas LSCs. Além disso, ainda não é claro como as LSCs persistem ao tratamento, e o que ocorre com os fenótipos iniciais apresentados no diagnóstico até o momento de recorrência (Fig. 2) (ARNONE *et al.*, 2020).

### 1.5.2 Fenótipo *slow-cycling*

Assim como as CSCs, o fenótipo *slow-cycling* é caracterizado por células capazes de reconstituir as diversas populações da massa tumoral, em caso de recorrência do câncer após tratamento, por exemplo. Porém, sua principal característica é a ciclagem lenta das células em questão, assemelhando-se a um estado de quiescência ou senescência (LYLE; MOORE, 2011; ROESCH *et al.*, 2010).

O fenótipo *slow-cycling* já foi observado em diversos tipos de câncer, dentre eles melanoma e glioblastoma (HOANG-MINH *et al.*, 2018; PEREGO *et al.*, 2018). Em leucemias, já foi demonstrado que a remissão e reconstituição das populações neoplásicas, em leucemias, é ocasionada por células *CSC-like* com características do fenótipo *slow-cycling* (SENF; JEREMIAS, 2019; TRENTIN *et al.*, 2018). Em suma, esse fenótipo é caracterizado por células



que ciclam de forma mais lenta, apresentam metabolismo altamente ligado a fosforilação oxidativa, apresentam fenótipo quiescente e resistência à quimioterapia (AHN; CHATTERJEE; ECCLES, 2017). Por outro lado, as células *fast-cycling* apresentam ciclagem rápida e utilizam preferencialmente a glicólise para obtenção de energia, como no efeito Warburg (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Marcadores celulares para identificação das células *slow-cycling* já foram propostos como gene de histona demetilase *JARID1B(KDM5B)* e o gene *TET2* de uma enzima com atividade de DNA demetilase (PUIG *et al.*, 2018; ROESCH *et al.*, 2010). Os fenótipos *slow-cycling* e das *CSCs* se sobrepõem em muitos quesitos como metabolismo, tempo prolongado de ciclagem celular, características morfológicas de desdiferenciação celular, resistência ao tratamento e mesmo os marcadores utilizados para identificação destas células (AHN; CHATTERJEE; ECCLES, 2017; CHAVEZ-GONZALEZ *et al.*, 2017; DELEYROLLE *et al.*, 2011; HOANG-MINH *et al.*, 2018; LAGADINOU *et al.*, 2013; LYLE; MOORE, 2011; PUIG *et al.*, 2018). Um subtipo deste fenótipo já foi descrito também na LMA como responsável pela recorrência, onde foi mostrado aumento da expressão de genes associados às *LSCs*, acompanhado pela subregulação de *MYC* (DUY *et al.*, 2021).

## 1.6 *Checkpoints* Imunes nas Leucemias

Os *checkpoints* imunes são responsáveis por regular a resposta imune, evitando a autoimunidade, por exemplo. O reconhecimento de antígenos pelos linfócitos T é realizado principalmente pelo Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), presente, por exemplo, em uma célula apresentadora de antígeno, ao Receptor de Célula T (TCR). Uma segunda ligação co-estimulatória, principalmente CD28-CD80 e CD28-CD86, também é realizada (GIANNOPOULOS, 2019; SHARPE; FREEMAN, 2002). Existem também ligantes que inibem a resposta imune das células T como o CTLA-4 e PD-1, de forma que inibem o sinal gerado pela segunda ligação co-estimulatória mencionada anteriormente (PIANKO *et al.*, 2017; SHARPE; FREEMAN, 2002). A expressão desregulada destes *checkpoints* imunes pode contribuir para um microambiente tumoral de supressão do sistema imune, inibindo a ação citotóxica de linfócitos T sobre as células do câncer (YANG *et al.*, 2014). Além disso, o microambiente tumoral pode modular macrófagos, que normalmente são as primeiras células do sistema imune, constituindo a imunidade inata e promovendo a imunidade adquirida. No

entanto, no contexto neoplásico, por expressão de citocinas como IL-4 e IL-10, essas células podem ser desviadas para um fenótipo anti-inflamatório e pró-tumoral, comumente descrito como M2 (CASSIM; POUYSSEGUR, 2020; NAJAFI *et al.*, 2019). O bloqueio de PD-1 em linfócitos e de PD-L1 em células tumorais, quando expresso, apresentou resultados positivos como imunoterapia de alguns tipos de câncer, como melanoma; porém, alguns pacientes não respondem ao bloqueio de PD-1, cuja razão ainda não foi elucidada (IWAI *et al.*, 2017). Já foi constatado que células de LMA são capazes de expressar tanto os ligantes PD-L1 e PD-L2, normalmente expressos nas células apresentadoras de antígeno, como os *checkpoints* imunes PD-1 e CTLA-4, normalmente expressos nos linfócitos T (YANG *et al.*, 2014). Isto torna as interações imunes do microambiente tumoral potencialmente mais complexas na LMA, e possivelmente em outras leucemias.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho se propõe avaliar a expressão gênica, as características imunofenotípicas e imunometabólicas de diferentes populações de células cancerosas, principalmente as células *slow-cycling*, em amostras de pacientes com Leucemia Linfóide Aguda B e Leucemia Mieloide Aguda.

### 2.2 Objetivos Específicos

I. Utilizar dados de coortes do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de LMA e LLA-B de forma a encontrar genes diferencialmente expressos e vias enriquecidas associadas ao imunometabolismo e os fenótipos *slow-cycling* e *CSC* entre amostras de medula recorrentes e primárias.

II. Analisar os níveis de expressão de alguns genes marcadores propostos para células *slow-cycling* e *CSCs* e de genes chave do metabolismo potencialmente alterados em amostras de medula óssea de pacientes com LMA e LLA-B, assim como a avaliação de marcadores de membrana associados a esse fenótipo.

III. Avaliar o estado metabólico das populações *slow-* e *fast-cycling* destas amostras de forma a identificar quais vias do metabolismo contribuem mais significativamente para a síntese de ATP.

IV. Analisar a expressão de *checkpoints* imunes PD-L1 e CTLA-4 em amostras de LMA e LLA-B, correlacionando com o risco e perfil metabólico.

V. Avaliar o efeito da droga CPI-613 sobre amostras de LLA-B e se há efeito diferencial entre células *slow-* e *fast-cycling*.

PARTE II

## PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

### 1. Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas realizadas foram conduzidas de forma a identificar diferenças em expressão gênica e ativação de vias metabólicas entre amostras: recorrentes de medula, primárias de medula e primárias de sangue periférico de pacientes pediátricos de LMA e LLA-B. A seguir serão descritas as etapas aplicadas na análise.

#### 1.2 Aquisição dos dados

Os resultados publicados aqui são, no todo ou em parte, baseados em dados gerados pela iniciativa *Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments* (TARGET) (<https://ocg.cancer.gov/programs/target>), phs000218, phs000464.v21.p8 e phs000465.v21.p8. Os dados foram adquiridos a partir da plataforma *The Cancer Genome Atlas* (<https://portal.gdc.cancer.gov/projects>) utilizando o pacote para R *TCGAbiolinks* (COLAPRICO *et al.*, 2016; MOUNIR *et al.*, 2019). Os conjuntos de dados foram escolhidos por apresentarem como um dos seus objetivos que as amostras primárias e recorrentes fossem pareadas.

Para análise de amostras de LMA, foi utilizado o único conjunto de dados referente a uma coorte pediátrica de LMA da iniciativa TARGET (ID phs000465.v21.p8). Os critérios de seleção para este grupo foram: pacientes que atingiram remissão (<5% de blastos) após dois ciclos de terapia de indução, medula e sangue periférico apresentando >50% de blastos, três ou menos achados citogenéticos clinicamente relevantes e que a amostra apresentasse a quantidade necessária de ácidos nucleicos em alta qualidade. Estes critérios foram estabelecidos pelo grupo de pesquisa que gerou os dados deste estudo. Foram avaliadas amostras de medula no momento do diagnóstico da doença (medula primária), amostras de sangue periférico no momento do diagnóstico (sangue periférico primário) e amostras de medula de pacientes que apresentaram remissão e depois recaíram (medula recorrente).

Para análise de amostras de LLA-B pediátricas foi escolhido apenas o conjunto de dados TARGET-ALL-P2 (ID phs000464.v21.p8), dentre os disponíveis na plataforma pois os critérios de seleção eram os menos excludentes dentre P1, P2 e P3 (diferentes coortes

disponíveis). Os critérios de seleção para P2 foram: haver apresentado recorrência em menos de 4 anos de diagnóstico e que a amostra apresentasse a quantidade necessária de ácidos nucleicos em alta qualidade. Já os critérios de seleção para P1 foram: pacientes classificados como alto risco, pacientes com idades entre 1 e 21 anos eram elegíveis se apresentassem combinações específicas de contagem mais alta de glóbulos brancos e idade geralmente mais avançada (embora qualquer criança com contagem de glóbulos brancos  $> 100.000/uL$  fosse elegível). Por outro lado, os critérios de seleção para P3 foram: pacientes que apresentassem o fenótipo de leucemia aguda de linhagem ambígua.

De acordo com o site da iniciativa TARGET, a extração de RNA do grupo de amostras de LLA-B (TARGET-ALL-P2) que foram utilizadas neste trabalho foi feito por meio de adição de 1mL de TRIzol a 10 milhões de células após descongelamento e lavagem das células (amostras totais de medula ou sangue periférico). Já a extração de RNA do grupo de amostras de LMA (TARGET-AML) foi realizada com o kit *AllPrep* DNA/RNA (Qiagen®). Antes da extração foi realizado isolamento das células mononucleares através de um gradiente Ficoll. Para o processo simultâneo de extração de DNA e RNA foram utilizadas 10 milhões de células mononucleares.

### *1.3 Expressão gênica diferencial*

O tipo de dado selecionado para análise de expressão gênica foi *counts*, que é o número total de transcritos amplificados referente a cada gene pelo método de RNA-seq. Além disso, o pacote edgeR para R foi escolhido para realizar a análise de expressão gênica diferencial, por ser um pacote apropriado para o tipo de dado escolhido e para conjuntos de dados complexos, levando em conta a variabilidade biológica. Um modelo de Poisson superdisperso é usado para explicar a variabilidade biológica e técnica. Os métodos empíricos de Bayes são usados para moderar o grau de superdispersão entre as transcrições, melhorando a confiabilidade da inferência (MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Os grupos comparativos utilizados para análise foram medula recorrente *vs.* medula primária (rec...pbm), medula primária *vs.* sangue periférico primário (prim...prim) e medula recorrente *vs.* sangue periférico primário (rec...ppb). Não necessariamente as amostras de medula primária, medula recorrente ou sangue periférico primário são do mesmo paciente. Os genes significativamente diferencialmente expressos foram considerados como os que apresentaram  $p < 0.05$ .

### 1.4 Over-Representation Analysis (ORA)

Após a obtenção do conjunto de genes significativamente diferencialmente expressos foi realizada a análise de *over-representation*, ou sobre-representação, que consiste na análise de vias enriquecidas no conjunto de genes selecionado. Foi utilizada a plataforma online Consensus Pathway DB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>), que integra diversas bases de dados. Nesta análise, foi utilizada a opção de conjuntos baseados em vias, selecionando apenas opções de vias descritas em bases de dados (Wikipathways, Smpdb, KEGG, Reactome, Pharmgkb, Pid, Biocarta, Ehm, Humancyc, Inoh, Netpath e Signalink). O valor de  $p$  mínimo para que a via estivesse entre as enriquecidas foi 0.01 e o número mínimo de genes por via foi de dois.

### 1.5 Gráficos

Para representação da distribuição da variância entre os pacientes de cada conjunto (LMA e LLA-B), em relação aos dados de expressão gênica, foi utilizado o pacote para R Glimma (SU *et al.*, 2017). Para produção dos *Vulcano plots*, onde visualizamos cada gene como um ponto em um gráfico  $-\log_{10}p$  x  $\log_2\text{FoldChange}$ , utilizamos o pacote para R EnhancedVulcano (BLIGHE; RANA; LEWIS, 2021). Para representação gráfica da expressão diferencial de alguns grupos de genes foi utilizado o pacote para R pheatmap e os valores de *FoldChange* dos genes foram utilizados para realização dos gráficos (<https://www.rdocumentation.org/packages/pheatmap/versions/1.0.12>), sendo que para os genes representados nos *heatmaps* não foi aplicado o valor de  $p < 0.05$  como ponto de corte. Para representação da quantidade de genes compartilhados entre vias de um subconjunto das vias enriquecidas foi utilizado o pacote para R upset (<https://upset.app/>). Para outros gráficos foi utilizado o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016).

## 2. Amostras

Foram analisadas amostras de aspirado de medula de pacientes com LLA-B e LMA atendidos pelo Serviço de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). No HCPA os pacientes recomendados para realização da imunofenotipagem de amostra da medula (requer punção da medula) são internados no Centro Cirúrgico Ambulatorial (CCA) e em 3 dias o procedimento deve ser realizado. Neste período os pacientes, ou representantes legais, são

abordados para assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A abordagem dos participantes, portanto, foi quando o paciente já estiver internado no CCA e anterior a realização do procedimento de punção de medula. Juntamente com a coleta para diagnóstico por imunofenotipagem foram coletados de 1,0 a 2,0 mL a mais para utilização nas análises deste trabalho. A comparação das amostras foi feita relacionando os resultados dos pacientes antes e após o tratamento, sem a necessidade de amostra de indivíduos saudáveis. Isto foi possível pois as amostras são normalmente coletadas no momento do diagnóstico e na avaliação da Doença Residual Mínima (DRM). Devido ao número de células, optou-se por coletar amostras apenas no primeiro momento em que é avaliada a DRM tanto nos pacientes com LMA quanto LLA-B.

As amostras são não probabilísticas voluntárias, sendo o grupo amostral composto por indivíduos do sexo masculino e feminino diagnosticados com LLA-B ou LMA, sem idade mínima ou máxima estabelecidas. Como a amostragem foi realizada por conveniência, no diagnóstico ou na coleta para DRM, o tamanho amostral foi constituído conforme a entrada de pacientes no Setor de Hematologia do HCPA, diagnósticos com LLA-B ou LMA por imunofenotipagem, considerando um tamanho amostral mínimo descrito abaixo.

### *2.1 Critérios de inclusão*

Os critérios de inclusão de pacientes neste estudo foram: 1) Homens ou mulheres, sem idade mínima ou máxima estabelecida; 2) Diagnóstico de LLA-B ou LMA pelo Setor de Hematologia do HCPA; 3) Possibilidade de coleta de 1,0 a 2,0 mL separadamente do aspirado de medula enviado para diagnóstico; 4) Possibilidade de coleta no momento de diagnóstico e na primeira coleta para DRM do mesmo paciente. 5) Possibilidade de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o que implica em falta de déficit cognitivo que incapacite a compreensão do TCLE nos sujeitos de pesquisa maiores de idade que não tenham representantes legais ou, quando os sujeitos eram menores de idade, nos seus responsáveis legais.



## 2.2 Critérios de exclusão

Impossibilidade de coleta de amostra antes e depois do tratamento (no momento do diagnóstico e da primeira coleta para DRM).

## 2.3. Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizado o software G\*Power 3.1 (© 2020 UC REGENTS). O cálculo do tamanho amostral foi realizado considerando a necessidade de realização de testes estatísticos não-paramétricos, já que estes normalmente requerem N maior que testes paramétricos. O tamanho amostral foi calculado para o teste de *Wilcoxon* pareado. Os parâmetros considerados foram duas caudas, distribuição parental normal, tamanho de efeito de 1,  $\alpha$  de 0,05 e poder de 0,8. O tamanho amostral calculado foi de 11 sujeitos. Logo, estimamos um grupo de 11 pacientes para LLA-B e 11 pacientes para LMA. Este tamanho amostral condiz com diversos estudos que realizaram cultura de células advindas de amostras de medula de pacientes com LLA-B ou LMA (BRUSERUD; GJERTSEN; VON VOLKMAN, 2000; BRUSERUD *et al.*, 2002; SPINELLO *et al.*, 2019; WYLIE *et al.*, 2015; XIA *et al.*, 2015; YAMADA *et al.*, 2001).

## 3. Desenho experimental

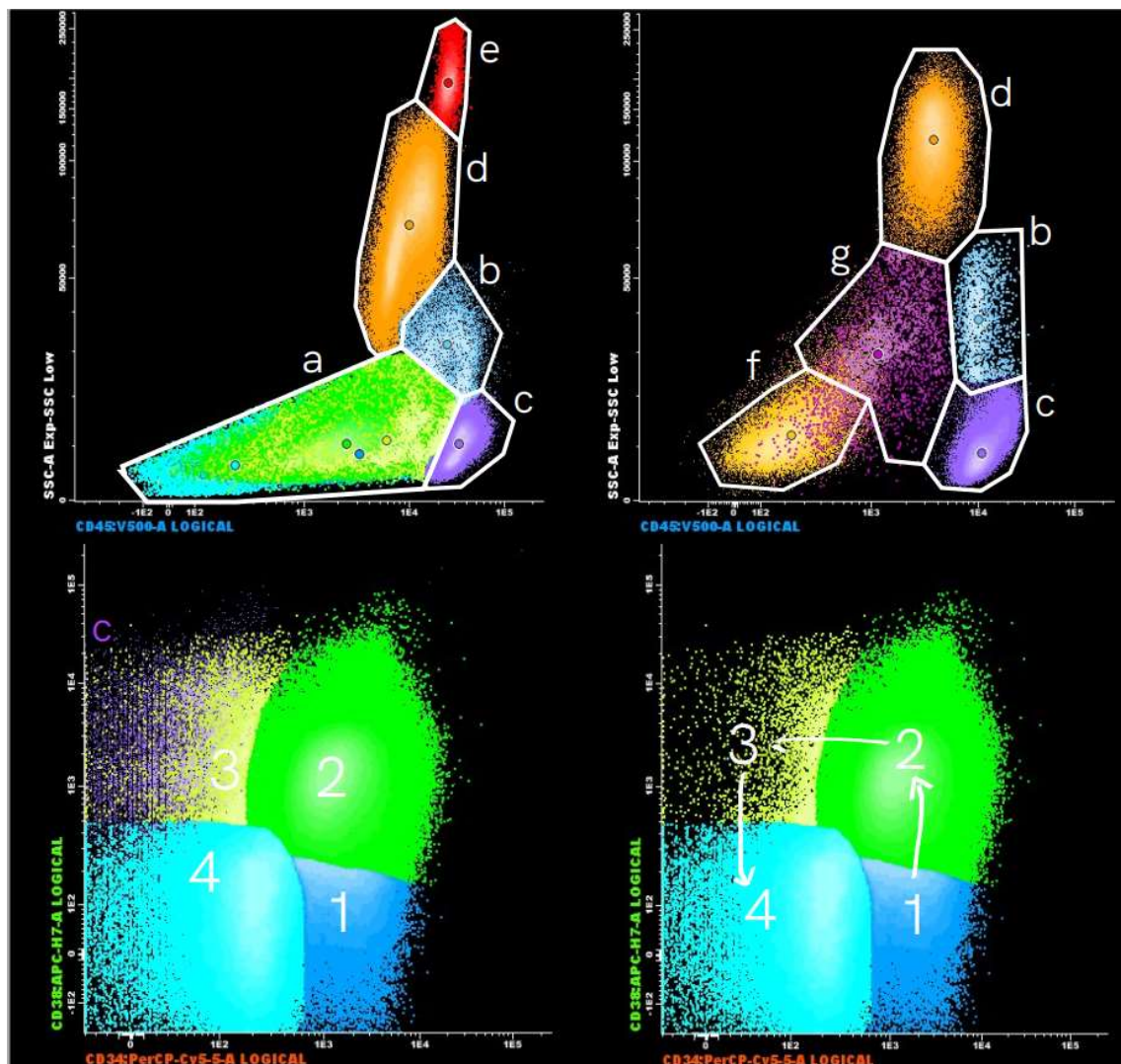
Nesta seção serão descritos os métodos que foram aplicados nas amostras de LLA-B e LMA para identificação de: perfis metabólicos nas populações células *slow-* e *fast-cycling*; perfil de expressão de genes selecionados nas amostras totais; e perfis imunofenotípicos de 4 subpopulações blásticas, dentre outras populações celulares de cada paciente. Sendo que cada paciente será representado por duas amostras no momento do diagnóstico e no momento da avaliação da primeira DRM.

### 3.1 Imunofenotipagem

Estes experimentos foram realizados no citômetro de fluxo FACSCanto II e analisadas no software Infinicyt V 1.7, Cytognos®. O painel de anticorpos utilizado foi anti-CD271 V450,

anti-CD45 V500, anti-CD133 PE, anti-CD34 PerCP-Cy5.5, anti-PD-L1 PE-Cy7, anti-CTLA4 APC, anti-CD38 AP-H7 (todos de BD Biosciences™). Em todas as amostras foram utilizados os mesmos lotes de anticorpos. Os volumes utilizados de cada anticorpo foram otimizados e o protocolo de marcação das amostras e calibração do equipamento foram realizados de acordo com o recomendado pelo consórcio Euroflow, assim como o protocolo de marcação das amostras a partir de amostras totais de medula (<https://www.euroflow.org/protocols/>).

### 3.1.1 Análise e estratégia de *gating*



**Figura 3: Representação esquemática da estratégia de *gating* aplicada.** As figuras da parte superior exemplificam a determinação de cada população de acordo com o *plot* SSC-A x CD45: (a) blastos patológicos, (b) monócitos, (c) linfócitos, (d) neutrófilos, (e) eosinófilos, (f) eritroblastos e (g) células imaturas normais. As figuras da parte inferior demonstram a determinação das quatro populações blásticas analisadas: (1) CD34+CD38-, (2) CD34+CD38+, (3) CD34-CD38+ e (4) CD34-CD38-. À esquerda, está presente também a população de linfócitos

que foi utilizada como guia de CD38<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup>. À direita o fluxo maturativo, presente inclusive de forma não patológica na medula, está destacado.

A estratégia de *gating* está exemplificada na figura 3. Em primeiro momento foram retirados os debris e *doublets* da análise, após cada população celular foi identificada pelo *plot* SSC-A x CD45: blastos (a), monócitos (b), linfócitos (c), neutrófilos (d), eosinófilos (e), eritroblastos (f) e células imaturas normais (g) (presentes especialmente em algumas DRMs). As porcentagens de cada população foram traçadas de forma a acompanhar o relatado no laudo de diagnóstico e DRM de cada paciente. A partir da demarcação de cada população foi analisado o MFI de PD-L1 e CTLA-4 nos neutrófilos, monócitos e linfócitos (quando possível). Além disso, os blastos foram compartimentalizados em quatro populações em distintos estágios de maturação, do mais imaturo ao mais maduro: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>CD38<sup>+</sup> e CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>.

### 3.2 Cultivo celular

As amostras de medula foram coletadas, centrifugadas para o isolamento do plasma e as hemácias foram lisadas com o tampão BD Pharm Lyse<sup>TM</sup>. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (ThermoFisher®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibióticos, à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O tempo de cultivo foi referente ao tempo necessário para realizar as análises, garantindo a viabilidade celular por contagem com o corante Azul de Trypan.

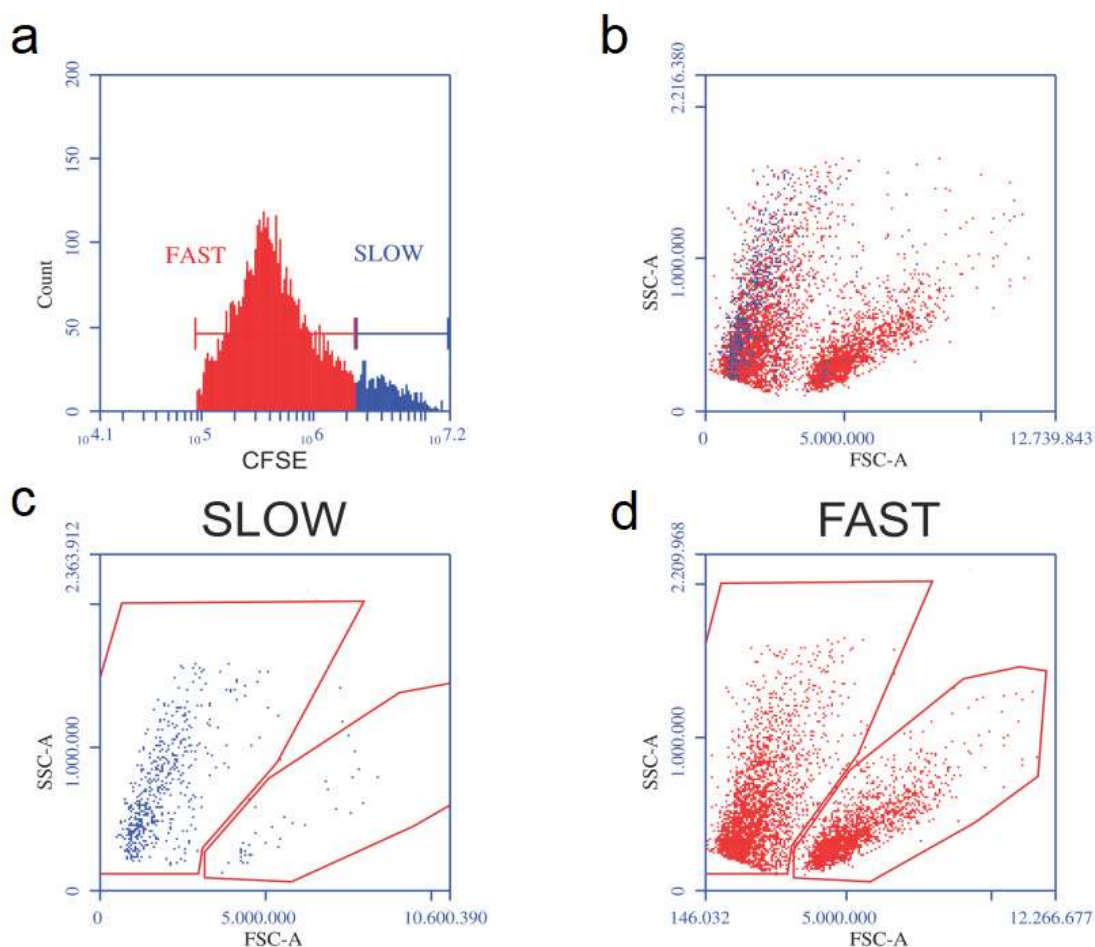
### 3.3 Citometria de fluxo

Primeiramente, entre 1 e 4 milhões foram incubados com as sondas fluorescentes CFSE (em concentração final de 1 μM) e DiD (em concentração final de 1 μM) por 10 minutos em meio sem SBF (número de mL = número de células/10<sup>6</sup>), o processo de marcação é interrompido adicionando 10 volumes de meio sem SBF gelado, as células são lavadas com PBS e mantidas em cultura por 48 horas. Após este período espera-se que as células tenham proliferado, levando em conta a heterogeneidade de populações que pode ser apresentada por uma amostra de um paciente, espera-se que haja populações proliferando em diferentes taxas. Para tanto utilizamos a sonda CFSE para identificar as populações *slow-* e *fast-cycling*, que

visualizamos como picos diferentes ou subpicos no histograma SSC-A x FITC. As células *slow-cycling*, por apresentarem taxa de proliferação mais lenta, retêm mais moléculas de CFSE com o passar do tempo e apresentam maior fluorescência. A sonda CFSE é um marcador fluorescente que se liga covalentemente a moléculas intracelulares e é bastante utilizada para estudos de proliferação celular (CHUNG *et al.*, 2017; DELEYROLLE *et al.*, 2011, 2012), é conhecida a sua capacidade de distribuir-se de forma homogênea entre as células-filhas. Para poder identificar as populações *slow-* e *fast-cycling* e co-marcá-las com sondas que também são FITC (fluorescência similar à da sonda CFSE), utilizamos a sonda DiD (de característica lipofílica, se liga a membranas de forma homogênea). Sendo que a sonda CFSE apresenta um espalhamento das moléculas de CFSE entre as células-filhas da primeira célula marcada mais acurada que a sonda DiD utilizamos as mesmas porcentagens das populações *slow-* e *fast-cycling* observadas com CFSE nas amostras com DiD, do mesmo paciente, incubadas no mesmo momento e circunstâncias. As co-marcações utilizadas foram sondas metabólicas como: a sonda *Mitostatus* TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester) de BD Pharmingen™ a uma concentração final de 20 nM; 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose) de ThermoFisher™ a uma concentração final de 40 μM e Bodipy FL C16 de ThermoFisher™ a uma concentração final de 2 μM. Para a aquisição das amostras e análise dos resultados, foi utilizado o citômetro BD Accuri com o software C6™.

### 3.3.1 Tratamento com CPI-613 e análise da morte celular por citometria de fluxo

Foi realizado um experimento de tratamento das células de uma amostra de LLA-B com a droga CPI-613 (Sigma-Merk™), também conhecida como Devimistat, inibidor da piruvato desidrogenase e da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase (REDDY *et al.*, 2022). As concentrações para curva de dose foram escolhidas baseadas em ensaios com CPI-613 da literatura (PARDEE *et al.*, 2018; STUART *et al.*, 2014; ZACHAR *et al.*, 2011). A curva de dose aplicada foi de 25, 50, 100, 150 e 200 μM de CPI-613 por 24 horas, além das condições controle (apenas meio de cultura) e veículo (DMSO). Em triplicata, avaliamos a morte em células com e sem CFSE, nas células sem CFSE avaliamos a relação entre a marcação com 7AAD (BD Biosciences™), sonda marcadora de células não viáveis, e a estratégia de *gating* criada para separar células vivas (+FSC) de células mortas (-FSC).



**Figura 4: Representação da estratégia de *gating* aplicada na análise de morte celular mediante tratamento com CPI-613.** (a) histograma da fluorescência da sonda CFSE (FITC) e separação dos subpicos correspondentes às células *slow-cycling* (azul) e *fast-cycling* (vermelho). (b) exemplo de *scatter-plot* das células tratadas com CPI-613, em (c) estão destacadas apenas as células *slow-cycling*, incluindo os *gates* de células mortas à esquerda e células vivas à direita, o mesmo está destacado em (d) em relação às células *fast-cycling*.

### 3.4 Função mitocondrial

A avaliação da função da fosforilação oxidativa nas células foi feita no equipamento Oroboros (© 2020 Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, Austria) através do experimento de Respirometria de Alta Resolução, utilizando entre 3.5 e 5 milhões de células por *chamber*, sendo que a normalização do consumo de oxigênio por segundo foi feita por mg de proteína na amostra. O método de dosagem de proteína utilizado foi o Pierce BCA (kit Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit Thermo Scientific<sup>TM</sup>). No protocolo utilizado, as células foram mantidas em meio RPMI-1640 sem soro, a respiração basal é detectada após estabilização da detecção do consumo de O<sub>2</sub>, após são aplicados 4  $\mu$ L de oligomicina (2  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich) para inibição da ATP sintase e visualização da respiração *proton-leak*, que é o vazamento de prótons que pode ocorrer do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, não resultando em

síntese de ATP, mas consumindo O<sub>2</sub>. Em seguida é realizada uma titulação em passos de 1uL com FCCP 0,1 mM, assim atinge-se a capacidade máxima de transferência de elétrons e podemos inferir a respiração máxima. Por fim são aplicados 1uL antimicina A (2,5 µM, Sigma-Aldrich), um inibidor do complexo III, e 1uL de rotenona (0,5 µM, Sigma-Aldrich), um inibidor do complexo I, bloqueando a transferência de elétrons e impedindo qualquer consumo de O<sub>2</sub> pela mitocôndria, observando apenas a respiração extramitocondrial (ROX). A respiração ligada à síntese de ATP é calculada a partir da subtração do proton-leak pela respiração basal e a capacidade reserva é calculada a partir da subtração da respiração máxima pela respiração basal.

### 3.5 Ensaio funcional de proteínas de quimioressistência

A sonda CFDA, AM (5-Carboxyfluorescein Diacetate, Acetoxymethyl Ester) de ThermoFisher® foi utilizada para avaliar a capacidade de alguns transportadores transmembranas, que podem ser utilizados pelas células neoplásicas como bombas de efluxo de drogas anti-neoplásicas. Para o tempo de influxo, as células são incubadas com a sonda em meio sem SFB por 30 minutos (a uma concentração final de 2 µM). Para o tempo de efluxo, as células foram incubadas em meio sem SFB e sem CFDA por um período de 1-3 horas. Durante os tempos de influxo e efluxo são retiradas alíquotas para detecção da fluorescência da sonda CFDA e é avaliada a capacidade das células *slow-* e *fast-cycling* de realizar a extrusão da sonda por citometria de fluxo, utilizando o citômetro BD Accuri C6™ (MATSUNAGA et al., 2006).

### 3.6 Extração de RNA e Reação Quantitativa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

Para avaliação da expressão de alguns genes selecionados foi utilizada a técnica de RT-qPCR em tempo real em termociclador stepOne Plus (Applied Biosystems®) de forma a quantificar os níveis de mRNA. Dentre os transcritos selecionados estão os das enzimas da β-oxidação Acetil-Coa Aciltransferase (*ACCA1*) e Acil-Coa desidrogenase (*ACAD10*) além da dos transportadores de carnitina (*CPT1a* e *CPT2*), passos limitantes para que a β-oxidação ocorra na matriz mitocondrial. Outras enzimas também foram avaliadas como gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) e subunidade B do complexo II da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE) (*SDHB*). Também avaliamos a expressão de conhecidos marcadores de células

*slow-cycling* e *LSCs/CSCs* e relevantes em processo de resistência, *JARID1B*(*KDM5B*, *TET2* e *MYC*.

Para tal, amostras de RNA total de células de pacientes LLA-B e LMA foram isoladas utilizando TRIzol (Invitrogen, California, USA), seguindo instruções do fabricante, e quantificados por espectrofotometria. A síntese de cDNA foi realizada utilizando a enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Wisconsin, USA), conforme protocolo do fabricante, com Random primer como molde. A PCR em tempo real foi realizada em triplicata no sistema StepOne Plus™ PCR em tempo real (Applied Biosystems) usando o GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Wisconsin, EUA), também seguindo as instruções do fabricante.

**Tabela 1: Sequências dos primers *forward* e *reverse* utilizados para amplificação do painel de genes aplicado às amostras de pacientes do HCPA.**

GENE	SEQUÊNCIA DO PRIMER
<i>GNB2L1</i>	<i>Forward</i> 5'- GAGTGTGGCCTTCTCCTCTG -3' <i>Reverse</i> 5'- GCTTGCAGTTAGCCAGGTTC -3'
<i>TET2</i>	<i>Forward</i> 5'- TCAGCAGCAGCCAATAGGAC -3' <i>Reverse</i> 5'- GTCTGGCAAATGGGAGGTGA -3'
<i>JARID1B</i>	<i>Forward</i> 5'- ATGAACCCCAATACCCTGATG -3' <i>Reverse</i> 5'- GCCAATCAACAGTGCAGAAG -3'
<i>CPT1A</i>	<i>Forward</i> 5'- ATCAATCGGACTCTGGAAACGG -3' <i>Reverse</i> 5'- TCAGGGAGTAGCGCATGGT -3'
<i>CPT2</i>	<i>Forward</i> 5'- TGGCCAGTTCAGGAAAACAG -3' <i>Reverse</i> 5'- AAACCAGGGTCCCGAAATGTAG -3'
<i>ACAA2</i>	<i>Forward</i> 5'- CTGCTCCGAGGTGTGTTTGTA -3' <i>Reverse</i> 5'- GGCAGCAAATTCAGACAAGTCA -3'
<i>ACAD10</i>	<i>Forward</i> 5'- CAAACACTCGGCCTGTGAAAA -3' <i>Reverse</i> 5'- ACTAGATCACGATTAGCCAGCC -3'
<i>SDHB</i>	<i>Forward</i> 5'- GTGGCCCCATGGTATTGGAT -3' <i>Reverse</i> 5'- CGGGTGCAAGCTAGAGTGTT -3'
<i>C-MYC</i>	<i>Forward</i> 5'- GGACCCGCTTCTCTGAAAGG -3' <i>Reverse</i> 5'- TAACGTTGAGGGGCATCGTC -3'
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i> 5'- AATGGTAAGGTCGGTGTGTGAA -3' <i>Reverse</i> 5'- GAAGATGGTGATGGGCTTCC -3'

As sequências dos iniciadores para amplificação de genes de interesse e do gene utilizado como normalizador foram projetadas com a ferramenta Primer-BLAST (YE *et al.*, 2012) e estão descritos na Tabela 1. A análise quantitativa dos dados foi realizada usando o método  $\Delta\Delta C_t$  (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008). Os valores foram normalizados com o controle endógeno *GNB2L1* e foram expressos como níveis de expressão relativa.

#### 4. Análise de dados

Os dados foram analisados e seus gráficos foram plotados utilizando o software GraphPad Prism 5. Para os dados de tratamento com CPI-613 foi realizada a análise estatística ANOVA de uma via com múltiplos testes em relação aos controles (sem tratamento). Devido ao N amostral incompleto, análises estatísticas não foram realizadas em outros dados.



## CONCLUSÃO

O entendimento do funcionamento diferencial das *LSCs* e das células *slow-cycling* em relação às outras populações de células leucêmicas é crucial não apenas para encontrar tratamentos que as atinjam especificamente, como também para identificá-las propriamente, com as ferramentas atuais de diagnóstico. Identificar populações potencialmente enriquecidas em *LSCs* e/ou células *slow-cycling* por técnicas de imunofenotipagem e expressão gênica pode, eventualmente, auxiliar na determinação do prognóstico, alocação de risco e acompanhamento das DRMs de pacientes de LMA e LLA-B. O acompanhamento da evolução destas subpopulações de blastos, assim como do restante de células do microambiente tumoral, como as células imunes, traz uma nova camada de complexidade ao estudo das leucemias agudas e caracteriza um potencial próximo passo no diagnóstico e acompanhamento clínico. Ademais, a caracterização de fenótipos metabólicos, dentre outras características relevantes, das *LSCs* e células *slow-cycling* abre caminho para novos alvos de tratamento, que compreendem a complexidade da heterogeneidade tumoral.

## PERSPECTIVAS

Baseado nos achados apresentados neste trabalho algumas perspectivas podem ser listadas, de forma a dar continuidade ao racional lógico estabelecido. Primeiramente, completar o N de amostras pretendido para os experimentos com amostras de medula dos pacientes do HCPA. Desta forma, poderemos concluir sobre os fenômenos observados e discutidos aqui com mais clareza. Secundariamente, aplicar os resultados das análises de bioinformática, avaliando a expressão gênica e proteica de alguns genes que demonstraram potencial como marcadores de interesse nas amostras de pacientes do HCPA. Será interessante expandir os painéis de expressão gênica analisados nos pacientes do HCPA. Assim como, expandir os painéis de imunofenotipagem aplicados, de modo a determinar exatamente a presença, quantidade e características das células *LSCs* e *slow-cycling*. Pretendemos dosar citocinas inflamatórias no plasma da medula dos pacientes, dosar a atividade de LDH no plasma da medula e dosar a atividade de GAPDH nos blastos no momento do DX e da DRM. Futuramente, pretendemos também incluir amostras de LLA-T no mesmo fluxograma de estudo apresentado aqui para LLA-B e LMA. Continuaremos a avaliar o efeito do tratamento de CPI-613 sobre blastos e seu potencial efeito diferencial sobre células *slow-cycling* e *fast-cycling*, assim como avaliaremos a ação de outros inibidores que podem vir a ser relevantes sabendo mais sobre as características que diferenciam as células *slow-cycling* das *fast-cycling* nas leucemias agudas. Eventualmente, pretendemos realizar experimentos de *cell sorting* para comprovar o perfil que viermos a estabelecer para as células *slow-cycling* e avaliar a expressão de marcadores de *LSCs* nesta população.

Ademais, pretendemos realizar projetos de análise retrospectiva de dados de imunofenotipagem e citometria de pacientes diagnosticados com LMA e LLA-B no HCPA desde 2015. Analisaremos os arquivos do DX e de cada DRM de forma similar a estratégia de *gating* aplicada neste trabalho nos ensaios de imunofenotipagem, utilizando marcadores já normalmente aplicados nos métodos de diagnóstico em análises clínicas, contemplando a heterogeneidade e complexidade das populações blásticas de cada paciente e associar com o desfecho clínico.

Finalmente, pretendemos utilizar dados de expressão gênica em análises *single-cell* de amostras de pacientes com LMA e LLA-B para identificar diferentes populações blásticas e, potencialmente, populações de *LSCs* e células *slow-cycling*.

## REFERÊNCIAS

AHN, Antonio; CHATTERJEE, Aniruddha; ECCLES, Michael R. The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1002–1009, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0535>

AHN, Antonio; CHATTERJEE, Aniruddha; ECCLES, Michael R. The Slow Cycling Phenotype: A Growing Problem for Treatment Resistance in Melanoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1002–1009, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0535>

ALDOSS, Ibrahim; STEIN, Anthony S. Advances in adult acute lymphoblastic leukemia therapy. **Leukemia and Lymphoma**, [s. l.], v. 59, n. 5, p. 1033–1050, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1354372>

AMAYA, Maria L. *et al.* The STAT3-MYC axis promotes survival of leukemia stem cells by regulating SLC1A5 and oxidative phosphorylation. **Blood**, [s. l.], v. 139, n. 4, p. 584–596, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2021013201>. Acesso em: 22 mar. 2022.

ANSELMINI, Laura *et al.* Insights on the interplay between cells metabolism and signaling: A therapeutic perspective in pediatric acute leukemias. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 17, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21176251>

ARBER, Daniel A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 127, n. 20, p. 2391–2405, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-03-643544>. Acesso em: 28 abr. 2022.

ARFONS, Lisa M. *et al.* Second hematopoietic stem cell transplantation in myeloid malignancies. **Current opinion in hematology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 112–123, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOH.0B013E3283257A87>. Acesso em: 7 mar. 2022.

ARNONE, Marlon *et al.* Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: The Challenges of Phenotypic Heterogeneity. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 1–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS12123742>. Acesso em: 7 mar. 2022.

BANELLI, Barbara *et al.* The histone demethylase KDM5A is a key factor for the resistance to temozolomide in glioblastoma. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, [s. l.], v. 14, n. 21, p. 3418–3429, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1090063>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BARNES, Ryan P. *et al.* DNA Polymerase Eta Prevents Tumor Cell-Cycle Arrest and Cell Death during Recovery from Replication Stress. **Cancer research**, [s. l.], v. 78, n. 23, p. 6549–6560, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-3931>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BARZEGAR BEHROOZ, Amir; SYAHIR, Amir; AHMAD, Syahida. CD133: beyond a cancer stem cell biomarker. **Journal of drug targeting**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 257–269, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>. Acesso em: 23 mar. 2022.

BENNETT, John M.; ANDERSEN, Janet W.; CASSILETH, Peter A. **Long term survival in acute myeloid leukemia: The eastern cooperative oncology group (ECOG) experience.** [S. l.: s. n.], 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0145-2126\(91\)90124-C](https://doi.org/10.1016/0145-2126(91)90124-C)

BERNARD, J. *et al.* Acute Promyelocytic Leukemia: Results of Treatment by Daunorubicin. **Blood**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 489–496, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V41.4.489.489>. Acesso em: 6 mar. 2022.

BHATIA, Bobby *et al.* Cell-autonomous induction of functional tumor suppressor 15-lipoxygenase 2 (15-LOX2) contributes to replicative senescence of human prostate progenitor cells. **Oncogene**, [s. l.], v. 24, n. 22, p. 3583–3595, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1208406>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BILL, Marius *et al.* Mutations associated with a 17-gene leukemia stem cell score and the score's prognostic relevance in the context of the European LeukemiaNet classification of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 721–729, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/HAEMATOL.2019.225003>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BLAIR, Allison; SUTHERLAND, Heather J. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo lack surface expression of c-kit (CD117). **Experimental hematology**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 660–671, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(00\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(00)00155-7). Acesso em: 12 mar. 2022.

BLIGHE, K; RANA, S; LEWIS, M. **EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots**

**with enhanced colouring and labeling.** [S. l.], 2021. Disponível em: <https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano>.

BONNET, Dominique; DICK, John E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature medicine**, [s. l.], v. 3, n. 7, p. 730–737, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NM0797-730>. Acesso em: 12 mar. 2022.

BOROWITZ, Michael J. *et al.* 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**, [s. l.], v. 111, n. 12, p. 5477–5485, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-132837>

BORTOLOZZI, Roberta *et al.* AKR1C enzymes sustain therapy resistance in paediatric T-ALL. **British Journal of Cancer** 2018 118:7, [s. l.], v. 118, n. 7, p. 985–994, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0014-0>. Acesso em: 23 mar. 2022.

BOUMAHDJ, Soufiane; DE SAUVAGE, Frederic J. The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 39–56, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0044-1>

BRISTOT, Ivi Juliana *et al.* Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells. **Critical reviews in oncology/hematology**, [s. l.], v. 153, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2020.102995>. Acesso em: 14 mar. 2022.

BRODSKÁ, Barbora *et al.* High PD-L1 Expression Predicts for Worse Outcome of Leukemia Patients with Concomitant NPM1 and FLT3 Mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 2823, p. 1–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20112823>. Acesso em: 23 mar. 2022.

BRUSERUD, Oystein *et al.* In vitro culture of human acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells in serum-free media; a comparison of native ALL blasts, ALL cell lines and virus-transformed B cell lines. **Leukemia Research**, [s. l.], v. 27, p. 455–464, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/152581600750062372>

BRUSERUD; GJERTSEN, B. T.; VON VOLKMAN, H. L. In vitro culture of human acute myelogenous leukemia (AML) cells in serum-free media: Studies of native AML blasts and AML cell lines. **Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research**, [s. l.], v. 9, n. 6, p.

923–932, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/152581600750062372>

CAMPANA, Dario. **Minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia**. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e3283543d5c>. Acesso em: 22 mar. 2020.

CAMPBELL, Myriam *et al.* **ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia**. [S. l.: s. n.], 2009.

CASSIM, Shamir; POUYSSEGUR, Jacques. Tumor microenvironment: A metabolic player that shapes the immune response. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 157, p. 1–23, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21010157>

CASTRO, Isabel; SAMPAIO-MARQUES, Belém; LUDOVICO, Paula. Targeting Metabolic Reprogramming in Acute Myeloid Leukemia. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 967, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8090967>

CHAUFFAILLE, MLLF *et al.* Acute promyelocytic leukemia: the study of t(15;17) translocation by fluorescent in situ hybridization, reverse transcriptase-polymerase chain reaction and cytogenetic techniques. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [s. l.], v. 34, n. 6, p. 735–743, 2001.

CHAVEZ-GONZALEZ, Antonieta *et al.* Novel strategies for targeting leukemia stem cells: sounding the death knell for blood cancer. **Cellular Oncology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–20, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0297-1>

CHAVEZ-GONZALEZ, Antonieta *et al.* Novel strategies for targeting leukemia stem cells: sounding the death knell for blood cancer. **Cellular Oncology**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 1–20, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13402-016-0297-1>

CHEN, Chiqi *et al.* Oxidative phosphorylation enhances the leukemogenic capacity and resistance to chemotherapy of B cell acute lymphoblastic leukemia. **Science Advances**, [s. l.], v. 7, n. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd6280>

CHEN, Wen Lian *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. **Blood**, [s. l.], v. 124, n. 10, p. 1645–1654, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.1182/BLOOD-2014-02-554204>. Acesso em: 7 mar. 2022.

CHEN, Yaoyu *et al.* Arachidonate 15-lipoxygenase is required for chronic myeloid leukemia stem cell survival. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 124, n. 9, p. 3847–3862, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI66129>. Acesso em: 23 mar. 2022.

CHEN, Yulin *et al.* Quiescence and attenuated DNA damage response promote survival of esophageal cancer stem cells. **Journal of cellular biochemistry**, [s. l.], v. 113, n. 12, p. 3643–3652, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/JCB.24228>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CHO, Jaebeom *et al.* The ATF6-EGF Pathway Mediates the Awakening of Slow-Cycling Chemoresistant Cells and Tumor Recurrence by Stimulating Tumor Angiogenesis. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 1–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS12071772>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CHUNG, Soobin *et al.* Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: Application to cell lines and cocultures. **Cytometry Part A**, [s. l.], v. 91, n. 7, p. 704–712, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23105>

CIMMINO, Luisa *et al.* Restoration of TET2 Function Blocks Aberrant Self-Renewal and Leukemia Progression. **Cell**, [s. l.], v. 170, n. 6, p. 1079-1095.e20, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.032>

COLAPRICO, Antonio *et al.* TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. e71–e71, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1507>. Acesso em: 13 mar. 2022.

COUSTAN-SMITH, Elaine *et al.* Universal monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. **JCI insight**, [s. l.], v. 3, n. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI.INSIGHT.98561>. Acesso em: 14 mar. 2022.

CROWTHER, D *et al.* Management of Adult Acute Myelogenous Leukaemia. **British Medical Journal**, [s. l.], v. 1, n. 5846, p. 131–137, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5846.131>

DARWISH, Noureldien H.E. *et al.* Acute myeloid leukemia stem cell markers in prognosis

and targeted therapy: potential impact of BMI-1, TIM-3 and CLL-1. **Oncotarget**, [s. l.], v. 7, n. 36, p. 57811–57820, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.11063>. Acesso em: 14 mar. 2022.

DELEYROLLE, Loic P. *et al.* Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. **Brain**, [s. l.], v. 134, n. 5, p. 1331–1343, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/brain/awr081>

DELEYROLLE, Loic P. *et al.* Identification and isolation of slow-dividing cells in human glioblastoma Using Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE). **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 62, p. 3–7, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/3918>

DÖHNER, Hartmut *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. **Blood**, [s. l.], v. 129, n. 4, p. 424, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2016-08-733196>. Acesso em: 7 mar. 2022.

DUY, Cihangir *et al.* Chemotherapy induces senescence-like resilient cell capable of initiating AML recurrence. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 1542–1561, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1375>

EGAN, Sean *et al.* Slow-Cycling Cells in Glioblastoma: A Specific Population in the Cellular Mosaic of Cancer Stem Cells. **Cancers**, [s. l.], v. 2022, p. 1126, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers14051126>

EL-AZIZ, Sherin M. Abd; SALEM, Dalia A.; SALAH-ELDIN, Manal A. Clinical relevance of thrombospondin receptor (CD36) expression in Egyptian de novo adult acute myeloid leukemia. **The Egyptian Journal of Haematology**, [s. l.], v. 38, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.7123/01.EJH.0000423008.85761.A3>. Acesso em: 23 mar. 2022.

ELCHEVA, Irina A. *et al.* RNA-binding protein IGF2BP1 maintains leukemia stem cell properties by regulating HOXB4, MYB, and ALDH1A1. **Leukemia**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1354–1363, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41375-019-0656-9>. Acesso em: 14 mar. 2022.

ELKASHTY, Osama A. *et al.* Cancer stem cells enrichment with surface markers CD271 and CD44 in human head and neck squamous cell carcinomas. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 458–466, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGZ182>. Acesso em: 23



mar. 2022.

ELLISON, R. R. *et al.* Arabinosyl Cytosine: A Useful Agent in the Treatment of Acute Leukemia in Adults. **Blood**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 507–523, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V32.4.507.507>

FATTORE, Luigi; MANCINI, Rita; CILIBERTO, Gennaro. Cancer Stem Cells and the Slow Cycling Phenotype: How to Cut the Gordian Knot Driving Resistance to Therapy in Melanoma. **Cancers**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1–21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/CANCERS12113368>. Acesso em: 14 mar. 2022.

FOERSTER, Yannick *et al.* Relevance of Neurotrophin Receptors CD271 and TrkC for Prognosis, Migration, and Proliferation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1167, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells8101167>. Acesso em: 17 nov. 2019.

FRANCESCANGELI, Federica *et al.* A pre-existing population of ZEB2 + quiescent cells with stemness and mesenchymal features dictate chemoresistance in colorectal cancer. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, [s. l.], v. 39, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13046-019-1505-4>. Acesso em: 14 mar. 2022.

GARG, Swati *et al.* Hepatic leukemia factor is a novel leukemic stem cell regulator in DNMT3A, NPM1, and FLT3-ITD triple-mutated AML. **Blood**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 263–276, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.2018862383>. Acesso em: 14 mar. 2022.

GHAEIDAMINI, Maryam Harouni *et al.* Fatty acid synthase, a novel poor prognostic factor for acute lymphoblastic leukemia which can be targeted by ginger extract. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70839-9>

GIANNOPOULOS, Krzysztof. Targeting Immune Signaling Checkpoints in Acute Myeloid Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 236, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm8020236>

GIBSON, Brenda *et al.* **ICC APL STUDY 01: Treatment study for children and adolescents with Acute Promyelocytic Leukemia**. [S. l.: s. n.], 2008.

GLUMAC, Paige M; LEBEAU, Aaron M. The role of CD133 in cancer: a concise review. **Clinical and translational medicine**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>. Acesso em: 17 nov. 2019.

GRIMWADE, D *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. **Blood**, [s. l.], v. 92, n. 7, p. 2322–2333, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746770>. Acesso em: 22 mar. 2020.

GUIÈZE, Romain *et al.* Mitochondrial Reprogramming Underlies Resistance to BCL-2 Inhibition in Lymphoid Malignancies. **Cancer Cell**, [s. l.], p. 1–16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.08.005>

GUO, Huidong *et al.* PBX3 is essential for leukemia stem cell maintenance in MLL-rearranged leukemia. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 141, n. 2, p. 324–335, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/IJC.30739>. Acesso em: 14 mar. 2022.

GUO, Rongqun *et al.* Single-cell map of diverse immune phenotypes in the acute myeloid leukemia microenvironment. **Biomarker Research**, [s. l.], v. 9, n. 15, p. 1–16, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00265-0>. Acesso em: 23 mar. 2022.

HAMERSCHLAK, Nelson. Leukemia: Genetics and prognostic factors. **Jornal de Pediatria**, [s. l.], v. 84, n. 4 SUPPL., p. 52–57, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2223/JPED.1785>

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, [s. l.], v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, [s. l.], v. 100, p. 57–70, 2000.

HEO, Sook Kyoung *et al.* CD45 dim CD34 + CD38 - CD133 + cells have the potential as leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. **BMC cancer**, [s. l.], v. 20, n. 1, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12885-020-06760-1>. Acesso em: 23 mar. 2022.

HO, Jenny M. *et al.* CD200 expression marks leukemia stem cells in human AML. **Blood advances**, [s. l.], v. 4, n. 21, p. 5402–5413, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOODADVANCES.2020001802>. Acesso em: 14 mar. 2022.

HOANG-MINH, Lan B *et al.* Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 37, n. 23, p. e98772, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/emj.201798772>

HOANG-MINH, Lan B *et al.* Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 37, n. 23, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/emj.201798772>. Acesso em: 17 nov. 2019.

HOHTARI, Helena *et al.* Immune cell constitution in bone marrow microenvironment predicts outcome in adult ALL. **Leukemia**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 1570–1582, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0360-1>

HUA, Yingqi *et al.* Slow down to stay alive: HER4 protects against cellular stress and confers chemoresistance in neuroblastoma. **Cancer**, [s. l.], v. 118, n. 20, p. 5140–5154, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/CNCR.27496>. Acesso em: 14 mar. 2022.

HUANG, Y *et al.* JARID1B in acute lymphoblastic leukemia. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences** [s. l.], v. 22. 1366–1373, 2018.

INABA, Hiroto; GREAVES, Mel; MULLIGHAN, Charles G. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, [s. l.], v. 381, n. 9881, p. 1–27, 2013. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4).

INABA, Hiroto; MULLIGHAN, Charles G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, [s. l.], v. 105, n. 11, p. 2524–2539, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.247031>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019**. [S. l.: s. n.], 2018. v. 1 Disponível em: <https://doi.org/978-85-7318-194-4>

IWAI, Yoshiko *et al.* Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0329-9>

JIANG, Zhiwu *et al.* CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia. **Biomarker research**, [s. l.], v. 4, p. 23, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40364-016-0080-5>. Acesso em: 17 nov. 2019.

JITSCHIN, Regina *et al.* Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 123, n. 17, p. 2663–2672, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-532200>

JONES, Courtney L. *et al.* Inhibition of Amino Acid Metabolism Selectively Targets Human Leukemia Stem Cells. **Cancer Cell**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 724-740.e4, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.005>

JONES, Tania A. *et al.* Molecular analysis of pediatric brain tumors identifies microRNAs in pilocytic astrocytomas that target the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. **Acta neuropathologica communications**, [s. l.], v. 3, p. 86, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S40478-015-0266-3>. Acesso em: 14 mar. 2022.

KALYANARAMAN, Balaraman *et al.* Teaching the basics of reactive oxygen species and their relevance to cancer biology: Mitochondrial reactive oxygen species detection, redox signaling, and targeted therapies. **Redox Biology**, [s. l.], v. 15, p. 347–362, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.12.012>

KANG, Sung Han *et al.* Expression of Immune Checkpoint Receptors on T-Cells and Their Ligands on Leukemia Blasts in Childhood Acute Leukemia. **Anticancer Research**, [s. l.], v. 39, n. 10, p. 5531–5539, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21873/ANTICANRES.13746>. Acesso em: 23 mar. 2022.

KANZAKI, Ryu; PIETRAS, Kristian. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: Opportunities for precision medicine. **Cancer science**, [s. l.], v. 111, n. 8, p. 2708–2717, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CAS.14537>. Acesso em: 7 mar. 2022.

KHWAJA, Asim *et al.* Acute myeloid leukaemia. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NRDP.2016.10>

KONRAD, Christina Valbirk *et al.* The role of cancer stem cells in tumor heterogeneity and resistance to therapy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 1–15, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0079>

KRUSE, Aaron *et al.* Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 1054, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1729730>

LAGADINOU, Eleni D. *et al.* BCL-2 inhibition targets oxidative phosphorylation and selectively eradicates quiescent human leukemia stem cells. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 329–341, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.013>

LAPIDOT, Tsvee *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, [s. l.], v. 367, n. 6464, p. 645–648, 1994a. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/367645a0>

LAPIDOT, Tsvee *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, [s. l.], v. 367, n. 6464, p. 645–648, 1994b. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/367645a0>

LAURENT, Stefania *et al.* CTLA-4 expressed by chemoresistant, as well as untreated, myeloid leukaemia cells can be targeted with ligands to induce apoptosis. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 136, n. 4, p. 597–608, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.2006.06472.X>

LEE, Kyung min *et al.* MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. **Cell metabolism**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 633-647.e7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.09.009>. Acesso em: 22 mar. 2022.

LENZ, Luana S. *et al.* Cancer cell fitness is dynamic. **Cancer Research**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 1040–1051, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2488>

LI, Jia Rui *et al.* Identification of leukemia stem cell expression signatures through Monte Carlo feature selection strategy and support vector machine. **Cancer gene therapy**, [s. l.], v. 27, n. 1–2, p. 56–69, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41417-019-0105-Y>. Acesso em: 14 mar. 2022.

LI, Xuefeng *et al.* TOP2Ahigh is the phenotype of recurrence and metastasis whereas TOP2A<sup>neg</sup> cells represent cancer stem cells in prostate cancer. **Oncotarget**, [s. l.], v. 5, n. 19, p. 9498–9513, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.2411>. Acesso em: 14 mar. 2022.

LICHTMAN, Marshall A. A historical perspective on the development of the cytarabine (7days) and daunorubicin (3days) treatment regimen for acute myelogenous leukemia: 2013 the 40th anniversary of 7+3. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 119–130, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2012.10.005>

LIU, Geou Yarh. CD133 as a regulator of cancer metastasis through the cancer stem cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [s. l.], v. 106, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2018.10.013>. Acesso em: 23 mar. 2022.

LIU, Hongtao. Emerging agents and regimens for AML. **Journal of Hematology and Oncology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01062-w>

LIU, Yongliang *et al.* CD9, a potential leukemia stem cell marker, regulates drug resistance and leukemia development in acute myeloid leukemia. **Stem cell research & therapy**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13287-021-02155-6>. Acesso em: 14 mar. 2022.

LOGHAVI, Sanam; KUTOK, Jeffery L.; JORGENSEN, Jeffrey L. B-acute lymphoblastic leukemia/lymphoblastic lymphoma. **American Journal of Clinical Pathology**, [s. l.], v. 144, n. 3, p. 393–410, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1309/AJCPAN7BH5DNYWZB>

LYLE, Stephen; MOORE, Nathan. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: A review of the evidence and discussion of significance. **Journal of Oncology**, [s. l.], v. 2011, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2011/396076>

MARTIN, Gaëlle H. *et al.* CD97 is a critical regulator of acute myeloid leukemia stem cell function. **The Journal of experimental medicine**, [s. l.], v. 216, n. 10, p. 2362–2377, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/JEM.20190598>. Acesso em: 14 mar. 2022.

MASSETT, Matthew E. *et al.* A KDM4A-PAF1-mediated epigenomic network is essential

for acute myeloid leukemia cell self-renewal and survival. **Cell death & disease**, [s. l.], v. 12, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41419-021-03738-0>. Acesso em: 14 mar. 2022.

MASTELARO DE REZENDE, Marina; FERREIRA, Alice T.; PAREDES-GAMERO, Edgar J. Leukemia stem cell immunophenotyping tool for diagnostic, prognosis, and therapeutics. **Journal of Cellular Physiology**, [s. l.], v. 235, n. 6, p. 4989–4998, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.29394>

MCCARTHY, Davis J.; CHEN, Yunshun; SMYTH, Gordon K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 40, n. 10, p. 4288–4297, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS042>. Acesso em: 13 mar. 2022.

MCGRANAHAN, Nicholas; SWANTON, Charles. Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future. **Cell**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 613–628, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.01.018>. Acesso em: 7 mar. 2022.

MESBAHI, Yashar *et al.* Exploring the Metabolic Landscape of AML: From Haematopoietic Stem Cells to Myeloblasts and Leukaemic Stem Cells. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 12, p. 1, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.807266>. Acesso em: 7 mar. 2022.]

MIN, Mingwei; SPENCER, Sabrina L. Spontaneously slow-cycling subpopulations of human cells originate from activation of stress-response pathways. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 1–25, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000178>

MOUNIR, Mohamed *et al.* New functionalities in the TCGAbiolinks package for the study and integration of cancer data from GDC and GTEx. **PLoS computational biology**, [s. l.], v. 15, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1006701>. Acesso em: 13 mar. 2022.

NAJAFI, Masoud *et al.* Macrophage polarity in cancer: A review. **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 3, p. 2756–2765, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.27646>

NGUYEN, Chi Huu *et al.* IL2RA Promotes Aggressiveness and Stem Cell-Related Properties of Acute Myeloid Leukemia. **Cancer research**, [s. l.], v. 80, n. 20, p. 4527–4539, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0531>. Acesso em: 23 mar. 2022.

NICOLAE SAVA, Cristian *et al.* Unusual extramedullary relapses in a case of common B-cell acute lymphoblastic leukemia. Case report and review of literature. **Rom J Morphol Embryol**, [s. l.], v. 60, n. 1, p. 249–254, 2019. Disponível em: <http://www.rjme.ro/>. Acesso em: 6 mar. 2022.

OSTYN, Pauline *et al.* Transient TNF regulates the self-renewing capacity of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent models of melanoma. **Cell communication and signaling : CCS**, [s. l.], v. 12, n. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S12964-014-0052-Z>. Acesso em: 23 mar. 2022.

PANUZZO, Cristina *et al.* Mitochondria: A Galaxy in the Hematopoietic and Leukemic Stem Cell Universe. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/IJMS21113928>. Acesso em: 7 mar. 2022.

PARDEE, Timothy S. *et al.* A Phase I Study of CPI-613 in Combination with High-Dose Cytarabine and Mitoxantrone for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 2060–2073, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2282>. Acesso em: 23 mar. 2022.

PARDEE, Timothy S. *et al.* A Phase I Study of CPI-613 in Combination with High-Dose Cytarabine and Mitoxantrone for Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 2060–2073, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-2282>. Acesso em: 19 mar. 2022.

PARDEE, Timothy S. *et al.* A phase I study of the first-in-class antimetabolic agent, CPI-613, in patients with advanced hematologic malignancies. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, [s. l.], v. 20, n. 20, p. 5255–5264, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1019>. Acesso em: 23 mar. 2022.

PASCUAL, Gloria *et al.* Targeting metastasis-initiating cells through the fatty acid receptor CD36. **Nature**, [s. l.], v. 541, n. 7635, p. 41–45, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NATURE20791>. Acesso em: 14 mar. 2022.

PAVLOVA, Natalya N.; THOMPSON, Craig B. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 27–47, 2016. Disponível em:



<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>

PEHLIVAN, Katherine C.; DUNCAN, Brynn B.; LEE, Daniel W. CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. **Current Hematologic Malignancy Reports**, [s. l.], v. 13, n. 5, p. 396–406, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11899-018-0470-X>

PELCOVITS, Ari; NIROULA, Rabin. Acute Myeloid Leukemia: A Review. **Rhode Island medical journal**, [s. l.], v. 103, n. 3, p. 38–40, 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32236160>

PEREGO, M. *et al.* A slow-cycling subpopulation of melanoma cells with highly invasive properties. **Oncogene**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 302–312, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2017.341>

PIANKO, Matthew J. *et al.* Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. **Stem cell investigation**, [s. l.], v. 4, n. APR, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.21037/SCI.2017.03.04>. Acesso em: 23 mar. 2022.

PLESA, Adriana *et al.* Higher percentage of CD34 + CD38- cells detected by multiparameter flow cytometry from leukapheresis products predicts unsustained complete remission in acute myeloid leukemia. **Leukemia and Lymphoma**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 622–629, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10428194.2014.927453>

PRASETYANTI, Pramudita R.; MEDEMA, Jan Paul. Intra-tumor heterogeneity from a cancer stem cell perspective. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0600-4>

PUI, Ching-hon; EVANS, William E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **New England Journal of Medicine** [s. l.], Jan 12, v. 354, n. 2, p. 166-178. doi: 10.1056/NEJMra052603.

PUIG, Isabel *et al.* TET2 controls chemoresistant slow-cycling cancer cell survival and tumor recurrence. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 128, n. 9, p. 3887–3905, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI96393>

RADU, Letitia Elena *et al.* Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for

Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. **Frontiers in Oncology**, [s. l.], v. 10, n. June, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00923>

REDDY, Vijay *et al.* In vitro and in vivo metabolism of a novel antimitochondrial cancer metabolism agent, CPI-613, in rats and human . **Drug Metabolism and Disposition**, [s. l.], p. DMD-AR-2021-000726, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/dmd.121.000726>

REYA, Tannishtha *et al.* Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, [s. l.], v. 414, n. 6859, p. 105–111, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/35102167>. Acesso em: 4 jun. 2019.

RICCIARDI, Maria Rosaria *et al.* Targeting the leukemia cell metabolism by the CPT1a inhibition: Functional preclinical effects in leukemias. **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 16, p. 1925–1929, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-617498>

ROBINSON, Mark D.; MCCARTHY, Davis J.; SMYTH, Gordon K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616>. Acesso em: 13 mar. 2022.

ROESCH, Alexander *et al.* A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor Growth. **Cell**, [s. l.], v. 141, n. 4, p. 583–594, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.020>

ROWE, Jacob M. The “7+3” regimen in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. 3, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2021.280161>

SACHS, Karen *et al.* Single-Cell Gene Expression Analyses Reveal Distinct Self-Renewing and Proliferating Subsets in the Leukemia Stem Cell Compartment in Acute Myeloid Leukemia. **Cancer research**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 458–470, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2932>. Acesso em: 14 mar. 2022.

SAMRA, Bachar *et al.* Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and future directions. **Journal of Hematology & Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 1–17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00905-2>. Acesso em: 22 mar. 2022.

SAMUDIO, Ismael; KONOPLEVA, Marina. **Targeting leukemia's fatty tooth**. [S. l.]: American Society of Hematology, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2015-08-665125>

SANCHO, Patricia; BARNEDA, David; HEESCHEN, Christopher. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 114, n. 12, p. 1305–1312, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>

SARRY, Jean Emmanuel *et al.* Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ c-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, [s. l.], v. 121, n. 1, p. 384–395, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI41495>. Acesso em: 12 mar. 2022.

SAÚDE, Ministério da; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil**. [S. l.], 2020.

SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>. Acesso em: 21 mar. 2022.

SCHRAPPE, M. *et al.* Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. **Leukemia**, [s. l.], v. 14, n. 12, p. 2205–2222, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401973>

SCHRAPPE, Martin *et al.* Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: Results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. **Blood**, [s. l.], v. 118, n. 8, p. 2077–2084, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-338707>. Acesso em: 22 mar. 2020.

SEIGEL, Gail M. *et al.* Human embryonic and neuronal stem cell markers in retinoblastoma. **Molecular Vision**, [s. l.], v. 13, p. 823, 2007. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2768758/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/161268758/). Acesso em: 14 mar. 2022.

SENFT, Daniela; JEREMIAS, Irmela. A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 69, p. 1–10, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.09.006>

SENFT, Daniela; JEREMIAS, Irmela. A rare subgroup of leukemia stem cells harbors relapse-inducing potential in acute lymphoblastic leukemia. **Experimental Hematology**, [s. l.], v. 69, p. 1–10, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.09.006>

SENGA, Sasi S.; GROSE, Richard P. Hallmarks of cancer—the new testament.pdf. **Open Biology**, [s. l.], v. 1, n. 200358, p. 1–20, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rsob.200358>

SHACKLETON, Mark *et al.* Heterogeneity in Cancer: Cancer Stem Cells versus Clonal Evolution. **Cell**, [s. l.], v. 138, n. 5, p. 822–829, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.017>

SHARPE, Arlene H.; FREEMAN, Gordon J. The B7-CD28 superfamily. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 116–126, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri727>

SHIMADA, Akira *et al.* Tandem Duplications of MLL and FLT3 Are Correlated With Poor Prognoses in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: A Study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. **Pediatric Blood & Cancer**, [s. l.], v. 50, p. 264–269, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pbc>

SIEGEL, Rebecca L. *et al.* Cancer statistics, 2022. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 7–33, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21708>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21590>

SIMSEK, Tugba *et al.* The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. **Cell stem cell**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 380–390, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.07.011>. Acesso em: 7 mar. 2022.

SPINELLO, Isabella *et al.* The small-molecule compound AC-73 targeting CD147 inhibits leukemic cell proliferation, induces autophagy and increases the chemotherapeutic sensitivity of acute myeloid leukemia cells. **Haematologica**, [s. l.], v. 104, n. 5, p. 973–985, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.199661>

STÄUBERT, Claudia *et al.* Rewired metabolism in drug-resistant leukemia cells: A metabolic switch hallmarked by reduced dependence on exogenous glutamine. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 290, n. 13, p. 8348–8359, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.618769>

STUART, Shawn D *et al.* A strategically designed small molecule attacks alpha-ketoglutarate dehydrogenase in tumor cells through a redox process. **Cancer & Metabolism**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 1–15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/2049-3002-2-4>

SU, Shian *et al.* Glimma: Interactive graphics for gene expression analysis. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 33, n. 13, p. 2050–2052, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx094>

SUN, Rongli *et al.* Benzene Exposure Alters Expression of Enzymes Involved in Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation in Male C3H/He Mice. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 13, n. 1068, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph13111068>. Acesso em: 23 mar. 2022.

SWERDLOW, Steven H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. **Blood**, [s. l.], v. 127, n. 20, p. 2375–2390, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>

TABASSUM, Doris P.; POLYAK, Kornelia. Tumorigenesis: It takes a village. **Nature Reviews Cancer**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 473–483, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc3971>

TALLMAN, Martin S; GILLILAND, D Gary; ROWE, Jacob M. Drug therapy for acute myeloid leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 1154–1163, 2005a. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0178>. Reprints

TALLMAN, Martin S.; GILLILAND, D. Gary; ROWE, Jacob M. Drug therapy for acute myeloid leukemia. **Blood**, [s. l.], v. 106, n. 4, p. 1154–1163, 2005b. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2005-01-0178>

TAUSSIG, David C. *et al.* Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. **Blood**, [s. l.], v. 115, n. 10, p. 1976–1984, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2009-02-206565>.

Acesso em: 12 mar. 2022.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e577, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bcj.2017.53>

TESTI, Anna Maria *et al.* Risk-Group Stratified and Minimal Residual Disease (MRD)-Guided Treatment with Extended ATRA and Reduced-Anthracycline Chemotherapy in Childhood Acute Promyelocytic Leukemia (APL): Results from ICC APL Study 01 (NCT01226303; EudraCT 2008-002311-40). **Blood**, [s. l.], v. 126, n. 23, p. 563–563, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V126.23.563.563>. Acesso em: 7 mar. 2022.

THOL, Felicitas; GANSER, Arnold. Treatment of Relapsed Acute Myeloid Leukemia. **Current Treatment Options in Oncology**, [s. l.], v. 21, n. 8, p. 1–11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11864-020-00765-5>

TORRANO, Joachim *et al.* Emerging roles of H3K9me3, SETDB1 and SETDB2 in therapy-induced cellular reprogramming. **Clinical epigenetics**, [s. l.], v. 11, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/S13148-019-0644-Y>. Acesso em: 14 mar. 2022.

TRENTIN, Luca *et al.* Leukemia reconstitution in vivo is driven by cells in early cell cycle and low metabolic state. **Haematologica**, [s. l.], v. 103, n. 6, p. 1008–1017, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3324/haematol.2017.167502>

TURNER, N C *et al.* Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. **The Lancet Oncology**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 178–185, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70335-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70335-7). Acesso em: 22 mar. 2022.

VAKITI, Anusha; MEWAWALLA, Purna. Acute Myeloid Leukemia. **StatPearls**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507875/>. Acesso em: 5 mar. 2022.

VAN COILLIE, Samya; WIERNICKI, Bartosz; XU, Jie. Molecular and Cellular Functions of CTLA-4. **Advances in experimental medicine and biology**, [s. l.], v. 1248, p. 7–32, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-981-15-3266-5_2). Acesso em: 23 mar. 2022.

VAN DONGEN, J J M *et al.* EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow

cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 1908–1975, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>

VAN GOSLIGA, Djoke *et al.* Establishing long-term cultures with self-renewing acute myeloid leukemia stem/progenitor cells. **Experimental hematology**, [s. l.], v. 35, n. 10, p. 1538–1549, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.EXPHEM.2007.07.001>. Acesso em: 14 mar. 2022.

VANDER HEIDEN, Matthew G; CANTLEY, Lewis C; THOMPSON, Craig B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, [s. l.], v. 324, p. 1029–1033, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

VARDIMAN, James W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. **Blood**, [s. l.], v. 114, n. 5, p. 937–951, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>

VITKEVIČIENĖ, Aida *et al.* Oxidative phosphorylation inhibition induces anticancerous changes in therapy-resistant–acute myeloid leukemia patient cells. **Molecular Carcinogenesis**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 2008–2016, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/MC.23092>. Acesso em: 23 mar. 2022.

WANG, Jean C.Y.; DICK, John E. Cancer stem cells: Lessons from leukemia. **Trends in Cell Biology**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. 494–501, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.004>

WANG, Nan *et al.* TWIST-1 promotes cell growth, drug resistance and progenitor clonogenic capacities in myeloid leukemia and is a novel poor prognostic factor in acute myeloid leukemia. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 25, p. 20977–20992, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.4007>. Acesso em: 14 mar. 2022.

WANG, X. B. *et al.* Expression of CTLA-4 by human monocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 53–60, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/J.0300-9475.2001.01019.X>

WARBURG, Otto. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, [s. l.], v. 123, n. 3191, p. 309 LP – 314, 1956. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>

WICKHAM, Hadley. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. [S. l.]: Springer-Verlag New York, 2016.

WITKOWSKI, Matthew T. *et al.* Extensive Remodeling of the Immune Microenvironment in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **Cancer cell**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 867-882.e12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2020.04.015>. Acesso em: 23 mar. 2022.

WYLIE, Blair J *et al.* Long Term Maintenance of Myeloid Leukemic Stem Cells Cultured with Unrelated Human Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Research**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 355–368, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10641955.2015.1046604>.

XIA, Bing *et al.* C-Myc plays part in drug resistance mediated by bone marrow stromal cells in acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 92–99, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.11.004>

YAJUK, Olga *et al.* The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer. **Cells**, [s. l.], v. 10, n. 1510, p. 1-13, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cells10061510>. Acesso em: 23 mar. 2022.

YAMADA, K. *et al.* Differentiation of human acute myeloid leukaemia cells in primary culture in response to cotylenin A, a plant growth regulator. **British Journal of Haematology**, [s. l.], v. 114, n. 4, p. 814–821, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.03029.x>

YANG, Hui *et al.* Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. **Leukemia**, [s. l.], v. 28, n. 6, p. 1280–1288, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/leu.2013.355>.

YASSIN, Muhammad *et al.* A novel method for detecting the cellular stemness state in normal and leukemic human hematopoietic cells can predict disease outcome and drug sensitivity. **Leukemia**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 2061–2077, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/S41375-019-0386-Z>. Acesso em: 14 mar. 2022.

YATSUNENKO, Tanya *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, [s. l.], v. 486, n. 7402, p. 222–227, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature11053>



YE, Jian *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 134, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134/FIGURES/5>. Acesso em: 24 mar. 2022.

YU, Shilong *et al.* ZNF300 promotes chemoresistance and aggressive behaviour in non-small-cell lung cancer. **Cell proliferation**, [s. l.], v. 53, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/CPR.12924>. Acesso em: 14 mar. 2022.

ZACHAR, Zuzana *et al.* Non-redox-active lipoate derivatives disrupt cancer cell mitochondrial metabolism and are potent anticancer agents in vivo. **Journal of Molecular Medicine**, [s. l.], v. 89, n. 11, p. 1137–1148, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0785-8>

ZEIJLEMAKER, Wendelien *et al.* CD34+CD38– leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. **Leukemia**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 1102–1112, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0326-3>

ZHANG, Jin Ying *et al.* Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells. **Cancer Biology and Medicine**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 10–22, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.7497/j.issn.2095-3941.2014.0019>

ZHANG, Ping *et al.* Low expression of TET2 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with poor clinical outcome. **International journal of laboratory hematology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 702–709, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/IJLH.13099>. Acesso em: 22 mar. 2022.

ANEXO A: Carta de Aprovação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica do Projeto

**PPG**  
**Ciências**  
**Biológicas**  
**Bioquímica**

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

**PARECER COSUBSTANCIADO**

O projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUNOBIOQUÍMICO DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**”, da aluna **Camila Kehl Dias**, sob a orientação do Prof. Dr. **Fabrizio 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** Identificar a proporção e mecanismos imunobioquímicos de células *slow-cycling* em amostras de medula óssea de pacientes com LMA e LLA no momento do diagnóstico e após o tratamento.

- 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 e no HCPA onde parte dos experimentos e a coleta das amostras será realizada.

-Um cronograma de execução que prevê o período de 24 meses para a realização do projeto.

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

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

Parecer aprovado em 05/05/2020

*Camila Kehl Dias*  
PROFA. DRA. **FÁTIMA T. C. R. GUMA**  
CPF 397538320-87



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

ANEXO B: Carta de Aprovação do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre do Projeto



**HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**

**Grupo de Pesquisa e Pós Graduação**

**Carta de Aprovação**

**Projeto**

2020/0512

**Pesquisadores:**

**ALESSANDRA APARECIDA PAZ**

FABRÍCIO FIGUEIRÓ

VITÓRIA BRUM DA SILVA NUNES

LIANE ESTEVES DAUDT

ANA MARIA OLIVEIRA BATTASTINI

ANA PAULA ALEGRETTI

MARIELA GRANERO FARIAS

FÁBIO KLAMT

CAMILA KEHL DIAS

**Número de Participantes: 26**

**Título: AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

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.

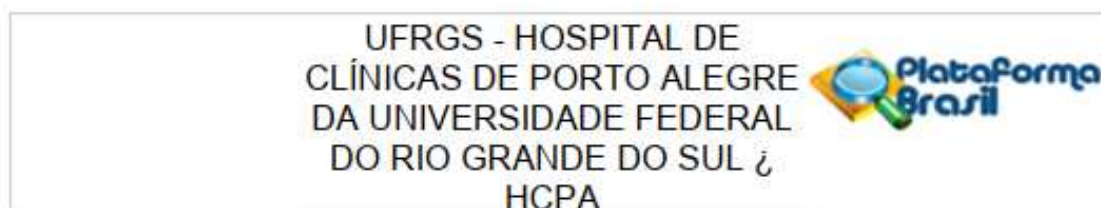
- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

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

13/10/2020



## ANEXO C: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com seres humano



Continuação do Parecer: 4.194.472

Ausência	tcle_responsaveis_CKD_28_07.pdf	28/07/2020 20:12:01	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_adultos_CKD_28_07.pdf	28/07/2020 20:11:52	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_CKD_PlataformaBrasil_28_07.docx	28/07/2020 20:11:31	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoPlataformaBrasilCKDpt2.pdf	22/06/2020 18:59:19	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoPlataformaBrasilCKDpt1.pdf	22/06/2020 18:56:24	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
Outros	parecerprojetoCKD.pdf	22/06/2020 18:48:14	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinadaff.pdf	22/06/2020 18:11:59	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_responsaveis_CKD.pdf	22/06/2020 18:11:46	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_adultos_CKD.pdf	22/06/2020 18:11:34	FABRICIO FIGUEIRO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 05 de Agosto de 2020

Assinado por:  
Têmis Maria Félix  
(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

## ANEXO D: TCLE Adultos

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do projeto GPPG ou CAAE \_\_\_\_\_

**Título do Projeto: AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender o comportamento e características das células malignas presentes na medula óssea de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você aceitar o convite, sua participação na pesquisa envolverá a coleta de um segundo tubo de amostra de aspirado de medula que será coletada no mesmo momento que você realizar o diagnóstico e em outro momento de coleta para avaliação da Doença Residual Mínima. Portanto a coleta do segundo tubo de aspirado de medula só será realizada se você já necessitar a coleta de um primeiro tubo para diagnóstico ou avaliação da efetividade do seu tratamento, caso seja diagnosticado tendo Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda. Além disso, gostaríamos da sua autorização para acessar o seu prontuário para consultar sexo, idade, diagnóstico, resultados de exames de imunofenotipagem 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 a ser realizada para diagnóstico ou avaliação da Doença Residual Mínima. A punção pode gerar desconforto, porém não será realizada uma punção além da programada para diagnóstico ou detecção da Doença Residual Mínima. Portanto quando você tiver agendada uma punção de medula será aspirado um tubo 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 responsáveis pela Leucemia Linfocítica Aguda e pela Leucemia Mieloide Aguda. Desta forma é possível encontrar novos alvos para auxiliar na melhora do tratamento das leucemias descritas acima. Além disso, você estará contribuindo no entendimento das diferenças que o tratamento pode ocasionar nas eventuais células malignas que restam na medula. Todas estas informações poderão auxiliar pacientes que apresentarem a Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda no futuro.

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

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

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

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

Página 1 de 2

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 Camila Kehl Dias 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 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, 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: \_\_\_\_\_

## ANEXO E: TCLE Responsáveis

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do projeto GPPG ou CAAE \_\_\_\_\_

**Título do Projeto: AVALIAÇÃO IMUNOBIOQUÍMICA DE CÉLULAS COM DIFERENTES PERFIS DE CICLAGEM EM LEUCEMIAS AGUDAS**

A pessoa pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender o comportamento e características das células malignas presentes na medula óssea de pacientes com Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Setor de Hematologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você autorizar, a participação na pesquisa envolverá a coleta de um segundo tubo de amostra de aspirado de medula que será coletada no mesmo momento que você realizar o diagnóstico e em outro momento de coleta para avaliação da Doença Residual Mínima. Portanto a coleta do segundo tubo de aspirado de medula só será realizada se você já necessitar a coleta de um primeiro tubo para diagnóstico ou avaliação da efetividade do seu tratamento, caso seja diagnosticado tendo Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda. Além disso, gostaríamos da sua autorização para acessar o seu prontuário para consultar sexo, idade, diagnóstico, resultados de exames de imunofenotipagem 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 a ser realizada para diagnóstico ou avaliação da Doença Residual Mínima. A punção pode gerar desconforto, porém não será realizada uma punção além da programada para diagnóstico ou detecção da Doença Residual Mínima. Portanto quando você tiver agendada uma punção de medula será aspirado um tubo 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 responsáveis pela Leucemia Linfocítica Aguda e pela Leucemia Mieloide Aguda. Desta forma é possível encontrar novos alvos para auxiliar na melhora do tratamento das leucemias descritas acima. Além disso, você estará contribuindo no entendimento das diferenças que o tratamento pode ocasionar nas eventuais células malignas que restam na medula. Todas estas informações poderão auxiliar pacientes que apresentarem a Leucemia Linfocítica Aguda ou Leucemia Mieloide Aguda no futuro.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar, ou ainda, desistir da participação e retirar sua autorização, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que a pessoa recebe ou possa 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.

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

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

Página 1 de 2

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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 vice 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 Camila Kehl Dias 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 do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, pelo e-mail cep@hcpa.edu.br, ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, 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 do responsável

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

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