



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**



Flávia Castro Souto

**ATIVIDADE DA ENZIMA E-NTPDase E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM
PACIENTES JOVENS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

**Campo Grande - MS
2022**

Flávia Castro Souto

**ATIVIDADE DA ENZIMA E-NTPDase E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM
PACIENTES JOVENS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em marcadores moleculares estudos epidemiológicos e pré-clínicos, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques

**Campo Grande – MS
2022**

Flávia Castro Souto

**ATIVIDADE DA ENZIMA E-NTPDase E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM
PACIENTES JOVENS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, linha de pesquisa em marcadores moleculares estudos epidemiológicos e pré-clínicos, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 10 de fevereiro de 2022:

Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques - Presidente/Orientador

Prof. Dra. Giovana Cristina Giannesi - Membro titular (UFMS)

Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo- Membro titular (UFMS)

Prof. Dra. Carla Santos de Oliveira - Membro suplente (UFMS)

Campo Grande – MS
2022

AGRADECIMENTOS

Nesses anos de mestrado, de muito estudo e esforço, gostaria de agradecer algumas pessoas que me acompanharam e foram fundamentais para que essa conquista fosse realizada. Primeiramente, agradeço aos meus pais, Antônio Souto e Isamara Souto, por toda educação, por todo esforço para que eu chegasse até aqui, por todo amor e cuidado, e por sempre estarem presentes, independente da distância entre nós. Meu amor por vocês é incondicional.

À minha irmã, Natalia Souto Pess, que acompanhou de perto todas as etapas, me apoiando, torcendo por mim e compreendendo minha ausência no momento que ela mais precisava da minha ajuda. Aos meus familiares e amigos, por todo companheirismo e por tornarem meus dias mais alegres. Em especial ao meu grande amigo João Assis Gobbo por toda ajuda.

Aos colegas Lucas Pessato e Adrivânio Baranoski por me ajudarem no início desta caminhada. Ao Igor Leal, companheiro de projeto, com quem compartilhei tantas preocupações, aflições e muito trabalho; obrigada pelo companheirismo e pela amizade construída ao longo desses anos, a caminhada com você foi mais leve. À Andreza Negreli que chegou nos ajudando e motivando no momento mais difícil. Ao exímio orientador, Prof. Dr. Jeandre Augusto dos Santos Jaques, pela confiança depositada a mim, pelos ensinamentos e incentivos, meu muito obrigada!

À Associação dos Amigos das Crianças com Câncer – AACCC/MS por me permitirem trabalhar por uma causa nobre, a de cuidar de crianças e adolescentes com câncer do Mato Grosso do Sul. À equipe médica e de enfermagem, do Centro de Tratamento Onco-Hematológico Infantil – CETOHI, por terem sido essenciais para que esse projeto fosse realizado. A todos os pacientes, os quais nos fazem manter acesa a chama do trabalho e da dedicação. Em especial, às crianças e adolescentes acompanhadas no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul – HRMS.

Por fim, o agradecimento mais importante: a Deus e a Nossa Senhora, por estarem sempre comigo, me abençoando, guiando e me mantendo com fé e saúde para enfrentar os obstáculos sem desistir.

RESUMO

ATIVIDADE DA ENZIMA E-NTPDase E PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS EM PACIENTES JOVENS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Leucemias são neoplasias hematológicas que resultam da expansão clonal de células-tronco. O hemograma faz parte da rotina de investigação de um paciente com suspeita de ter leucemia. As células leucêmicas proliferam-se de forma desordenada na medula óssea substituindo células hematopoiéticas normais, refletindo alterações no hemograma. Estudos mostram que os pacientes com leucemia apresentam alteração nas parâmetros hematológicos no diagnóstico e também alteração no sistema purinérgico. O sistema purinérgico participa de diversas funções celulares, como proliferação e morte celular. A E-NTPDase regula os níveis dos nucleotídeos ATP e ADP que atuam como agonistas para receptores que desempenham um importante papel no desenvolvimento e progressão tumoral. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros hematológicos básicos do sangue periférico, a atividade da enzima E-NTPDase em células mononucleares da medula óssea e os marcadores de membrana de jovens com leucemia linfoblástica aguda do tipo B. Foram incluídos um total de 22 pacientes e divididos em dois grupos: alto risco (AR) e risco intermediário e baixo risco (RI/BR) de recidiva da doença. Os 22 pacientes tiveram os parâmetros hematológicos, número de leucócitos, conteúdo de hemoglobina e número de plaquetas, analisados na fase de indução do tratamento. A atividade de E-NTPDase foi analisada em 11 pacientes em várias etapas do tratamento e os marcadores de membrana, presentes nas populações celulares no diagnóstico, foram analisados em 19 pacientes. Em relação aos valores de referência do hemograma, o número de leucócitos, no diagnóstico, dos pacientes classificados como AR mostrou-se significativamente alto e dos pacientes do grupo RI/BR também apresentaram elevação, porém mais próximo do limite do valor de referência ($10.000/\text{mm}^3$). Tal aumento é causado pela proliferação excessiva de células leucêmicas na medula óssea que se espalha para o sangue periférico apresentando esta alteração. Essa proliferação desordenada de leucócitos diminui a produção de eritrócitos e plaquetas. Os dois grupos de pacientes deste estudo apresentaram, no diagnóstico, conteúdo de hemoglobina (Hb) e número de plaqueta baixos. A atividade de E-NTPDase na hidrólise de ATP e ADP, nas células dos pacientes classificados como RI/BR de recidiva da doença, foram maiores em relação aos pacientes do grupo AR. Esses achados diferem dos encontrados na literatura. Entre os marcadores de membrana presentes, três pacientes apresentaram presença da mutação no gene CRLF2. Os resultados obtidos neste estudo somam à outros encontrados na literatura. Experimentos futuros são necessários para elucidar o perfil do sistema purinérgico em pacientes com leucemias.

Palavras-chave: Leucemia. Sistema purinérgico. Ectonucleotidases

ABSTRACT

E-NTPDase ENZYME ACTIVITY AND HEMATOLOGICAL PARAMETERS IN YOUNG PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLAST LEUKEMIA

Leukemias are hematological neoplasms that result from the clonal expansion of stem cells. The blood count is part of the routine investigation of a patient suspected of having leukemia. Leukemic cells proliferate disorderly in the bone marrow replacing normal hematopoietic cells, reflecting changes in the blood count. Studies show that patients with leukemia have changes in hematological parameters at diagnosis and also changes in the purinergic system. The purinergic system participates in several cellular functions, such as cell proliferation and cell death. E-NTPDase regulates the levels of ATP and ADP nucleotides that act as agonists for receptors that play an important role in tumor development and progression. In this context, the aim of this study was to evaluate the basic hematological parameters of peripheral blood, the activity of the E-NTPDase enzyme in bone marrow mononuclear cells and the membrane markers of young people with type B acute lymphoblastic leukemia. A total of 22 patients and divided into two groups: high risk (RA) and intermediate risk and low risk (RI/BR) of disease recurrence. The 22 patients had hematological parameters, number of leukocytes, hemoglobin content and number of platelets analyzed in the induction phase of treatment. E-NTPDase activity was analyzed in 11 patients at various stages of treatment and membrane markers, present in cell populations at diagnosis, were analyzed in 19 patients. Regarding the reference values of the blood count, the number of leukocytes, at diagnosis, of patients classified as RA was significantly high and patients in the RI/BR group also showed an increase, but closer to the limit of the reference value (10,000 /mm³). Such an increase is caused by the excessive proliferation of leukemic cells in the bone marrow that spreads to the peripheral blood presenting this alteration. This disordered proliferation of leukocytes decreases the production of erythrocytes and platelets. The two groups of patients in this study had, at diagnosis, low hemoglobin (Hb) and platelet numbers. The activity of E-NTPDase in the hydrolysis of ATP and ADP, in the cells of patients classified as RI/BR of disease recurrence, were higher compared to patients in the RA group. These findings differ from those found in the literature. Among the membrane markers present, three patients had a mutation in the CRLF2 gene. The results obtained in this study add to others found in the literature. Future experiments are needed to elucidate the profile of the purinergic system in patients with leukemias.

Keywords Leukemia. Purinergic System. Ectonucleotidases

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação gráfica da hematopoiese. CFU (*colony-forming unit*), GEMM (granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos), GM (granulócitos e monócitos) EO (eosinófilo), Meg (megacariócito), G (granulócitos), M (monócito), NK (*natural killer*).....11

Figura 2. Componentes da sinalização purinérgica. A ativação e estimulação do receptor formil-peptídio (FPRs) pelo receptor N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) leva a abertura de hemicanais panexina 1 e a liberação de ATP que promove a ativação autócrina de receptores P2. As ectonucleotidasas ENTPDs e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs).....16

Figura 3. Número de plaquetas (mm^3) em sangue periférico do grupo AR no D0, D15/19 e D26/33. A análise dos dados foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via seguido de Tukey. (*) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$). Valor de referência para plaquetas: $140.000\text{-}400.000\text{mm}^3$29

Figura 4. Número de plaquetas (mm^3) em sangue periférico do grupo RI/BR no D0, D15/19 e D26/33. A análise dos dados foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn's. (*) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) e (****) indica uma diferença significativa ($p < 0,0001$). Valor de referência para plaquetas: $140.000\text{-}400.000\text{mm}^3$30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores específicos que estabelecem a classificação EGIL (1995) dos subtipos celulares nas LLA-B. Abreviações: Cy, citoplasma; s, superfície.....12

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de leucócitos totais (mm^3) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 dos grupos AR e RI e BR. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. Valor de referência para leucócitos: 5.000-10.000/ mm^327

Tabela 3. Média e desvio padrão do conteúdo de hemoglobina (g/dL) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 nos grupos AR e RI e BR. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. Valor de referência para hemoglobina: 12,0-16,0 g/dL (sexo feminino) e 13,5-17,5 g/dL (sexo masculino).....28

Tabela 4. Média e desvio padrão do número de plaquetas (mm^3) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 nos grupos AR e RI e BR. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. Valor de referência para plaquetas: 140.000-400.000/ mm^329

Tabela 5. Média e desvio padrão da atividade da enzima E-NTPDase (ATP e ADP) em células mononucleares de medula óssea de pacientes com LLA-B, nos grupos AR (n=8) e RI e BR (n=3).....31

Tabela 6. Marcadores de membrana presentes nas populações celulares de medula óssea analisadas ao diagnóstico. Intensidade do marcador antigênico: -/+ (negativo a positivo fraco em parte da população), -/+ /++ (negativo a positivo heterogêneo em parte da população), + (positivo fraco), ++ (positivo moderado), +++ (positivo forte), ++++ (positivo muito forte), +/++ (positivo heterogêneo), +/++ /+++ (positivo heterogêneo), ++ /+++ (positivo heterogêneo).....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	Microlitro
ADO	Adenosina
ADP	Difosfato de Adenosina
AGM	Aorta-gônada-mesonefros
AMP	Monofosfato de Adenosina
AR	Alto Risco
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCR-ABL	Breakpoint cluster region-Abelson
BFM	Berlim-Frankfurt-Munster
BMMC	Bone Marrow Mononuclear Cells
BR	Baixo Risco
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CETOHI	Centro de Tratamento Onco-Hematológico Infantil
CFU	Colony-Forming Unit
CTL	Contagem Total de Leucócitos
D0	Dia sem tratamento
D15	Dia 15 de tratamento
D19	Dia 19 de tratamento
D26	Dia 26 de tratamento
D33	Dia 33 de tratamento
D8	Dia 8 de tratamento
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

E-5'-NT	Ecto-5'-nucleotidase
E-ADA	Ecto-adenosina desaminase
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGIL	Immunological Characterization of Leukemias
E-NTPDase	Ectonucleotidase trifosfato difosfohidrolase
FC	Fator de Correção
FCC	Fator de Correção do Coomassie
g/dL	Grama por decilitro
Hb	Hemoglobina
HRMS	Hospital Regional de Mato Grosso do Sul
HSCs	Hematopoietic Stem Cells
INBIO	Instituto de Biociências
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ O ₄	Fosfato de potássio monobásico
LAC	Laboratório de Análises Clínicas
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem B
LLA-T	Leucemia Linfoblástica Aguda de linhagem T
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
mg/mL	Miligrama por mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico

MO	Medula Óssea
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
nmol	Manomol
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Fosfato Inorgânico
RI	Risco Intermediário
RI/BR	Risco Intermediário e Baixo Risco
SP	Sangue Periférico
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCA	Ácido Tricloroacético
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
	2.1 Hematopoiese.....	10
	2.2 Leucemia linfoblástica aguda.....	11
	2.3 Sistema purinérgico	15
	2.3.1 Ectonucleotídeos, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares	16
	2.3.2 Receptores purinérgicos	17
	2.4 Parâmetros hematológicos, sinalização purinérgica e câncer	18
3	OBJETIVOS	22
	3.1 Objetivo geral.....	22
	3.2 Objetivos específicos	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
	4.1 Dados coletados de prontuários e banco de dados	23
	4.2 Coleta de medula óssea	24
	4.3 Ensaios e procedimentos experimentais	24
	4.3.1 Isolamento de células mononucleares da medula óssea	24
	4.3.2 Conteúdo de proteína.....	25
	4.3.3 Quantificação da atividade da enzima E-NTPDase	25
	4.4 Análise estatística.....	26
5	RESULTADOS	27
	5.1 Análises hematológicas	27
	5.2 Atividade da E-NTPDase	30
	5.3 Marcadores de membrana.....	31
6	DISCUSSÃO	33
7	CONCLUSÃO	37

REFERÊNCIAS	38
ANEXO A.....	42
ANEXO B.....	47

1 INTRODUÇÃO

Neoplasias malignas têm despertado nos pesquisadores o interesse em avançar na compreensão da fisiopatologia destas doenças, tendo como potencial aplicação desse conhecimento o desenvolvimento de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas. No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 é de 8.460 novos casos de câncer infantojuvenil, sendo a leucemia a neoplasia maligna que mais acomete crianças e adolescentes em todo o mundo (INCA, 2022).

O processo de formação das células sanguíneas é denominado hematopoiese. Todas as células sanguíneas são derivadas de células-tronco hematopoiéticas que se localizam na medula óssea. Essas células-tronco hematopoiéticas são capazes de se autorrenovarem e diferenciarem em progenitores de linhagem linfóide e mieloide, que também se proliferam e se diferenciam em células maduras totalmente funcionais na medula óssea (WEI et al., 2018).

As leucemias são neoplasias hematológicas que decorrem da expansão clonal maligna de um precursor hematopoiético, ou seja, de uma célula-tronco pluripotente, podendo ter origem em qualquer linhagem hematológica e em qualquer fase maturativa capaz de se dividir, afetando, assim, os mecanismos de controle de diferenciação e de proliferação celular (OLIVEIRA et al., 2016).

Com a perda dos mecanismos de controle da diferenciação e proliferação, as células hematopoiéticas normais são substituídas, na medula óssea, por células imaturas que se espalham para o sangue periférico. Tais alterações manifestam-se no hemograma com o aumento de leucócitos, diminuição da produção de eritrócitos e de plaquetas. Estes são os principais parâmetros hematológicos analisados no hemograma de pacientes com suspeita de ter leucemia (MUNIR et al., 2019).

Ao contrário da leucemia adulta, quase todas as leucemias pediátricas são agudas, o que significa que se instalam e agravam-se rapidamente. Elas são classificadas baseando-se no tipo de linhagem celular acometida: linfóide ou mieloide. São divididas em quatro subgrupos principais: leucemia linfoblástica aguda (LLA) e crônica (LLC), leucemia mieloide aguda (LMA) e crônica (LMC). A LLA e LMA juntas representam quase 95% das leucemias pediátricas, sendo a LLA mais comum que a LMA durante a infância, compreendendo 75% a 80% e 15% a 20% dos casos, respectivamente (HUNGER et al., 2020).

Sua etiologia ainda é desconhecida; alguns estudos mostram suspeitas da associação de determinados fatores com o risco de desenvolver alguns tipos específicos da doença como, por exemplo, fatores genéticos (principalmente a síndrome de Down) ter associação a um risco aumentado de desenvolver a LLA (HUNGER et al., 2015), mas é provável que os fatores ambientais, como exposição a produtos químicos, desempenhem um papel significativo no desenvolvimento das leucemias infantojuvenis (PEREIRA et al., 2017; WHITEHEAD et al., 2016).

Alguns estudos demonstram alterações em componentes do sistema purinérgico em neoplasias. Este sistema consiste na maneira de como uma célula se comunica com a outra, modulando vários processos fisiológicos, através de três componentes principais: enzimas, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e receptores purinérgicos (BURNSTOCK, 2006).

As ectonucleotidases são a classe de enzimas que participam da sinalização purinérgica regulando os níveis extracelulares de nucleotídeos e nucleosídeos de adenosina, que são moléculas sinalizadoras. Entre elas destaca-se a E-NTPDase que é específica para nucleotídeos e hidrolisam trifosfato de adenina (ATP) em difosfato de adenosina (ADP). Após a liberação de nucleotídeos e nucleosídeos no meio extracelular, é iniciada uma série de respostas celulares através da ativação de receptores específicos. (BURNSTOCK et al., 2013; ZIMMERMANN et al., 2012).

Estes receptores localizados na membrana celular, são responsáveis pela transdução dos sinais representados pelos nucleotídeos e nucleosídeos e são divididos em receptores do tipo P1 e P2. Os receptores P2 subdividem-se em duas classes: P2Y e P2X. Os receptores do tipo P2Y são ativados por ATP e outros nucleotídeos, enquanto P2X são ativados somente por ATP. Estudos mostram que os receptores do tipo P2X estão envolvidos na progressão tumoral, especialmente o subtipo P2X₇, que é expresso na maioria das células tumorais e desempenha um importante papel regulador de progressão dos tumores (HUANG, et al., 2021; ZHANG, 2021).

As estatísticas mostram que o tratamento do câncer representa um grande desafio médico. Assim como em países desenvolvidos, no Brasil o câncer já representa a primeira causa de morte (8% do total) entre crianças e adolescentes (INCA, 2022).

Embora o nosso organismo possua mecanismos para o controle e regulação da proliferação e morte celular, da adesão e migração de células, quando ocorre a

falha em algum destes mecanismos é que se pode dar início ao desenvolvimento de um câncer. Entre as alterações patológicas que dão potencial invasivo às células tumorais, a ruptura da resposta inflamatória e a sinalização purinérgica emergem como um componente importante da progressão do câncer (BERGAMIN et al., 2012).

Considerando-se as inúmeras variáveis envolvidas nessa doença, os estudos para melhorar o entendimento da fisiopatologia e da genética das células neoplásicas é estratégia essencial para o conhecimento do prognóstico, para o acompanhamento do tratamento, e para que novas abordagens farmacológicas sejam desenvolvidas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros hematológicos básicos do sangue periférico e a atividade da enzima E-NTPDase em células mononucleares de medula óssea de jovens com leucemia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hematopoiese

O processo pelo qual as células sanguíneas são formadas denomina-se hematopoiese. A hematopoiese inicia-se durante a vida embrionária e deve perdurar por toda a fase adulta ocorrendo diariamente. O local primário que ocorre a hematopoiese é no saco vitelino do embrião nos primeiros meses da gestação. As células do saco vitelino colonizam o cordão umbilical, a região aorta-gônada-mesonefros (AGM) e, posteriormente, o fígado embrionário. Com a ossificação e início da formação da medula óssea, esta passa a ser o local predominante da hematopoiese até a fase adulta (KIM, 2010).

A medula óssea é um tecido líquido-gelatinoso existente no interior das cavidades ósseas. Na medula óssea as células-tronco hematopoiéticas (HSCs, *hematopoietic stem cells*), precursoras da hematopoiese, localizam-se em microambientes chamados “nichos de células-tronco”. Os nichos fornecem um microambiente propício à manutenção destas e de células progenitoras, promovendo um equilíbrio entre a autorrenovação e diferenciação (WILSON et al. 2009, WILSON, et al. 2006).

Uma célula-tronco hematopoiética pluripotente dá origem a outras duas células, uma célula-filha idêntica com a mesma capacidade de autorrenovação e a outra chamada unidade formadora de colônia (CFU, *colony-forming unit*). Esta, se diferencia de modo aleatório e amadurece em UFC mieloide que dará origem a granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos e UFC linfoide que dará origem a linfócitos, como demonstrado na Figura 1 (OLIVEIRA et al., 2016).

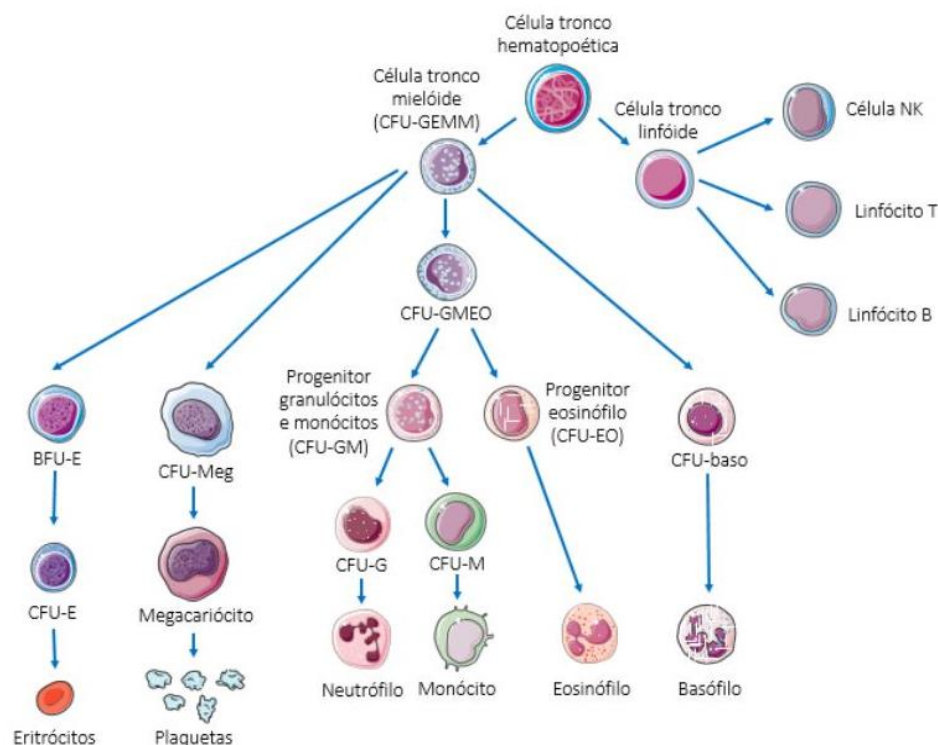


Figura 2. Representação gráfica da hematopoiese. CFU (*colony-forming unit*), GEMM (granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos), GM (granulócitos e monócitos) EO (eosinófilo), Meg (megacariócito), G (granulócitos), M (monócito), NK (*natural killer*). modificada de Oliveira (2016).

2.2 Leucemia linfoblástica aguda

A LLA é um distúrbio maligno que se origina de um único precursor hematopoiético comprometido com a linhagem de células B ou T com consequente acúmulo de células imaturas na medula óssea denominadas linfoblastos. Esses distúrbios ocorrem por anormalidades genéticas que atrapalham seu processo normal de maturação, a interrupção da diferenciação e proliferação da célula transformada. Como consequência, há acúmulo de um clone imaturo resultando na supressão da hematopoiese normal. Cerca de 80% a 85% da LLA são da linhagem de células B (LLA-B), e 15% a 20% da linhagem de células T (LLA-T). Essas alterações genéticas incluem aneuploidia (alterações no número de cromossomos), rearranjos cromossômicos que desregulam a expressão gênica ou resultam na expressão de proteínas de fusão quiméricas, deleções, inserções ou trocas de pares de bases no DNA (HUNGER et al., 2015).

A LLA-B e LLA-T são indistinguíveis morfológicamente. A sua diferenciação é feita através da imunofenotipagem por citometria de fluxo, que revela informações essenciais para o diagnóstico, como o estágio de maturação das populações celulares analisadas, a presença de células com fenótipo anormal, além de avaliar a presença de marcadores (antígenos de superfície celular ou citoplasmático) associados ao prognóstico ou até mesmo marcadores que são alvos terapêuticos (REGO et al., 2009).

A análise destes marcadores de superfície celular ou citoplasmáticos, na maioria dos casos, permite diferenciar as duas linhagens. Os marcadores CD19, CD22 e CD79a, por exemplo, se expressam especificamente na LLA-B. Já os marcadores CD3 citoplasmático e cCD3 são específicos para a LLA-T. A linhagem B pode ainda ser dividida em quatro subtipos de acordo com o estágio de diferenciação e de acordo com a classificação EGIL em: LLA pró-B (B-I), LLA-B comum (B-II), LLA pré-B (B-III) e LLA-B madura (B-IV) (HUNGER et al., 2020; FERREIRA, 2017), como visualizado na tabela 1.

Na infância, a LLA-B apresenta bom prognóstico, com taxa de remissão completa (estado de aparente normalidade após a quimioterapia) maior que 95%. Historicamente os pacientes com LLA-T apresentam um pior prognóstico em comparação com os pacientes com LLA-B. Estes resultados melhoraram gradualmente com o uso de terapia intensificada, porém os pacientes com LLA-T continuam a experimentar um risco menor de sobrevida após recidiva. Sendo assim, é fundamental identificar vias moleculares aberrantes e alvos para intervenção terapêutica para LLA-T. As lesões genéticas na LLA-T são diversas e complexas e uma variedade de alterações contribuem na patogênese de vários subtipos de LLA-T (COOPER et al., 2015; PUI et al., 2015).

Classificação EGIL	cyTdT	CD34	cyCD79a	CD19	CD10	cyIgM	sIgM	cyCD22
Pró-B (B-I)	+	+	+	+	-	-	-	+
B-comum (B-II)	+	-/+	+	+	+	-	-	+
Pré-B (B-III)	+	-/+	+	+	+	+	-	+
B-madura (B-IV)	+	-	+	+	-/+	-/+	+	+

Tabela 1. Marcadores específicos que estabelecem a classificação EGIL (1995) dos subtipos celulares nas LLA-B. Abreviações: Cy, citoplasma; s, superfície.

Vários grupos de pesquisa nacionais e internacionais foram estabelecidos a fim de conduzir pesquisas colaborativas para aprimorar as estratégias de tratamento vigentes e melhorar os seus resultados. As informações obtidas nestes estudos colaborativos ajudaram a decifrar a heterogeneidade da LLA para melhorar o tratamento personalizado, o que deve contribuir para aumentar a taxa de cura atual e a qualidade de vida de crianças e adolescentes com LLA (PUI et al., 2015).

Os protocolos terapêuticos consistem em um regime quimioterápico com múltiplos fármacos que varia conforme o subtipo da leucemia. Essa combinação de fármacos têm a função de inibir a proliferação, a diferenciação, a divisão e os processos de biossíntese de compostos, facilitando a morte celular. O protocolo de tratamento do grupo Europeu Berlim-Frankfurt-Münster (BFM) para o manejo da LLA na criança e adolescente, preconiza uma terapia de aproximadamente 27 meses, escalonada em fase de indução, consolidação, reindução, manutenção (SCHRAPPE et al., 2009). Na fase de indução os pacientes são distribuídos por grupos de risco de recaída da doença. Pacientes classificados como baixo risco (BR) são aqueles que apresentam os seguintes critérios:

- 1) <1.000 blastos/ μL no sangue periférico (SP) do 8º dia de tratamento (D8).
- 2) Idade ≥ 1 e <6 anos.
- 3) Contagem de leucócitos no SP $<20.000/\mu\text{L}$.
- 4) Exame de doença residual mínima (DRM) no aspirado de medula óssea (MO) $<0.1\%$ no 15º e 33º dia de tratamento (D15 e D33).

Pacientes classificados como alto risco (AR) apresentam algum dos seguintes critérios:

- 1) DRM $>10\%$ na medula óssea do D15.
- 2) Sangue periférico no D8 ≥ 1.000 blastos/ μL .
- 3) Translocação $t(9;22)$ [BCR/ABL], $t(4;11)$ [MLL/AF4] ou hipoploidia ≤ 44 .

Todos os pacientes que não forem estratificados como BR ou AR, são considerados de risco intermediário (RI) (SCHRAPPE et al., 2010).

Outro protocolo terapêutico utilizado para o tratamento da LLA infantojuvenil é o RE-LLA-2005 que preconiza um tratamento de 116 semanas para os pacientes classificados em BR e 120 semanas para pacientes classificados como AR e RI. As fases de tratamento para os pacientes BR e RI são divididas em indução, consolidação, manutenção primária, reindução I, manutenção A e manutenção B; para

os pacientes de AR é dividido em indução, consolidação, manutenção primária, reindução I, manutenção A, reindução II, manutenção A e manutenção B (PEDROSA et al., 2002).

Durante a fase de indução do protocolo RE-LLA-2005 os pacientes são primeiramente classificados em grupos de risco provisório e posteriormente em grupo definitivo de recaída da doença seguindo os critérios abaixo:

Grupo BR provisório:

1) Idade >1 e <10 e número de leucócitos $<50.000/\text{mm}^3$ ou número de leucócitos >50.000 com índice de DNA ≥ 1.16 <1.60 ou fusão TEL-AML1.

Não devem ter nenhum dos achados:

2) ≥ 5 leucócitos/ mm^3 no líquido cefalorraquidiano (LCR) com blastos identificados ou paralisia de nervos cranianos,

3) Infiltração testicular (evidenciada por ultrassonografia),

4) Achados genéticos adversos t(9;22) ou fusão BCR-ABL, t(1;19) com fusão E2A-PBX, rearranjo MLL ou hipoploidia (<45 cromossomos),

5) Resposta precoce pobre $\geq 5\%$ de linfoblastos na medula óssea (morfologia) ou mais de 0,01% por citometria de fluxo no 19º da indução.

6) Idade igual ou maior que 10 anos.

Grupos AR provisório:

1) Pacientes que não tenha nenhum dos critérios do BR.

A classificação dos grupos em risco definitivo é definido pelo resultado da DRM do dia 19, confirmada no dia 26.

Grupo BR definitivo:

1) Todos os pacientes classificados provisoriamente como BR e com DRM negativa no D19 e no D26.

Grupo RI definitivo:

1) Todos os pacientes classificados provisoriamente como BR e com DRM positiva entre 0,01% - 4,99%.

Grupo AR definitivo:

2) Todos os pacientes classificados provisoriamente como AR (independente do resultado da DRM) ou de BR com DRM positiva igual ou maior que 5%.

Esta classificação é informação necessária para ajustar a intensidade do tratamento conforme o risco individual (SCHRAPPE et al., 2010).

A identificação de leucemia residual após o início da terapia, denominada doença residual mínima ou mensurável (DRM), emergiu como um dos fatores prognósticos mais importantes para pacientes com leucemia aguda (WOOD, 2020). A citometria de fluxo, técnica pela qual são realizados os estudos de DRM, consiste em analisar parâmetros hematológicos e funcionais simultaneamente em uma única célula (MCKINNON, 2018; WOOD, 2020).

Ideias sobre a biologia heterogênea da LLA e o monitoramento da DRM ajudaram a refinar a terapia com base no risco de recidiva para maximizar a cura e minimizar a toxicidade medicamentosa (BHOJWANI et al., 2015).

2.3 Sistema purinérgico

A sinalização purinérgica é uma via de comunicação celular, ou seja, como uma célula comunica-se com outras células a partir de sinais por elas emitidos, mediada por nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares. Esses sinais determinam quando e como uma célula deve agir, tornando possível a integração das células de um organismo multicelular (SAVIO et al., 2021).

A sinalização purinérgica é uma importante via moduladora de vários processos fisiológicos, envolvida em muitos mecanismos neuronais e não neuronais e em eventos de curta e longa duração, incluindo secreção exócrina e endócrina, respostas imunes, inflamação, dor, agregação plaquetária, vasodilatação mediada pelo endotélio, proliferação e morte celular (BURNSTOCK, 2006).

Este sistema é constituído por três componentes principais: enzimas, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares e receptores purinérgicos (Figura 2) (JUNGER, 2011).

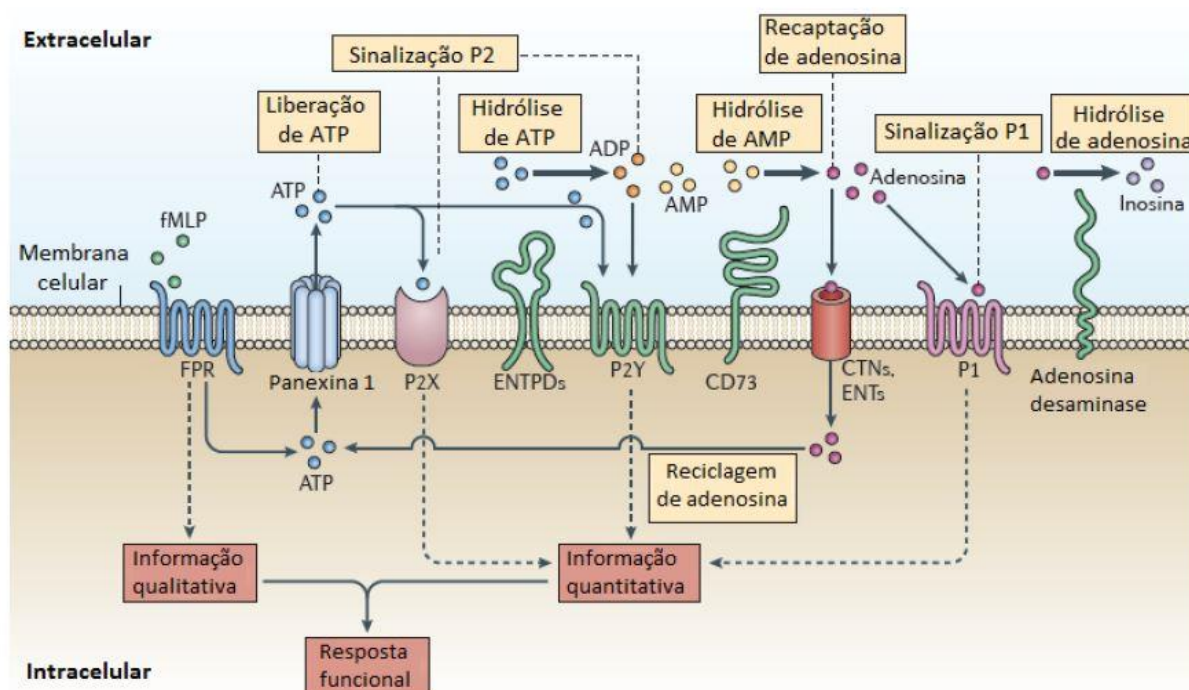


Figura 2. Componentes da sinalização purinérgica. A ativação e estimulação do receptor formil-peptídeo (FPRs) pelo receptor N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) leva a abertura de hemicanais panexina 1 e a liberação de ATP que promove a ativação autócrina de receptores P2. As ectonucleotidases ENTPDs e CD73 promovem a hidrólise de ATP e a formação de adenosina que ativa os receptores P1. A adenosina pode ser convertida à inosina pela enzima adenosina desaminase ou pode ser recaptada através de transportadores de nucleosídeos (ENTs). Adaptada de Junger (2011).

2.3.1 Ectonucleotidases, nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares

As ectonucleotidases são uma classe de enzimas que participam da sinalização purinérgica. Estas enzimas atuam na regulação dos níveis extracelulares dos nucleotídeos e nucleosídeos de adenina, que são moléculas sinalizadoras; portanto, ao controlar os níveis de moléculas sinalizadoras, regulam a atividade dos receptores purinérgicos. Dentre as ectonucleotidases destacam-se três principais grupos: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase (E-NTPDase; CD39), ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT; CD73), e ecto-adenosina desaminase (E-ADA) (Figura 2) (ZIMMERMANN et al., 2012).

Estas enzimas encontram-se ancoradas à membrana celular, possuindo seu sítio ativo voltado para o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2011). As E-NTPDases são específicas para nucleotídeos e hidrolisam trifosfato de adenosina (ATP) em

difosfato de adenosina (ADP), até formação do nucleotídeo monofosfato de adenosina (AMP) (ZIMMERMANN et al., 2012; ZIMMERMANN, 2001). Já a enzima E-5'-NT hidrolisa preferencialmente monofosfato de adenosina (AMP) em adenosina (ADO) (FERRARI et al., 2016).

As E-NTPDases e E-5'-NT, também conhecidas pelos antígenos de superfície CD39 e CD73, respectivamente; determinam respostas celulares específicas aos receptores purinérgicos pois são encontradas em diversos tipos celulares como plaquetas, células endoteliais, neurônios, células musculares lisas dos vasos e células da glia (ZIMMERMANN, 1996).

Além destas, a enzima E-ADA também participa da regulação dos níveis extracelulares de adenosina através da hidrólise da ADO em inosina (ZIMMERMANN, 2001; ZIMMERMANN, 1996). Quanto a sua distribuição, apesar da E-ADA estar presente em todos os tipos celulares, sua atividade é mais alta no timo, tecidos linfoides e linfócitos periféricos (FRANCO et al., 1997; CODERO et al., 2001).

Os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina atuam como moléculas sinalizadoras envolvidas em uma ampla gama de efeitos biológicos. Após a liberação no meio extracelular, os nucleotídeos e nucleosídeos de adenina iniciam uma série de respostas celulares através da ativação de receptores específicos localizados na membrana celular e posteriormente são metabolizados através da ação das ectonucleotidases que fazem a conversão de ATP até ADO (ZIMMERMANN, 2001).

O nucleotídeo ATP é agonista de receptores purinérgicos ionotrópicos P2X e P2Y; os nucleotídeos ADP e os nucleosídeos ADO são agonistas de receptores metabotrópicos P2Y e P1, respectivamente (BURNSTOCK et al., 2013).

2.3.2 Receptores purinérgicos

Os receptores purinérgicos, responsáveis pela transdução dos sinais representados pelos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares encontram-se localizados na membrana celular e são divididos em receptores do tipo P1 e P2. Os receptores P2 subdividem-se em duas classes: P2Y e P2X (BURNSTOCK et al., 2013).

Os receptores P1 pertencem ao grupo dos receptores metabotrópicos acoplados à proteína G e são ativados pelo nucleosídeo adenosina. Subdividem-se em quatro

tipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃ e são amplamente expressos em células do sistema nervoso (neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e micróglia) e em células de órgãos como: coração, pulmão, bexiga, testículos, baço, fígado e intestino (BURNSTOCK, 2012).

Assim como os receptores P₁, os receptores P_{2Y} são acoplados a proteína G e possuem oito subtipos: P_{2Y}_{1,2,4,6,11,12,13 e 14} (BURNSTOCK et al., 2013).

Receptores P_{2X} são ligados à canais iônicos (ionotrópicos) permeáveis à Na⁺, K⁺ e Ca²⁺, ativados por ATP e possuem sete subtipos (P_{2X}₁₋₇). Estes receptores são expressos em vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune, como macrófagos, monócitos e linfócitos (WHITE et al., 2006; DI VIRGILIO, 2012).

Comparado com os demais receptores, o subtipo P_{2X}₇ possui algumas características excepcionais, como a necessidade de alta concentração (> 100 µM) de ATP extracelular para ser ativado e a capacidade de formar um poro na membrana celular quando ativado por ATP em altas concentrações ou por exposição prolongada a esse agonista. Esse poro membranar permite o transporte bidirecional de cátions de acordo com o gradiente eletroquímico, bem como a passagem de moléculas com peso molecular variado a depender do tipo de célula (CARROLL et al., 2009; KHAKH et al., 2012).

Mecanismos imunossupressores operam na maioria dos tumores, o que torna a imunidade antitumoral ineficaz. A adenosina é um imunossupressor potente que é gerada no microambiente tumoral pela hidrólise de ATP extracelular. O ATP em altas concentrações ativam receptores P_{2X}₇ o que os tornam alvo para o direcionamento de tratamento anticâncer (DI VIRGILIO, 2018).

O receptor P_{2X}₇ é expresso em várias células do sistema imunológico como linfócitos, neutrófilos, macrófagos, mastócitos e células dendríticas, portanto é considerado um importante regulador da inflamação e da imunidade (JACOB et al., 2013).

2.4 Parâmetros hematológicos, sinalização purinérgica e câncer

No sangue periférico é feita uma análise dos parâmetros hematológicos através do hemograma completo. Este é o primeiro exame feito em pacientes com suspeita de ter leucemia. O hemograma reflete alterações na medula óssea causadas pelas células leucêmicas. Os achados, por vezes, são tão característicos que permitem

restringir com confiança seu diferencial diagnóstico para um tipo específico de leucemia. O diagnóstico precoce leva ao tratamento no início do desenvolvimento do câncer, o que, por sua vez, diminui a morbidade e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2016; MUNIR et al., 2019).

Apesar de a classificação morfológica das leucemias agudas terem um diagnóstico baseado eminentemente nos valores de blastos e do componente maturativo das várias linhagens celulares na medula óssea, a avaliação do sangue periférico é indispensável. Além disso, não é aconselhável avaliar os dados do mielograma sem a avaliação prévia do sangue periférico, posto que sua conclusão requer dados do hemograma (OLIVEIRA et al., 2016).

Na leucemia aguda as células proliferam-se de forma descontrolada na medula óssea substituindo células hematopoiéticas normais. A proliferação excessiva de células leucêmicas se espalham para o sangue periférico, isto é, manifesta-se como aumento da contagem total de leucócitos (CTL) no hemograma. A infiltração de células imaturas na medula óssea causa diminuição da eritropoiese, que se manifesta no hemograma como anemia (conteúdo de hemoglobina reduzido). A anemia é um achado importante em quase todas as leucemias, sejam agudas ou crônicas, e tem importância prognóstica. A trombocitopenia (redução da contagem de plaquetas) devido à substituição de células leucêmicas na medula óssea é um achado comum em quase todas as leucemias (MUNIR et al., 2019).

O interesse pelo conhecimento acerca do potencial terapêutico da sinalização purinérgica para o tratamento do câncer aumenta a cada dia. Alguns estudos demonstram alterações em componentes do sistema purinérgico em diversas neoplasias. Em comparação com as células saudáveis, as células tumorais apresentam uma quantidade de ATP mais alta (AHMANN et al., 1987).

Os sinais gerados por ATP extracelular e adenosina são transduzidos por receptores P2 e P1, respectivamente. Portanto, a sinalização purinérgica afeta todos os aspectos da imunidade e inflamação, pois praticamente todas as células imunes expressam os receptores P2 e P1. Segundo estudos, é altamente provável que o sistema purinérgico tenha um papel importante na progressão tumoral, contribuindo para o crescimento celular e suprimindo a resposta imune antitumoral, dada a concentração elevada de ATP e adenosina no microambiente tumoral (DI VIRGILIO, 2018). A atividade antineoplásica dos nucleotídeos ATP e ADP foi demonstrada pela primeira vez em 1983, onde estas moléculas produziram a interrupção do crescimento

das células tumorais na fase S do seu ciclo seguido pela morte da mesma (REPAPORT, 1983).

Outros estudos revelam a ação antineoplásica de nucleotídeos extracelulares em diversos tipos de câncer, como o câncer colorretal, leucemia, câncer de esôfago, câncer de pele e células escamosas, em células tumorais de Ehrlich, câncer de pulmão, cervical, células hepáticas, câncer de próstata, câncer de bexiga, retinoblastoma, neuroblastoma, glioma e melanoma. As células leucêmicas, assim como as células de outros tipos de neoplasias, liberam uma quantidade alta de ATP em comparação com a maioria das células saudáveis, portanto, as estratégias de destroem o ATP aumentam a atividade anticâncer (BURNSTOCK et al., 2013).

A adenosina, gerada no microambiente tumoral pela hidrólise de ATP, é considerada o agente imunossupressor mais potente. Os receptores P2X₇, ativados pelas altas concentrações de ATP, são potentes alvos para um tratamento anticâncer, levando empresas farmacêuticas a desenvolverem inibidores seletivos de pequenas moléculas de P2X₇ (DI VIRGILIO, 2018).

O receptor P2X₇ também pode ser usado no monitoramento da terapia para leucemia pediátrica, uma vez que evidenciaram sua superexpressão em leucemias agudas pediátricas, sendo os níveis mais altos de P2X₇ detectados em pacientes com recaída da doença e diminuição na fase de remissão completa (CHONG et al., 2010; BURNSTOCK et al., 2013).

Um estudo desenvolvido por Zimmermann e colaboradores (2017) a fim de avaliar a atividade e a expressão de enzimas do sistema purinérgico, associado à avaliação dos níveis de citocinas, em linfócitos periféricos e soro, de crianças com LLA do tipo B, revelou que as mudanças observadas nas atividades das ectonucleotidases E-NTPDase e E-ADA, ao diagnóstico, demonstram uma forte contribuição da sinalização purinérgica na modulação de células imunes, de modo a equilibrar os perfis imunossupressores e inflamatório resultantes da LLA. Tal associação se dá pelo fato de no início haver um microambiente inflamatório que pode ter facilitado a proliferação de células neoplásicas e que com a terapia inicial foram revertidos, em parte, tendo como consequência a redução na contagem de leucócitos e linfoblastos.

Zanin et al. (2006) verificaram a atividade da enzima E-NTPDase em linfócitos periféricos de pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) e observaram que a hidrólise de ATP e ADP é alterada nos linfócitos destes pacientes. Os resultados mostraram um forte aumento na atividade da enzima E-NTPDase, principalmente em

pacientes com um quadro avançado de LLC. Assim, os autores sugerem que o aumento na atividade da enzima pode levar a uma diminuição nos níveis de ATP que é o suficiente para evitar a morte celular pela ativação dos receptores P2X₇ e portanto, contribuem para a resistência das células leucêmicas frente as ações líticas do ATP.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os parâmetros hematológicos básicos do sangue periférico, a atividade da enzima E-NTPDase em células mononucleares da medula óssea e os marcadores de membrana de jovens com leucemia linfoblástica aguda do tipo B.

3.2 Objetivos específicos

- Coletar, de prontuários e banco de dados, as seguintes informações: sexo, raça, data de nascimento, data do diagnóstico, data do início do tratamento, protocolo de tratamento e grupo de risco.
- Coletar, de prontuários e banco de dados, os parâmetros hematológicos: número de leucócitos, conteúdo de hemoglobina e número de plaquetas no sangue periférico do diagnóstico (D0) e indução do tratamento (D15/19 e D26/33).
- Quantificar a atividade da enzima E-NTPDase em células mononucleares isoladas da medula óssea dos jovens no diagnóstico e acompanhamento do tratamento.
- Coletar, de prontuários e banco de dados, os marcadores de membrana presentes nas populações celulares analisadas através da imunofenotipagem no diagnóstico.
- Comparar em todas as análises os grupos classificados em alto risco, risco intermediário e baixo risco de recaída conforme preconiza cada protocolo terapêutico utilizado no paciente.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os participantes deste estudo foram jovens (0 a 19 anos), acompanhados no Centro de Tratamento Onco-Hematológico Infantil (CETOHI) do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul (HRMS) e diagnosticados com LLA-B. Foram incluídos um total de 22 participantes. Conforme classificação de risco dos protocolos terapêuticos, os pacientes foram divididos em alto risco (AR), risco intermediário (RI) e baixo risco (BR) de recidiva da doença. Os 22 pacientes tiveram os parâmetros hematológicos (número de leucócitos, conteúdo de hemoglobina e número de plaquetas) analisados, sendo 7 classificados como AR e 15 como RI/BR. Do total de pacientes, em 11 foi analisada a atividade da enzima E-NTPDase em células mononucleares da medula óssea, sendo 8 para AR e 3 para RI/BR. Quanto aos marcadores de membrana presentes na população celular do diagnóstico, foram analisados em 19 participantes, sendo 9 para AR e 10 para RI/BR.

Os seguintes critérios foram utilizados para a exclusão de participantes do estudo: pacientes diagnosticados com LLA-T, LMA, com idade superior a 19 anos ao diagnóstico, que fizeram uso prévio de corticoides, com síndrome de Down, doença infectocontagiosa e/ou doenças autoimunes.

Todos os responsáveis legais e os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido – TALE, respectivamente, aceitando a participação no estudo.

Essa pesquisa foi submetida ao sistema CEP-CONEP por meio da Plataforma Brasil, base nacional e unificada de registro das pesquisas envolvendo seres humanos, sendo aprovada dia 17 de dezembro de 2019 (número do parecer: 3.777.015 e CAAE: 26551219.0.0000.0021) (Anexo A).

4.1 Dados coletados de prontuários e banco de dados

Através de um instrumento de coleta de dados, foram coletados dos prontuários e banco de dados “Software MV PEP 2.0” disponíveis no CETOHI, informações epidemiológicas, parâmetros hematológicos como número leucócitos (mm^3), conteúdo de hemoglobina (g/dL) e número de plaquetas (mm^3). O hemograma foi realizado pelo Laboratório de Análises Clínicas – LAC do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul – HRMS em aparelho automatizado (Sysmex, XN 3000) e possui como valor de

referência para leucócitos 5.000-10.000/mm³, hemoglobina 12,0-16,0 g/dL (sexo feminino) e 13,5-17,5 g/dL (sexo masculino) e plaquetas 140.000-400.000/mm³. Os resultados hematológicos utilizados foram da fase de indução do tratamento, conforme cada protocolo preconiza, D0 para todos os pacientes, D15 e D26 para pacientes tratados com o protocolo RE-LLA-2005 e D19 e D33 para os pacientes tratados com o protocolo BFM-2009. Os marcadores de membrana presentes na população celular analisados pela imunofenotipagem do diagnóstico (D0) foram os: CD10, CD20, CD34, CD19, CD38, CD66c, CD123, CD13, CD33, CD13, CD71, CD9, CRLF2, CD127, CD45, CD58, CD22, CD81, nuTdT, HLADR e CD25. O exame de imunofenotipagem foi realizado por laboratórios terceirizados.

4.2 Coleta de medula óssea

As coletas de medula óssea foram realizadas por médicos no CETOHI. Aproximadamente 8 ml foram coletados para este estudo. O volume de amostra obtido foi armazenado sob refrigeração (4-8°C) até que as células mononucleares fossem separadas.

4.3 Ensaios e procedimentos experimentais

Todos os testes e procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Bioquímica Geral e Microrganismos (INBIO) da UFMS.

4.3.1 Isolamento de células mononucleares da medula óssea

O isolamento das células mononucleares da medula óssea (BMMC) foi realizado em uma amostra de medula óssea coletada com EDTA e separada por gradientes de densidade Ficoll-Hypaque conforme descrito abaixo.

Três tubos Falcon foram separados e identificados (F1, F2 e F3). A medula óssea foi transferida para F1 com solução fisiológica 0,9% na proporção 1:1. Essa suspensão celular foi adicionada em F2 contendo 3 ml de Ficoll-Hypaque e imediatamente centrifugada a 400 x g por 30 minutos à temperatura ambiente. Com a centrifugação houve a formação de um gradiente com uma camada intermediária composta pelas células mononucleares (linfócitos e monócitos) entre as camadas de

plasma e Histopaque®-1077. Esse gradiente foi aspirado e transferido para F3. Em F3 foi adicionado 10 ml de solução fisiológica 0.9%, afim de lavar as células, e então centrifugado a 250 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi aspirado e descartado e o sedimento celular resultante da centrifugação ressuspensionado com 5ml de solução para uma segunda centrifugação (250 x g por 10 minutos). Após a segunda centrifugação novamente o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado com 0,4 mL de solução fisiológica 0,9%. Quando havia presença de eritrócitos era acrescentado, após a primeira centrifugação, tampão hemolítico EDTA-cloreto de amônio e centrifugado a 250 x g por 10 minutos, para remover os eritrócitos.

4.3.2 Conteúdo de proteína

Para a determinação da atividade da enzima E-NTPDase foi necessário corrigir o conteúdo de proteína das amostras e manter na faixa de 0,1 a 0,2 mg/mL.

A quantificação de proteínas foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976) usando albumina de soro bovino como padrão.

4.3.3 Quantificação da atividade da enzima E-NTPDase

A hidrólise de ATP e ADP pela E-NTPDase foi determinada como descrito por Leal et al. (2005). O sistema da reação consistiu em 120 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 60 mM de Glicose, 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0) e 0,5 mM de CaCl_2 , em um volume final de 200 μL . O ensaio foi realizado usando microplacas contendo 160 μL de sistema e 20 μL da preparação suspensa de células mononucleares da medula óssea. A microplaca foi pré-incubada por 10 minutos a 37°C.

Após a pré-incubação a reação foi iniciada pela adição de 20 μL de substrato (ATP ou ADP a 20 mM) e o tempo de incubação foi de 70 minutos. As reações foram interrompidas transferindo 20 μL da reação em uma “placa espelho” contendo 20 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%.

As atividades enzimáticas foram medidas pela quantidade de fosfato inorgânico (P_i) liberado durante as reações. O P_i liberado foi quantificado usando verde de malaquita como reagente colorimétrico e KH_2PO_4 como padrão. A leitura da

absorbância foi realizada a 630 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata e a atividade específica foi expressa em nmol de Pi liberado/minuto/mg de proteína.

4.4 Análise estatística

Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e homogeneidade das variâncias. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste t de Student, ANOVA de uma via, seguida pelo teste post hoc de Tukey e Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn's. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Análises hematológicas

Dados hematológicos do sangue periférico de 22 pacientes com LLA-B foram analisados, sendo 7 classificados como AR e 15 como RI/BR de recidiva. Em relação ao valor de referência do hemograma para leucócitos ($5.000-10.000/\text{mm}^3$), foi observado aumento significativo em D0 nos pacientes classificados como AR (Tabela 2). Nos dias de tratamento D15/19 e D26/33, observa-se uma normalização no número de leucócitos nos dois grupos (AR e RI/BR).

NÚMERO DE LEUCÓCITOS $5.000 - 10.000/\text{mm}^3$		Média e Desvio Padrão
D0	AR (n=7)	41.070 ± 26.743
	RI e BR (n=15)	$14.221 \pm 5.978^{***}$
D15/19	AR (n=7)	3.014 ± 1.118
	RI e BR (n=14)	$2.961 \pm 518,2$
D26/33	AR (n=7)	5.530 ± 2.465
	RI e BR (n=14)	$3.216 \pm 551,6^{***}$

Tabela 2. Número de leucócitos (mm^3) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 dos grupos AR e RI/BR. Os resultados estão apresentados na forma de média $\pm$ desvio padrão da média. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. (***) indica uma diferença significativa ($p < 0,001$). Valor de referência para leucócitos: $5.000-10.000/\text{mm}^3$.

Em relação ao valor de referência para o conteúdo de hemoglobina, 12,0-16,0 g/dL para o sexo feminino e 13,5-17,5 g/dL para o sexo masculino, e o número de plaquetas, 140.000-400.000/mm³, os resultados no D0 dos grupos AR e RI/BR apresentaram valores baixos também em relação com os demais dias de tratamento (D15/19 e D26/33) (Tabela 3).

CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA 12,0 - 16,0 g/dL (fem.) 13,5 - 17,5 g/dL (masc.)		Média e Desvio Padrão
D0	AR (n=7)	6,986 ± 1,1230
	RI e BR (n=15)	6,953 ± 0,6344
D15/19	AR (n=7)	10,100 ± 0,4214
	RI e BR (n=14)	9,136 ± 0,4551
D26/33	AR (n=7)	9,286 ± 0,7414
	RI e BR (n=14)	9,686 ± 0,4064

Tabela 3. Média e desvio padrão do conteúdo de hemoglobina (g/dL) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 nos grupos AR e RI/BR. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. Valor de referência para hemoglobina: 12,0-16,0 g/dL (sexo feminino) e 13,5-17,5 g/dL (sexo masculino).

Na tabela 4 pode-se observar que a média do número de plaquetas, em comparação com seu valor de referência no hemograma (140.000 – 400.000 mm³), foi menor no D0 dos pacientes classificados nos dois grupos (RI/BR). Nos dias D15/19 e D26/33 observa-se um aumento significativo no número de plaquetas (Figuras 3 e 4).

NÚMERO DE PLAQUETAS 140.000 - 400.000/mm ³		Média e Desvio Padrão
D0	AR (n=7)	54.000 ± 26.104
	RI e BR (n=15)	43.600 ± 8.099*
D15/19	AR (n=7)	136.000 ± 57.102
	RI e BR (n=14)	177.643 ± 41.380
D26/33	AR (n=7)	231.429 ± 61.011
	RI e BR (n=14)	273.286 ± 27.484

Tabela 4. Média e desvio padrão do número de plaquetas (mm³) em sangue periférico no D0, D15/19 e D26/33 nos grupos AR e RI/BR. A análise dos dados foi realizada por meio do teste *t tests*. (*) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$). Valor de referência para plaquetas: 140.000-400.000/mm³.

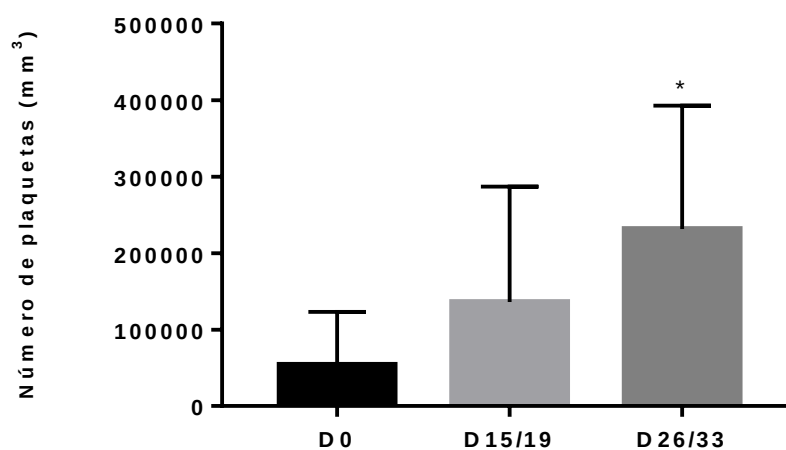


Figura 3. Número de plaquetas (mm³) em sangue periférico do grupo AR no D0, D15/19 e D26/33. A análise dos dados foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via seguido de Tukey. (*) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$). Valor de referência para plaquetas: 140.000-400.000mm³.

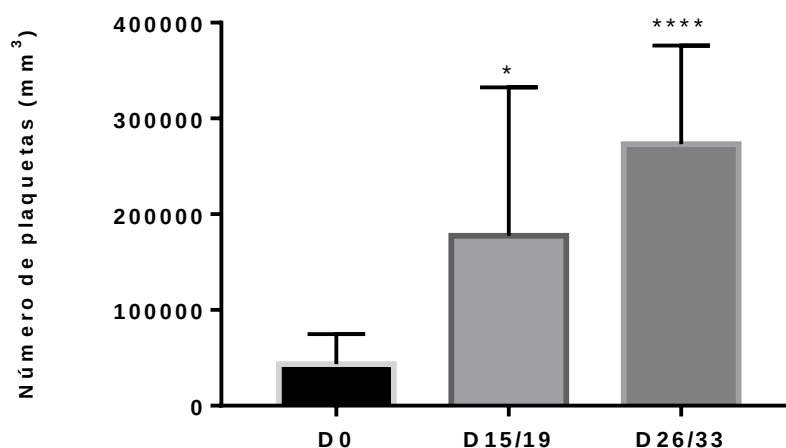


Figura 4. Número de plaquetas (mm^3) em sangue periférico do grupo RI/BR no D0, D15/19 e D26/33. A análise dos dados foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis seguido do teste post hoc de Dunn's. (*) indica uma diferença significativa ($p < 0,05$) e (****) indica uma diferença significativa ($p < 0,0001$). Valor de referência para plaquetas: $140.000\text{--}400.000\text{mm}^3$.

Nos dias D15/19 e D26/33 de tratamento, os números de leucócitos, conteúdo de hemoglobina e número de plaquetas, representados pelas tabelas 2, 3 e 4, respectivamente, tanto para o grupo de AR como RI/BR, pode-se observar, em relação aos valores de referências para cada parâmetro que o hemograma traz e em comparação com o D0, que houve uma diminuição nos números de leucócitos e um aumento nos números de plaquetas, mostrando uma normalidade dos resultados. Houve também um aumento no conteúdo de hemoglobina, porém, em comparação com o valor de referência, os resultados ainda apresentaram-se baixos.

5.2 Atividade da E-NTPDase

A análise da atividade da enzima E-NTPDase em BMMC foi realizada em 11 pacientes diagnosticados com LLA-B em diferentes estágios de tratamento. Dos 11 pacientes analisados, 8 foram classificados como AR e 3 como RI/BR. A média e desvio padrão dos resultados obtidos, dos grupos AR e RI/BR, para a atividade da enzima E-NTPDase (ATP e ADP), estão expressos em nmol de $\text{Pi}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína

na tabela 5. Observa-se uma média maior da atividade de E-NTPDase tanto para ATP como para ADP no grupo dos pacientes classificados como RI/BR, em comparação com os demais. Os pacientes do grupo AR, em relação ao grupo RI/BR, foram os que apresentaram a média mais baixa para a hidrólise de ADP.

Pacientes	Nucleotídeos (nmol de Pi/min/mg de proteína)	
	ATP	ADP
AR (n=8)	0,053 ± 0,014	0,045 ± 0,012
RI e BR (n=3)	0,094 ± 0,042	0,059 ± 0,030

Tabela 5. Média e desvio padrão da atividade da enzima E-NTPDase (ATP e ADP) em células mononucleares de medula óssea de pacientes com LLA-B, nos grupos AR (n=8) e RI/BR (n=3).

5.3 Marcadores de membrana

Das imunofenotipagens realizadas no diagnóstico (D0), utilizamos os marcadores de membrana presentes nas populações celulares de medula óssea de 19 pacientes classificados em AR (n=9), RI/BR (n=10) (Tabela 6).

Entre os pacientes estudados, além dos marcadores comuns que são quase sempre encontrados na LLA-B (CD19, CD10, HLADR, TdT), observa-se presença de intensidade positivo moderado (++) da mutação do gene CRLF2 nos pacientes 02 (AR) e 04 (BR) e presença de intensidade negativo a positivo fraco em parte da população (-/++) no paciente 03 (RI).

MARCADORES MEMBRANA	PACIENTES																		
	AR									RI						BR			
	01	02	06	09	12	13	19	22	31	03	23	24	25	26	29	04	15	28	30
CD10	+	+/++	+++	+++	+++	+++	-/+	+/++	++/+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++	+	+++	+++
CD20		++	-/+	-/++		-/+		+/++		++/+++							+		
CD34	+		++	-/+	-/+			+	++			++		+++	++	+++	-/+		+++
CD19	+	++	++	++	+++	++	++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++	+++	+	+	++
CD38	+		+	++	++	+++	++	+++	++	++	++	+	+++	+/++	++	-/+	+	+++	+
CD66c			+						++	-/+		+	+/++	+	++	+			
CD123		+/++	+						+	-/+		++	++	+	++	++	++		
CD13+CD33										-/+						+			
CD13	-/+																		
CD33	-/+		-/+				++										+		++
CD71	-/+																		
CD9		++		++						+++						++/+++			
CRLF2		++								-/+						++			
CD127		-/+																	
CD45			-/+	++	+	+	+	++			-/++			+				+	
CD58	+++		+++	+	+++	+++	+	+++	++		+	+	+	++/+++	++		+++	+++	+
CD22	+		++	++	++	++	++	++	+/++		++	++	++	+	++		+	+	++
CD81	-/+		+	++	+++	+++	++	++	++		+++	++			++		+	++	+
nuTdT	+			+	++	+	++	+/++			+/++	++					+	++	
HLADR	+																+		
CD25			+						+										

Tabela 6. Marcadores de membrana presentes nas populações celulares de medula óssea analisadas ao diagnóstico. Intensidade do marcador antigênico: -/+ (negativo a positivo fraco em parte da população), -/+++ (negativo a positivo heterogêneo em parte da população), + (positivo fraco), ++ (positivo moderado), +++ (positivo forte), ++++ (positivo muito forte), +/+ (positivo heterogêneo), +/+++ (positivo heterogêneo), +/+++ (positivo heterogêneo).

6 DISCUSSÃO

As leucemias são neoplasias hematológicas que possuem anormalidades citogenéticas somáticas consideradas como alterações fundadoras no processo de leucemogênese. Considerando que esta é uma neoplasia prevalente em crianças, os estudos dessa doença melhoram o entendimento da fisiopatologia e genética das células neoplásicas, impactando nas taxas de sobrevida livre de eventos (PUI et al., 2013; FERREIRA, 2017). Apesar desses achados e do sucesso ao tratamento, demonstrado por diversos protocolos internacionais, para cerca de 20% dos pacientes, o tratamento pode falhar ou há recidiva da doença (PUI et al., 2013; BRANDALISE et al., 2011).

Em meio a exames complexos, parte da rotina de investigação de um paciente com suspeita de ter leucemia, é o hemograma completo realizado por analisadores hematológicos automatizados. Os achados do hemograma nas leucemias elucidam mecanismos patogénéticos da doença. O presente estudo revela que o número de leucócitos dos pacientes analisados do grupo AR, estava significativamente maior no diagnóstico (D0), em relação ao valor de referência. Pacientes do grupo RI/BR também apresentaram elevação no número de leucócitos, porém mais próximo do limite do valor de referência ($10.000/\text{mm}^3$). Tal parâmetro também apresentou-se mais baixo no D0 dos dois grupos quando comparado com os valores nos dias D15/19 e D26/33 de tratamento. Esse aumento é causado pela proliferação excessiva de células leucêmicas na medula óssea que se espalham para o sangue periférico apresentando número de leucócitos alto.

Em um estudo utilizando o analisador de hematologia DxH 800 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA), que é capaz de reconhecer diretamente as características morfológicas indicativas dos subtipos de leucócitos e coletar dados de população celular, foi demonstrado que a contagem de leucócitos foi significativamente maior em 30 pacientes com leucemia do que no controle realizado com 20 pacientes saudáveis (YASHIM et al., 2021).

Além disso, o conteúdo de hemoglobina (Hb) e o número de plaquetas, no diagnóstico, nos grupos AR e RI/BR, em relação aos valores de referência do hemograma, apresentaram-se baixos, mostrando que os pacientes deste estudo eram anêmicos e plaquetopênicos. Este padrão é o mesmo relatado em literatura. Achados semelhantes foram observados por Munir e colaboradores (2019) que realizaram um

estudo com 109 pacientes com leucemias agudas e crônicas e observou que todos os pacientes com LLA apresentaram CTL aumentada, conteúdo de Hb e número de plaquetas reduzidos.

Os mesmos parâmetros foram estudados por Naeem em 50 pacientes recém diagnosticados com LLA B e T e os resultados apresentaram-se semelhantes, sendo CTL aumentada em 58% dos casos, Hb baixa em 74% dos casos, mas baixa contagem de plaquetas apenas em 12% de todos os casos (NAEEM et al., 2015).

Yashim, além de demonstrar que o número de leucócitos é alto em sangue leucêmico, também demonstrou que todos os parâmetros hematológicos foram menores em comparação ao controle, exceto para monócitos e basófilos. Esse achado é consistente com vários estudos que associaram leucócitos elevados e plaquetas reduzidos à infecção por leucemia, resultando em uma proliferação de leucócitos incomum na medula óssea (YASHIM et al., 2021).

Tais alterações ocorrem pelo fato de as leucemias serem caracterizadas pela proliferação exacerbada de células leucêmicas, isto é, células leucocitárias imaturas oriundas da medula óssea, que com a evolução da doença atingem frequentemente o sangue periférico e outros órgãos. Uma proliferação desordenada de leucócitos, por estes desajustes na medula óssea, diminui a produção de plaquetas e eritrócitos (OLIVEIRA et al., 2016).

Ao passo que o tratamento quimioterápico é iniciado, podemos observar mudanças significativas nos resultados do hemograma, em relação aos valores de referência para cada parâmetro. A contagem do conteúdo de Hb e número de plaquetas nos três grupos, tanto nos dias 15 e 19 de tratamento (D15/19) quanto nos dias 26 e 33 (D26/33) aumentaram, e o número de leucócitos diminuiu, mostrando uma eficácia do tratamento quimioterápico, que tem como objetivo destruir as células leucêmicas fazendo com que a medula óssea volte a produzir células normais. Assim, este estudo constatou que alterações nos parâmetros hematológicos iniciais foram significativamente associadas à leucemia, pois o exame de hemograma para os parâmetros analisados, mostrou um estado de aparente normalidade após a quimioterapia.

No presente estudo, também foi analisada, em células mononucleares de medula óssea de jovens com LLA-B, a atividade da enzima E-NTPDase através da hidrólise de ATP e ADP. Os nucleotídeos ATP e ADP são componentes normais do

meio extracelular que exercem uma variedade de efeitos fisiológicos sobre células hematopoiéticas e não hematopoiéticas.

Nossos resultados indicaram que a atividade de E-NTPDase na hidrólise de ATP e ADP, nas células dos pacientes classificados como RI/BR de recidiva da doença, foram maiores em relação aos pacientes do grupo AR. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Zanin e colaboradores (2006), que observaram a hidrólise de ATP e ADP alterada em linfócitos periféricos de pacientes com um quadro avançado de LLC e associaram este aumento da atividade da enzima como contribuição para a resistência das células leucêmicas pela diminuição nos níveis de ATP, que seria o suficiente para evitar a morte celular.

O ATP em altas concentrações liberado no meio extracelular pelas células leucêmicas, ativa os receptores P2X₇. Altos níveis deste receptor foram encontrados em pacientes com recaída doença e a diminuição foi observada na fase de remissão completa (CHONG, 2010). A expressão deste receptor também foi associada com a gravidade da leucemia por Adinolfi et al. (2002), onde a expressão de P2X₇ foi maior em pacientes com a forma mais grave da LLC. Dois dos pacientes deste grupo estavam em tratamento, um já havia finalizado e nenhum deles apresentou recidiva da doença, o que, se ao contrário, poderia explicar tal alteração encontrada em comparação com a literatura.

Os linfócitos estão envolvidos no combate às células cancerosas, então ATP é liberado no meio extracelular elevando os níveis plasmáticos. A atividade de E-NTPDase e E-ADA em linfócitos periféricos de pacientes pediátricos com LLA-B, foram estudadas por Zimmermann e colaboradores, e observaram a atividade reduzida de E-NTPDase nas reações de hidrólise de ADP no 15º dia de tratamento. Os autores concluíram que a hidrólise reduzida poderia representar um possível defeito funcional nos linfócitos (ZIMMERMANN et al., 2017). A hidrólise de ADP nos pacientes deste estudo, mostrou-se mais baixa no paciente do grupo AR, em comparação com os grupos RI/BR.

Vários estudos indicam que há alterações nos componentes da sinalização purinérgica em pacientes com diferentes tipos de leucemia, porém o perfil de ectoenzimas nas células da medula óssea ainda é desconhecido. Os pacientes classificados como AR, apresentaram um número de leucócitos, em sangue periférico, significativamente maior em D0 em comparação com o valor de referência do hemograma e com o grupo RI/BR. Esse mesmo grupo apresentou uma atividade

menor da enzima E-NTPDase, tanto na hidrólise de ATP como ADP. Estes resultados discordam dos resultados esperados para este estudo e dos resultados encontrados na literatura. Faz-se necessário mais pesquisas a respeito das ectonucleotidases em células mononucleares de medula óssea.

Os pacientes 02 (AR), 03 e 04 (RI/BR), apresentaram entre os marcadores de membrana pesquisados ao diagnóstico, na intensidade positivo moderado (++), (pacientes 02 e 04) e intensidade negativo a positivo fraco em parte da população (-/++) (paciente 03), positividade para a mutação do gene CRLF2. CRLF2 é um membro da super família do receptor de hematopoetina, que forma um receptor com cadeia alfa do receptor de IL-7R α para a citocina TSLP. Na presença de TSLP há ativação de células dendríticas, estimulando respostas inflamatórias TH2 (FERREIRA, 2017). A superexpressão de CRLF2 ocorre em 15% dos casos de LLA no adulto e na criança (YODA et al., 2010; TASIAN et al., 2011).

A alta expressão de CRLF2 se correlaciona com marcadores de LLA de alto risco, bem como a sobrevida baixa nos pacientes. Ge e colaboradores (2016), descobriram que a alta expressão de CRLF2 está correlacionada com fatores prognósticos desfavoráveis nos pacientes adulto com LLA. O paciente 04 foi classificado como BR e teve uma boa resposta ao tratamento. O paciente 02 foi classificado no grupo AR. Curiosamente este mesmo paciente apresentou uma recidiva da doença, o que concorda com o prognóstico desfavorável que os estudos revelam.

7 CONCLUSÃO

Na identificação e investigação das leucemias, além dos critérios morfológicos, imunofenotípicos e citogenéticos, o conhecimento do padrão de parâmetros hematológicos básicos, como a contagem de leucócitos, hemoglobina e plaquetas é necessário, pois reduz o diferencial diagnóstico para conhecer o subtipo de leucemia levando a um diagnóstico precoce e consequentemente à diminuição da morbidade e mortalidade. Em relação aos valores de referência do hemograma, os pacientes deste estudo apresentaram, no diagnóstico, número de leucócitos alto, contagem de hemoglobina e número de plaquetas baixos, e com a normalização destes resultados, após o início do tratamento quimioterápico, constatou que as alterações nos parâmetros hematológicos iniciais foram significativamente associadas à leucemia.

Embora o perfil de ectoenzimas nas células da medula óssea seja ainda desconhecido, está cada vez mais evidente que esta classe de enzimas desempenha um papel importante nos sistemas imunológicos e inflamatórios. A atividade de E-NTPDase, nas hidrólises de ATP e ADP, em BMMC de jovens com LLA-B, mostrou-se mais alto nos pacientes classificados como RI/BR. Esses resultados obtidos somam à outros estudos encontrados na literatura. Experimentos futuros são necessários para elucidar o perfil do sistema purinérgico em pacientes com leucemias.

REFERÊNCIAS

- AHMANN F. R. et al. Intracellular adenosine triphosphate as a measure of human tumor cell viability and drug modulated growth. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 23, n. 7, p. 474-480, 1987.
- BENE, M.C. et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias: European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, v. 9, p. 1783-6, 1995
- BERGAMIN, L.S. et al. Ectonucleotidases in tumor cells and tumor-associated immune cells: an overview. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2012, 1-10, 2012.
- BOYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, v.97, p.77-89, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.
- BRANDALISE S. R. et al. Protocolo de tratamento da leucemia linfoblástica aguda da criança e adolescente, GBTLI LLA-2009. Versão revisada 24 de agosto 2011. São Paulo: SOBOPE, 2011.
- BURNSTOCK, G. Purinergic signaling - an overview. *Novartis Found Symposium* 276, p. 26-48, 2006.
- BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling and the Nervous System. Springer Berlin Heidelberg, p. 7-66, 2012.
- BURNSTOCK, G. et al. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic Signalling*, v. 4, n. 9, p. 491-540, 2013.
- BHOJWANI, D. et al. Biology of childhood acute lymphoblastic leucemia. *Pediatric Clinics of North America – Journals*, v. 62, p. 47-60, 2015.
- CHAN, K. M. et al. A direct colorimetric assay for Ca²⁺-stimulated ATPase activity. *Analytical Biochemistry*, v.157, n.2, p.375-380, 1986.
- CHONG J. H. et al. Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 391, n. 1, p. 498-504, 2010.
- CODERO, O. et al. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 70, n. 6, p. 920-930, 2001.

COOPER S. L. Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics*, v. 1, n. 62, p. 61-73, fev. 2015.

COSTA R. N. Introdução a citometria de fluxo. Um manual básico para iniciantes, Curitiba – PR, 2020.

DI VIRGILIO, F. Purinergic signalling in the immune system. A brief update. *Purinergic Signalling*, v. 3, p. 1-3, 2007.

DI VIRGILIO F. Purines, Purinergic Receptors, and Cancer. *Cancer Research*, v. 72, p. 5441-5447, 2012.

DI VIRGILIO, F. Extracellular ATP and P2 purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, v.18, 601-618, 2018.

FERRARI, D. et al. Purinergic Signaling During Immune Cell Trafficking. *Trends In Immunology*, Ferrara, v. 37, p. 399-411, 2016.

FERREIRA, P. M. S. Citometria de fluxo multiparamétrica na determinação da expressão proteica e transcrição gênica de CRLF2 na leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B, Biblioteca Virtual em Saúde, Rio de Janeiro – RJ, 2017

FRANCO, R. et al. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Progress of Neurobiology*, p. 283–294, 1997.

GE, Z. et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget*, v. 7, p. 49722–49732, 2016.

GREAVES. In utero origins of childhood leukemia. *Early Human Development*, v. 81, n. 1, p. 123-129, 2005.

HOSSAIN J. Prognostic factors of childhood and adolescent acute myeloid leukemia (AML) survival: Evidence from four decades of US population data. *Cancer Epidemiology*, v. 39, n. 5, p. 720-726, out. 2015.

HUNGER, S. P. et al. Childhood Leukemia. *Abeloff's Clinical Oncology*, v. 4, n. 6, p. 1748-1764, 2020.

HUNGER S. P. et al. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The new england journal of medicine*, v. 373, p. 1541-1552, 2015.

INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/image/capa-estimativa-2020-publicacao_0.jpg.

JUNGER, W. G. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 3, p. 201-212, 2011.

KIM, C. H. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *Journal of Blood Medicine*. London, p. 13-19. 23 mar. 2010.

LEAL, D. B. R. et al. Characterization of NTPDase (NTPDase1; Ecto-apyrase;ecto-diphosphohydrolase; CD39; EC 3.6.1.5) activity in human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1721, n. 13, p. 9-15, 2005.

MUNIR, A. H. et al. Pattern of basic hematological parameters in acute and chronic leucemias. *Journal of Medical Sciences*, v. 27, p. 125-129, 2019.

MCKINNON, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Current Protocols In Immunology*. p. 1-5. 21 fev. 2018.

NAEEM, S. et al. Antigen Expression on Blast Cells and Hematological Parameters at Presentation in Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, v.6, p. 407, 2015.

OLIVEIRA, R. A. et al. Mielograma: Introdução ao mielograma. In: OLIVEIRA, Raimundo Antônio. *Mielograma e Imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Ltda., 2016. Cap. 1. p. 3-16.

PEDROSA, F. et al. Lymphoblastic leukemia: a curable disease. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*, p. 63-68, 2002.

PEREIRA, F.A. C. et al. Environmental risk factors and acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Ciencias de la salud*, v.15, n. 1, p. 129-144, 2017.

PUI, C. H. et al. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in hematology*, p.185-196, 2013.

REGO, E. M. et al. Papel da imunofenotipagem por citometria de fluxo no diagnóstico diferencial das pancitopenias e das linfocitoses. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, jul. 2009.

REPAPORT, E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, v. 144, c. 3, p. 279-283, 1983.

SAVIO, L. E. B. et al. Purinergic signaling in the modulation of redox biology. *Redox Biology*, 2021.

SCHRAPPE, M. et al. A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. 2010.

TASIAN, S.K. et al. Understanding the biology of CRLF2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews in Oncogenesis*, v. 16, p. 13–24, 2011.

WEI K. et al. Niches for Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *Immunity*. p. 632-648. jan. 2018.

WHITE N. et al. P2 receptors and cancer. *Trends In Pharmacological Sciences*, v. 27, n.4, p. 211-217, 2006.

WHITEHEAD T. P et al. *Childhood Leukemia and Primary Prevention*. Elsevier. Berkeley - Ca, p. 317-352. out. 2016.

WILSON, Anne; TRUMPP, Andreas. Bone-marrow hematopoietic-stem-cell niches. *Nature Reviews Immunology*, New York, NY, v. 6, p.93-106, fev. 2006.

WILSON, Anne; TRUMPP, Andreas. Hematopoietic Stem Cell Niches. *Molecular Basis of Hematopoiesis*, New York, NY, p.47-71, 2009.

WOOD, B. L. Acute Myeloid Leukemia Minimal Residual Disease Detection: The Difference from Normal Approach. *Current Protocols and Cytometry*, 2020.

YASHIM, A. et al. Altered leukogram and hematological parameters among leukemia patients. *Journal of Medical Sciences*, V.8, n. 3, p. 263, 2021.

YEGUTKIN, G. Nucleotide and nucleoside converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1783, p. 673-694, 2008.

YODA, A. et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 107, 252–7, 2010.

ZANIN, R.F. Hidrólise extracelular de ATP e ADP pela enzima NTPDase1 em linfócitos de pacientes com leucemia linfocítica crônica-B. 2006. 60 p. Dissertação. (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ZIMMERMANN L. O. Atividade das enzimas que degradam nucleotídeos e nucleosídeos da adenina em leucemia linfoblástica aguda B derivada. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas: Análises Clínicas e Toxicológicas) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

ZIMMERMANN, H. Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Progress Neurobiology*, v.49, n.6, p.589-618, 1996.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature. *Drug Development Research*, n.52, p.44-56, 2001.

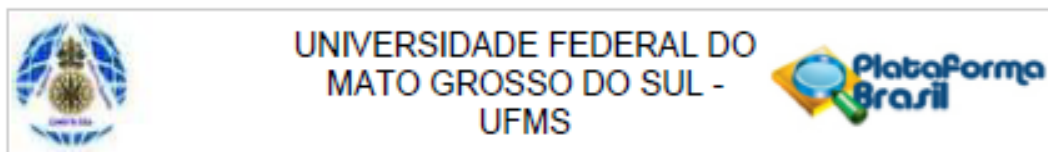
ZIMMERMANN, H. et al. Cellular function and molecular structure of ectonucleotidases. *Purinergic Signalling*, v. 8, p. 437-502, 2012.

ZIMMERMANN, H. Purinergic signaling in neural development. *Seminars In Cell & Developmental Biology*, v. 22, n. 11, p. 194-204, 2011.

ZIMMERMANN, L. et al. Ectoenzymes E-NTPDASE, E-5'-NT and E-ADA: how they function in peripheral lymphocytes of B-precursor acute lymphoblastica leukemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2017.

ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP/UFMS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Atividade de enzimas do sistema purinérgico em células monocucleares de medula óssea de jovens com leucemia.

Pesquisador: FLÁVIA CASTRO SOUTO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 26551219.0.0000.0021

Instituição Proponente: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.777.015

Apresentação do Projeto:

Será feito uma avaliação da atividade de enzimas do sistema purinérgico de jovens (0 a 19 anos) com leucemias tratados no Centro de Tratamento Onco-Hematológico-Infantil - CETOHI situado no Hospital Regional de Mato Grosso do Sul - HRMS. Para isso, na coleta de medula óssea de rotina será coletado um volume excedente de aproximadamente 8ml para a realização desta pesquisa. Além da medula óssea também será coletado informações dos participantes disponíveis em prontuários e banco de dados arquivados no CETOHI. O isolamento das células que serão analisadas poderá ser feito tanto no laboratório do CETOHI como no laboratório de Bioquímica do Instituto de Biociência - INBIO. A contagem celular, identificação das populações celulares e a análise da expressão de CD39, CD73 e P2X7R celulares será realizado no Laboratório de Análises Clínicas - LAC do HRMS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-NT, e E-ADA em células mononucleares de medula óssea de jovens com leucemia.

Objetivo Secundário:

- Coletar, de prontuários e banco de dados, as seguintes informações: sexo, raça, data de nascimento, data do diagnóstico, data do início do tratamento, protocolo de tratamento, esquema terapêutico, grupo de risco, resultados de exames laboratoriais e de imagem.- Quantificar a

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande
Bairro: Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110
UF: MS **Município:** CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** cepconep.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 3.777.015

atividade das enzimas E-NTPDase, E-5'-NT, e E-ADA em células mononucleares isoladas da medula óssea de jovens com leucemia.- Analisar a expressão das proteínas CD39 (E-NTPDase), CD73 (E-5'-NT) e do receptor purinérgico P2X7 em células mononucleares de medula óssea de jovens com leucemia.- Diferenciar e quantificar as células presentes em cada separação.- Realizar todas as análises propostas antes do tratamento (dia 0, D0), nos dias 15 (D15), 33 (D33), e logo após 104 semanas de tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de medula óssea dos participantes envolve riscos como o desenvolvimento de hematoma e dor no local da punção. Para minimizar os riscos inerentes à coleta da amostra, esta será realizada por profissionais habilitados que tomarão todos os cuidados necessários para evitar o sofrimento dos participantes. Contudo, estes pacientes já tem que fazer a punção para avaliação da leucemia. A obtenção das informações dos participantes também envolve risco, como a exposição das informações destes. Para proteger a privacidade e a confidencialidade das informações dos participantes, a sua identidade será mantida em sigilo e as suas informações serão coletadas em um instrumento que não contém campo para a sua identificação.

Benefícios:

A participação nesta pesquisa trará benefícios indiretos aos participantes, a análise dos resultados deste estudo quando confrontados com os demais exames obtidos através dos prontuários e banco de dados poderão conduzir a mais pesquisas, nortear novas estratégias terapêuticas, e identificar na expressão e nas atividades analisadas possíveis marcadores diagnósticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A análise dos resultados deste estudo quando confrontados com os demais exames obtidos através dos prontuários e banco de dados poderão nortear novas estratégias terapêuticas, e identificar na expressão e nas atividades analisadas possíveis marcadores diagnósticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados os seguintes termos:

- 1.Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, TCLE.
- 2.Termo de Assentimento Livre e Esclarecido, TALE.
- 3.Autorização da Comissão de ética em Pesquisa do Hospital Regional de Mato Grosso do Sul

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cepconep.propp@ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO
MATO GROSSO DO SUL -
UFMS



Continuação do Parecer: 3.777.015

(assinada pelo Dr. Jose Júlio Saraiva Gonçalves).

4. Protocolo de avaliação trabalhos científicos assinados pelo coordenados do HRMS.
5. Autorização do Centro de tratamento onco-Hematológico infantil- CETOHI para coleta de 8 ml de medula óssea, dados de prontuários e banco de dados e uso de centrifuga instalada no laboratório.
6. Autorização pelo setor de bioquímica do instituto de biociência-INBIO para a utilização de reagentes e equipamentos como pHmetro, espectrofotometro, centrífuga, banho maria, refrigeradores e congeladores, agitadores magnéticos, capela de exaustão e destilador.
7. Autorização do laboratório de análises clínicas-LAC do HRMS para a utilização dos aparelhos Sysmex, XN 3000 de hematologia e BD, FACS Calibur de Citometria de fluxo, para a contagem de leucócitos e identificação das populações celulares.
8. Instrumento de coleta de dados
9. Termo de compromisso para utilização de informações de prontuários em projetos de pesquisa.
10. Termo de compromisso para utilização de informações de banco de dados em projetos de pesquisa (software MV PEP 2.0 utilizado no centro de tratamento onco-hematológico infantil- CETOHI do hospital regional de Mato Grosso do Sul)
11. Declaração de uso de material biológico e dados coletados.

Recomendações:

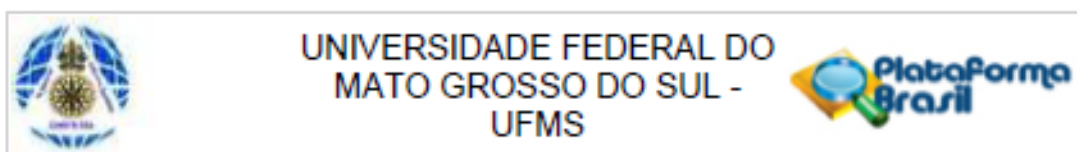
o projeto necessita a readequação na redação do TCLE e do TALE.

- 1- No fim da segunda página do TCLE DOS RESPONSÁVEIS LEGAIS e dos participantes maiores de 18 anos e no TALE. Suprimir o campo de assinatura (Nome completo do responsável pelo participante.)
- 2- No TCLE DOS PARTICIPANTES MAIORES DE 18 ANOS, alterar o termo RUBRICA DO REPRESENTANTE LEGAL por rubrica do participante. E também o campo de assinatura do responsável pelo participante por Assinatura do participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa apresentado foi considerado Aprovado. Entretanto, como foi recomendado adequações pontuais, solicita-se que, após atender tais recomendações, o pesquisador envie ao CEP, via plataforma Brasil como notificação as adequações realizadas.

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cepconep.propp@ufms.br



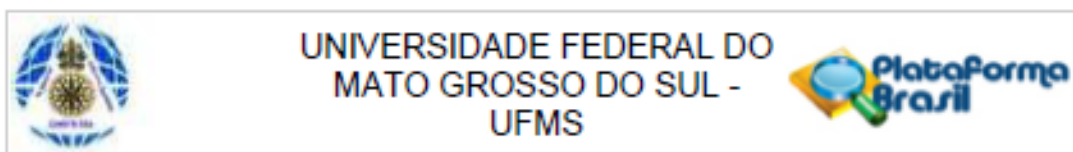
Continuação do Parecer: 3.777.015

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	FRASSINADA.pdf	04/12/2019 11:54:19	EVELYN PINHO FERRO E SILVA	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1479084.pdf	02/12/2019 22:40:41		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Flavia.pdf	02/12/2019 22:30:59	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Flavia.pdf	02/12/2019 22:07:36	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Utilizacao_prontuarios.jpeg	02/12/2019 20:55:40	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Utilizacao_banco_dados.jpeg	02/12/2019 20:54:25	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Outros	Instrumento_coleta_dados.pdf	02/12/2019 20:52:39	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_INBIO.jpeg	02/12/2019 20:50:59	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_LAC.jpeg	02/12/2019 20:48:37	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_CETOHI.jpeg	02/12/2019 20:48:20	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_CEP_HRMS2.jpeg	02/12/2019 20:46:41	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_CEP_HRMS.jpeg	02/12/2019 20:40:56	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Manuseio_material_biologico.jpeg	02/12/2019 20:36:08	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_6_12_anos.pdf	02/12/2019 20:29:09	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
TCLE / Termos de	TALE_13_17_anos.pdf	02/12/2019	FLÁVIA CASTRO	Aceito

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cepconep.propp@ufms.br



Continuação do Parecer: 3.777.015

Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_13_17_anos.pdf	20:28:49	SOUTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maior_18.pdf	02/12/2019 20:28:32	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveis.pdf	02/12/2019 20:28:28	FLÁVIA CASTRO SOUTO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPO GRANDE, 17 de Dezembro de 2019

Assinado por:
Fernando César de Carvalho Moraes
(Coordenador(a))

Endereço: Cidade Universitária - Campo Grande
Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110
UF: MS Município: CAMPO GRANDE
Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: cepconep.propp@ufms.br

ANEXO B

Diretrizes para autores da Revista Brasileira de Ciências da Saúde - RBCS

A Revista Brasileira de Ciências da Saúde - RBCS é uma publicação científica dirigida à produção acadêmica, na área de Ciências da Saúde. Publica, estudos científicos inseridos na realidade brasileira, em língua portuguesa, e divulga contribuições visando a melhoria da qualidade do Ensino, da Investigação Científica e da Assistência à Saúde no Brasil. Atualmente está indexada na Base Lilacs/BVS.

Poderão ser submetidos para avaliação, artigos para publicação nas seguintes seções: a) Pesquisa, b) Revisões, (submissões suspensas a partir de 25 de maio de 2015), c) Relato de Caso e Relato de Experiência (submissões suspensas a partir de 25 de maio de 2015), d) Ensino, e) Metodologia, f) Carta ao Editor.

Todo trabalho recebe no ato da submissão um número de identificação (ID) que deve ser usado nas consultas ao Editor, no assunto da mensagem e do título de cada documento enviado para a revista. Independente da seção é necessário anexar os seguintes documentos:

1. Carta de Transferência de Direitos Autorais assinada por todos os autores (conforme modelo);
2. Cópia do Parecer do CEP (quando for o caso);
3. Lista de Autores e Afiliação (Nomes completos, sem abreviaturas. Deve estar na ordem a ser usada na publicação. Afiliação: Indicar o vínculo profissional detalhando função/cargo, Programa, Departamento e Instituição com Cidade, Estado e País.
4. Endereço postal completo do autor a ser indicado como contato na publicação. (Rua, número, complemento, Bairro, Cidade, Estado, País e CEP, bem como endereço eletrônico (email).
5. Declaração de Conflitos de Interesse assinada por todos os autores (conforme modelo);
6. O ORCID de cada autor presente no manuscrito.

MODELO DE DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Ao Editor Científico da Revista Brasileira de Ciências da Saúde Declaração de Conflitos de Interesse Eu, Nós (nome (nomes) por extenso), autor (es) do manuscrito intitulado (título), declaro (amos) que possuo (imos) () ou não possuo (imos) () conflito de interesse de ordem: () financeiro, () comercial, () político, () acadêmico e, () pessoal, Declaro (amos) também que o apoio financeiro e (ou) material recebido para o desenvolvimento deste trabalho estão claramente informados no texto.

As relações de qualquer tipo que possam levar a conflito de interesse estão completamente manifestadas abaixo.

Local, data:, de de 201...

Autores: (nomes e assinaturas)

Aspectos Éticos: Todo artigo que envolver indivíduos humanos deve vir acompanhado de Cópia de Parecer de Comitê de Ética em Pesquisa - CEP. Não deve ser usado nome do paciente, iniciais, números de registros, inclusive registro hospitalar, no texto e em nenhuma ilustração. Artigos envolvendo experimentação animal devem explicitar que estão de acordo com a legislação internacional ou normas nacionais e da instituição para de uso de animais em pesquisa.

Seções Pesquisa: Esta seção consta de artigos inéditos, contribuições originais resultante de observações experimentais, de estudos de natureza epidemiológica, ou outros, representando novos resultados ou o progresso nos diversos campos das Ciências da Saúde. Os artigos enviados para esta seção terão prioridade sobre os demais. Esta seção está formalmente dividida nos seguintes itens: Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão, Conclusão, Referências, além de Resumo e Abstract.

Relato de Caso: Relato de caso clínico altamente informativo ou incomum constando de três itens: Introdução, Relato e Comentários. As Referências devem ser restritas às essenciais, no máximo a dez. **Metodologia:** Seção dedicada a artigos descritivos sobre métodos estatísticos, físicos, químicos, citológicos etc., aplicados à pesquisa científica na área de Ciências da Saúde. Esta seção consta de três itens: Introdução, sobre os fundamentos teóricos do método; Método, descrição do método propriamente dito e Aplicação, sobre as aplicações práticas do mesmo.

Ensino: Seção composta de artigos descritivos de relevância sobre aspectos técnicos e avaliativos do ensino ou sobre propostas educacionais inovadoras na área de Ciências da Saúde. Esta seção consta de três itens: Introdução, sobre fundamentos teóricos e contexto da proposta; Proposta, descrição do objeto e Aplicação, contando comentários sobre a aplicabilidade e resultados (quando houver).

Carta ao Editor: Seção reservada ao comentário crítico e opinativo exclusivamente sobre artigo publicado na Revista Brasileira de Ciências da Saúde. Os Editores avaliarão a pertinência da crítica e sendo considerada de interesse geral, será dada aos autores do artigo em questão, o direito de réplica, a qual será publicada no mesmo número da Revista. A Carta não deverá ultrapassar a uma página (300 palavras de texto). Itens da seção Pesquisa

Introdução: Neste item são caracterizados, de modo sumário, o problema estudado, as hipóteses levantadas, a importância do estudo e os objetivos.

Metodologia: Descrição da amostra e processo de amostragem, especificando o número de observações, variáveis, métodos de averiguação e de análise estatística dos dados. **Resultados:** A apresentação dos resultados deve ser de maneira sequencial e racional, usar tabelas, quadros e figuras (ilustrações/gráficos). As ilustrações devem ser inseridas no texto submetido.

Discussão: Os resultados mais importantes devem ser analisados criticamente, interpretados e quando for possível, comparados com dados semelhantes aos da literatura. Informações citadas nos itens anteriores só devem ser mencionadas quando absolutamente necessárias.

Conclusão: As conclusões devem responder de modo sucinto e direto aos objetivos propostos. Recomendações quando apropriadas podem ser incluídas no final deste item.

Dimensões: O texto completo (título, autores, resumo, abstract, corpo do trabalho com figuras e referências) deve estar contido em 15 páginas, digitadas em word com margens de 2,5, espaço 1,5 e fonte arial 11.

Julgamento: Todo artigo submetido à Revista será primeiramente apreciado pela Comissão Editorial nos seus aspectos gerais e normativos. Havendo alguma irregularidade será devolvido aos autores para correção, não havendo, será encaminhado aos consultores externos para apreciação especializada do conteúdo. Os pareceres dos consultores serão encaminhados aos respectivos autores para eventuais ajustes. Excepcionalmente quando se tratar de assunto muito especializado, os autores poderão sugerir, à Comissão Editorial da Revista, dois consultores com reconhecimento nacional ou internacional e que sejam externos às suas respectivas instituições.

Resumo e Abstract: O Resumo/Abstract deverá, obrigatoriamente, ser estruturado, isto é, ser subdividido nos seguintes itens descritos como necessários para cada seção, como por exemplo: Pesquisa: Objetivo, Metodologia, Resultados e Conclusão, descritos, de modo claro e objetivo. O Resumo/Abstract deve ser escrito em espaço simples, sem parágrafos, citações bibliográficas ou notas e ter entre 200 e 250 palavras.

Descritores e Descriptors: A base de escolha dos Descritores poderá ser a área e sub-área de trabalho originadas a partir do título, tipo de abordagem e tipo de resultado, os mais relevantes para indexação. A escolha dos Descritores deverá seguir, obrigatoriamente, o DeCS (Descritores de Ciências da Saúde) da BIREME, o qual poderá ser acessado na Internet, através do site www.bireme.org ou www.bireme.br O número mínimo obrigatório de Descritores será de três e o máximo de seis, podendo ou não colocar qualificadores de cada descritor.

Agradecimentos: Quando houver este item, deve ser reservado para citação de pessoas que prestaram ajuda técnica, mas que não foram caracterizadas como co-autoras, ou instituições financiadoras e de apoio material.

Figuras: São consideradas Figuras todas as ilustrações do tipo fotografias, gráficos, mapas, desenhos profissionais etc. As Figuras e seus títulos devem ser inseridos no texto submetido, no local definido pelo autor. Devem ser numeradas em algarismos arábicos, de modo consecutivo na ordem em que aparecerem no texto. Fotografias do rosto ou do corpo inteiro de pacientes quando indispensáveis devem vir acompanhadas de permissão por escrito do paciente ou do seu responsável legal, além do Parecer da Comitê de ética em Pesquisa. Como norma do periódico, apenas fotos inéditas, não publicadas, serão aceitas como ilustrações. Quando forem usados números, letras e setas nas ilustrações, estas devem ser mencionadas devidamente no título das mesmas. Os títulos das Figuras devem ser, também, auto-explicativos. Os gráficos devem ser apresentados sempre referidos em função de eixos cartesianos.

Citação Bibliográfica: O sistema de citação adotado é o numérico, isto é, uma numeração única, consecutiva, em algarismos arábicos, sobrescrita em relação ao texto, e que remetendo à relação de referências ao final do trabalho. Exemplos de citação numérica: Atenção: Números sobrescritos ao texto. Esta condição é influenciada pela idade¹¹ - (uma referência) Esta condição é influenciada pela idade^{11,12} - (duas referências consecutivas) Esta condição é influenciada pela idade^{11,13} - (duas referências não consecutivas) Esta condição é influenciada pela idade¹¹⁻¹³ - (mais de duas referências consecutivas) Em casos específicos poderá ser usada a citação do autor.

Referências Bibliográficas: Usar entre 20 e 30 referências. As referências devem ser normalizadas com base no estilo conhecido como Normas de "Vancouver", o Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, ordenadas por ordem de entrada e numeradas. Para publicações com até seis autores, todos devem ser citados; quando estiver acima de seis, somente citar os seis primeiros, acrescido da expressão "et al".

Artigo científico em periódico: 13. Costa ACO, Moimaz SAS, Garbin AJI, Garbin CAS. Plano de carreira, cargos e salários: ferramenta favorável à valorização dos recursos humanos em saúde pública. *Odontol. Clín.-Cient.* 2010; 9(2):119-23. (Não inserir o link, nem o DOI)
Livro: 13. Tobar F, Yalour MR. Como fazer teses em saúde pública. 2ª.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2001.

Dissertações e Teses: Autor(es), título, [Dissertação de Mestrado] ou [Tese de Doutorado]. Cidade: Universidade (ou Instituição); ano. Número de páginas total seguido da letra p(300p).

Referência em meio eletrônico: deve-se mencionar todos os elementos essenciais disponíveis na homepage. Além disso, deve-se acrescentar a expressão Disponível em / Available in: seguida da expressão Acesso em / Access in: data do acesso: dia, mês e ano. Título abreviado - lista de abreviaturas de periódicos da Index Medicus (base de dados Medline), pode ser consultada no endereço: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=journals> Lista de abreviaturas dos títulos de periódicos nacionais e latino-americanos consulte o site: <http://portal.revistas.bvs.br>

Declaração de Direito Autoral

Eu (Nós), abaixo assinado(s) transfiro(erimos) todos os direitos autorais do artigo intitulado (título) à Revista Brasileira de Ciências da Saúde - RBCS. Declaro(amos) ainda que o trabalho é original e que não está sendo considerado para publicação em outra revista, quer seja no formato impresso ou no eletrônico. Temos ciência de que a revista se reserva o direito de efetuar nos originais alterações de ordem normativa, ortográfica e gramatical com vistas a manter o padrão culto da língua, respeitando, contudo, o estilo dos autores e que os originais não serão devolvidos aos autores. (Completar com a Declaração de Ausência/Presença de Conflitos de Interesse)