

Tales Henrique Andrade da Mota



**Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero
relacionados ao prognóstico na Leucemia Linfóide Aguda B
(LLA-B) pediátrica**

Tese de doutorado apresentado como requisito parcial para a obtenção do título de doutor pelo programa de Ciências e Tecnologia da Saúde da Universidade de Brasília campus da Ceilândia.

Orientador: Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

BRASILIA

2023

Tales Henrique Andrade da Mota

**Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero relacionados ao prognóstico
na Leucemia Linfóide Aguda B (LLA-B) pediátrica**

Tese de doutorado apresentado como requisito
parcial para a obtenção do título de doutor pelo
programa de Ciências e Tecnologia da Saúde da
Universidade de Brasília campus da Ceilândia.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Diêgo Madureira de Oliveira

Membro 1

Prof. Dr. Rodrigo Haddad

Membro 2

Prof. Dr. Shélida Vasconcelos Braz

Membro 3

Prof. Dr. Jorge Vaz Pinto Neto;

Membro 4

Prof. Dr. Felipe Saldanha Araújo

Membro 5

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MM917e MOTA, TALES HENRIQUE ANDRADE Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero relacionados ao prognóstico na leucemia linfóide aguda B (LLA-B) pediátrica / TALES HENRIQUE ANDRADE MOTA; orientador Diêgo Oliveira. -- Brasília, 2023. 102 p.

Tese(Doutorado em Ciências e Tecnologias em Saúde) - Universidade de Brasília, 2023.

1. Telômero. 2. hTERT. 3. Leucemia aguda do tipo B . 4. recaída. I. Oliveira, Diêgo, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

A vida te mostra o maior pilar
O tempo dispõem da sabedoria
Para agradecer é preciso amar
Quem me deu a base foi a família

È comum se perder e sentir medo
Ser adulto é saber dizer e escutar o não
No doutorado precisei muito do Diêgo
Agradeço pela ajuda em toda reflexão

Na adolescência eu já havia esperança
De ser cientista e ir mais profundo
De realizar antigos sonhos meus

Hoje estou aqui pelo sonho de criança
Para mostrar minha tese ao mundo
E agradecendo tudo que a vida me deu

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que me ajudaram a evoluir como pessoa e pesquisador em especial a minha família que considero meu principal pilar.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	18
RELAÇÃO DE QUADROS.....	19
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	20
RELAÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	21
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
1.1 Leucemias linfoides	24
1.2 LLA na infância	24
1.2 Telômero.....	26
1.3 Telomerase.....	28
1.3.1 Função da Telomerase.....	28
1.3.2 Regulação da Telomerase.....	31
2. OBJETIVO GERAL	33
2.1 Objetivo específico	33
3. METODOLOGIA.....	34
3.1 Desenho do estudo	34
3.2 Pacientes, período de coleta, local de estudo e considerações éticas	35
3.3 Atividade realizada pelo aluno.....	35
3.3.1 Coletas de dados clínicos via prontuário	35
3.3.2 PCR em tempo real	37
3.4 Testes realizados de rotina pelo Hospital da Criança de Brasília	41
3.4.1 Amostras dos pacientes e fluxo do diagnóstico das neoplasias hematológicas	41
3.4.2 Seleção das células mononucleares com posterior extração de RNA seguida da confeção de DNA complementar (cDNA).....	42
3.4.3 PCR convencional.....	42
3.4.4 Citometria de fluxo	47
3.4.5 Cariotipagem.....	49
3.4.5.1 banda G	49
3.4.5.2 Coloração das lâminas.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1 Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes.....	51
4.2 Relação da expressão do gene <i>hTERT</i> com as variáveis estudadas	54

4.3 Associação de genes relacionados a resistência com a expressão de <i>hTERT</i> em LLA-B	62
4.4 Atividade <i>in vitro</i> da telomerase na resposta de linhagens leucêmicas a quimioterápicos	63
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO	82
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	83
8. Anexos	96
8.1 Artigo científico relacionado a tese	96
Anexo 1	97
8.2 Artigo científico relacionado a tese	98
Anexo 2	99
8.3 Anexo 3 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO	100
8.4 Anexo 4 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO	101
8.5 Anexo 5 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO	102

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Reagente para a PCR em tempo real. _____	37
Tabela 2. Reagentes e suas respectivas concentrações para a PCR convencional. _____	42
Tabela 3. Primers utilizado no estudo, tanto para a PCR convencional quanto para a PCR em tempo real. Acompanhados das respectivas temperaturas de anelamento após a padronização. _____	44
Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados pelo HCB contendo: o tipo do anticorpo, empresa de aquisição, fluorocromo e o título sugerido para uso. _____	48
Tabela 5. Características demográficas e laboratoriais das crianças com leucemia linfóide aguda B atendidas no Hospital da Criança de Brasília. _____	52
Tabela 6. IC50% e R ² de doxorrubina e metotrexato quando combinados com MST-312 nas linhagens de LLA-B (NALM-6, 697, Reh e RS4;11). _____	68
Tabela 7. Redução da expressão de <i>hTERT</i> via siRNA para as diferentes linhagens leucêmicas quando tratadas com DOXO. O teste realizado foi o “multiple t test unpaired” com p<0,05. _____	69

RELAÇÃO DE QUADROS

Quadro 1. Estratificação de risco individualizado para cada variável clínica utilizadas nesse estudo. _____	36
Quadro 2. Triagem das leucemias agudas conforme o protocolo do HCB. _____	47
Quadro 3. Painel estendido com a finalidade de identificar e classificar as LLA-B com base no protocolo utilizado pelo HCB. _____	47
Quadro 4. Painel para a marcação das DRMs nos dias de 15, 33 e 78 dias com base na fase de indução da quimioterapia. Painel utilizado pelo HCB com base no estudo de THEUNISSEN et al. (2017). _____	48

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do tamanho do telômero e sua reprogramação no desenvolvimento de mamíferos. _____	26
Figura 2. D-loop e T-loop na estrutura telomérica. _____	27
Figura 3. Estrutura esquemática da telomerase. _____	29
Figura 4. Modelo da regulação dos telômeros nas células B. _____	30
Figura 5. Fluxograma do desenho metodológico empregado no estudo. _____	34
Figura 6. Curva de melting dos primers. _____	38
Figura 7. Fluxo utilizado pelo protocolo de transfecção. _____	40
Figura 8. Fluxograma do diagnóstico da LLA-B utilizado pelo Hospital da Criança de Brasília. _____	41
Figura 9. Fluxo de análise das principais translocações. _____	43
Figura 10. Histograma para a demonstração da expressão relativa de <i>hTERT</i> nos pacientes com LLA-B. _____	54
Figura 11. Associações e correlações que associam idade com a expressão relativa de <i>hTERT</i> . _____	55
Figura 12. Gráfico scatter plot em que foi realizada a associação das aneuploidias quanto a expressão relativa de <i>hTERT</i> . _____	56
Figura 13. Gráfico de violino em que foi feita a associação da classificação de risco quanto a infiltração do sistema nervoso central por LLA-B com a expressão relativa de <i>hTERT</i> . _____	57
Figura 14. Gráficos de violino em que foram realizadas as associações entre a expressão relativa de <i>hTERT</i> com as DRMs. _____	57
Figura 15. Gráfico de violino em que foi feita as associações da expressão de <i>hTERT</i> e a classificação de risco final atribuída aos pacientes com LLA-B pela equipe médica do HCB. _____	58
Figura 16. Gráfico de violino em que foi realizada a associação da evolução clínica com a expressão relativa de <i>hTERT</i> . _____	59
Figura 17. Gráfico de violino em que foi feita a relação do tempo de acompanhamento com a evolução clínica. _____	60
Figura 18 Associação do <i>hTERT</i> com as diferentes translocações envolvidas na formação da LLA-B. _____	61
Figura 19. Correlação de <i>BIRC 5</i> e <i>cFLIP</i> com a expressão de <i>hTERT</i> . _____	62
Figura 20. Gráfico de violino em que foi realizada a associação da expressão dos genes de resistência, <i>cFLIP</i> e <i>BIRC5</i> , com a evolução clínica. _____	63
Figura 21. Teste de viabilidade celular nas linhagens de NALM-6, Reh, RS4:11 e 697 nos tempos de 24, 48 e 72 horas com o MST-312. _____	64
Figura 22. Teste de viabilidade celular nas linhagens de NALM-6, Reh, RS4:11 e 697 no tempo de 72 horas. _____	65
Figura 23. Teste de viabilidade celular em terapia combinada de MST-312 com doxorrubina e metotrexato. _____	67
Figura 24. Transfecção com siRNA para knockdown de <i>hTERT</i> com posterior teste de viabilidade celular utilizando doxorrubicina e metotrexato. _____	71

RELAÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

B-ALL= Acute lymphoblastic leukemia B

CD = Cluster de diferenciação

cDNA= Acido desoxirribonucleico complementar

Células NK= Linfócitos T natural killer

D15, D33 e D78 = Doença residual mínima de 15, 33 e 78 dias respectivamente.

DNA= Acido desoxirribonucleico

DOXO= Doxorrubicina

DRM = Doença residual mínima

HCB = Hospital da criança de Brasília

IC50% = Concentração inibitória de 50%

LLA = Leucemia linfoide aguda

LLA-B = Leucemia linfoide aguda B

LLC = Leucemia linfocítica crônica

M/F= Pacientes do sexo masculino e feminino.

MO= Medula óssea

MST-312 = N,N'-1,3-phenylenebis[2,3-dihydroxy-benzamide

MTX= Metotrexato

PCR= Reação da cadeia da polimerase

RNA = Acido ribonucleico

SNC= Sistema nervoso central

TCLE = Termo de consentimento livre esclarecido

TERC = Molde de RNA utilizado como template pela telomerase.

TERT= Parte catalítica da telomerase

RESUMO

A leucemia linfóide aguda (LLA) é um dos tipos de câncer mais prevalentes em crianças, representando mais de 20% das neoplasias pediátricas. A maioria dos casos de LLA derivada de células B (LLA-B) ocorre em pacientes com menos de 18 anos de idade. Essa doença está relacionada a diferentes perfis genotípicos. A telomerase e os telômeros estão associados a alterações genéticas e crescimento celular, o que os tornam alvos atrativos para estudo de novas abordagens terapêuticas em leucemia. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar o papel prognóstico de marcadores moleculares associados aos telômeros e à telomerase, especialmente seu potencial como indicador de resposta terapêutica em LLA infantil, e estudar o potencial da telomerase como alvo farmacológico em leucemia. A análise dos 79 casos de pacientes infantis com LLA-B mostrou que a expressão de telomerase tem associação com diferentes variáveis, tais como idade e doença residual mínima de 78 dias após o início do tratamento. Ademais, a análise dos dados demonstrou associações complementares que indicam papel da telomerase na propensão à recaída nos pacientes do estudo. Esse relevante achado permitiu levantar a hipótese de que a expressão aumentada do gene hTERT (codificante da unidade catalítica da telomerase) poderia estar associada à resistência à quimioterapia, o que foi abordado em experimentos *in vitro*. Nesse caso, 3 de 4 linhagens celulares utilizadas (NALM-6, 697 E RS4;11), após transfecção para subexpressar a telomerase, apresentaram maior sensibilidade a doxorubicina, droga presente no esquema terapêutico de todos os pacientes. Tal achado reforça a hipótese de que a alta expressão da telomerase influencia de algum modo no tratamento do paciente, aumentando as chances de recidiva. Portanto, a expressão de telomerase se mostrou um possível biomarcador clinicamente útil. Por fim, os resultados também apontam para o possível benefício da associação de inibidores da telomerase na terapia de pacientes pediátricos com LLA-B.

Palavras chaves: Telômero, hTERT, Leucemia aguda do tipo B e recaída.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood malignancy, representing more than 20% of pediatric cancers. ALL derived from B-cells (B-ALL) typify the majority of cases in patients under 18 years old that are related with different genetic profiles. Telomeres and telomerase are associated with genetic modifications and cell proliferation which makes them attractive targets for studies in leukemia. In this sense the aim of this work was determine the role of molecular markers associated with telomeres and telomerase, especially their potential as an indicator of therapeutic response in childhood ALL and set up the potential of telomerase as a pharmacological target in B-ALL. Analyzing 79 cases of childhood B-ALL we identified that high telomerase expression was associated with several markers such as age, and, minimum residual disease (MRD) of 78 days and relapse. In this sense these associations are complementary for establish the role of telomerase on patient relapse. From these data, we hypothesized that high telomerase expression could be related to drug resistance. In a vitro approach, 3 of 4 lineages (NALM-6, 697, RS4;11), after transfection to show downregulation of telomerase, had increased sensitivity to doxorubicin, what fortify the hypothesis that the high expression of telomerase influences the patient treatment, increasing chance to relapse. Therefore telomerase represents a promising pharmacological target as well as combined therapy with telomerase inhibitors may be an alternative strategy for B-ALL.

Keywords: Telomere, hTERT, B Acute lymphoblastic leukemia and relapse

1. INTRODUÇÃO

1.1 Leucemias linfoides

A leucemia é uma doença heterogênea que é causada pela disfunção do tecido sanguíneo, levando a uma proliferação clonal desordenada das células hematopoéticas de origem linfóide ou mieloide. A classificação distingue as doenças de acordo com a linhagem celular (mieloide ou linfóide) e com o grau de maturação das células clonais que se acumulam (aguda ou crônica) (1,2). A fisiopatologia da leucemia decorre do produto de duas ou mais alterações genéticas que ocorrem nas células tronco hematopoéticas, as quais passam a ter uma elevada taxa de proliferação e perdem a sua capacidade de chegar na forma madura. Como efeito disso, há acúmulo de células imaturas no sangue periférico e na medula óssea resultando na falta de produção de células maduras: hemácias, leucócitos e plaquetas (3,4).

Os blastos, que são células imaturas e disfuncionais, geralmente compõem até 5% da medula óssea. No entanto, nas leucemias agudas, essas células estão presentes em um percentual maior que 20%, o que pode levar a uma rápida manifestação de sintomas. Por outro lado, nas leucemias crônicas, a presença de blastos é inferior a 20%, com maior predominância de células maduras. Isso geralmente resulta em um início mais lento dos sintomas (5).

Quanto às leucemias linfoides, a leucemia linfocítica crônica (LLC) ocorre pela proliferação de linfócitos B monoclonais maduros, principalmente em pessoas entre 60 e 70 anos de idade, por vezes apresentando quadro assintomático em que o tratamento se inicia depois das primeiras manifestações clínicas. De outra via, existe a leucemia linfoblástica aguda (LLA) em que há a rápida produção de blastos tanto em células T quanto em B. Essa é a leucemia mais comum em crianças e o tratamento apresenta elevados índices de eficácia, implicando em uma sobrevida que chega a 90%, considerando a amplitude de 5 anos (5,6).

Nos Estados Unidos da América, a LLA ocorre em 2,1 de cada 100 mil habitantes. Já no Brasil, essa incidência é de 5,15 por 100 mil habitantes, sendo a prevalência maior em pacientes com menos de 18 anos de idade (5,7).

1.2 LLA na infância

A incidência da LLA é maior em crianças de 2 até 5 anos de idade e reduz em pacientes no final da infância e início da idade adulta, voltando a aumentar depois dos 50 anos de idade. Diversos fatores prognósticos têm sido relacionados às LLA-B: a idade ao diagnóstico, por exemplo, está diretamente relacionada à sobrevida dos pacientes, sendo aqueles menores de um

ano considerados de elevado risco para tratamento. Outros que podem ser citados são: doença residual mínima com elevada quantidade de blastos clonais, infiltração do sistema nervoso central ou dos testículos, translocações gênicas, entre outros (8).

As células clonais possuem a capacidade de “se proteger” do sistema imunológico, e já foi visto que os linfócitos T *natural killers* as auxiliam a escapar do processo de reconhecimento, efeito chamando de “*immunosurveillance*”. Nesse sentido as células cancerosas podem evitar o reconhecimento, e posterior eliminação pelo sistema imune, pela perda do MHC de classe I e consequente não reconhecimento das células clonais pelos linfócitos T citotóxicos. Esse mecanismo de escape, todavia, não foi totalmente elucidado, mas já foi visto que pacientes com células neoplásicas bem adaptadas ao sistema imunológico apresentam baixa resposta ao tratamento e maior chance de recair (9,10).

As LLA-B são diagnosticadas quando uma quantidade dominante de blastos clonais mostra forte expressão de pelo menos 2 dos seguintes antígenos: CD19, CD10, CD22 intracelular ou CD79a intracelular. Contudo, vale ressaltar que esses marcadores devem ser utilizados com o devido cuidado, dado que nenhum deles é absoluto para a classificação da linhagem e do estágio de maturação. Quando identificadas, as leucemias agudas do tipo B podem ser divididas em pro B, comum, pré B e B madura. Sua diferenciação se dá pela expressão de CD10, iIgM e λ (11). Ademais, a classificação também pode ser baseada nos genótipos característicos da doença (12).

À citogenética, a LLA-B pode ter grupos com cariótipo normal, pseudodiploide (em que acontece as translocações), grupo hiperdiploide do tipo 1, no qual o número de cromossomos varia de 47-50, alta hiperdiploidia, em que a quantidade de cromossomos é maior que 50, hipodiploide, em que o total de cromossomos é menor que 46 e, por fim, o grupo chamado de “*near-haploide*” em que a variação no número de cromossomos é de 24-31 (13–15).

Os subtipos genéticos apresentam incidência que mudam de acordo com a etnia e idade. Nas LLA-B infantis, as alterações mais prevalentes são: ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1, Ph-like, as translocações envolvendo o KMT2A (MLL) e algumas alterações presentes em distintas leucemias como aquelas do gene DUX4, IKZF1 e PAX5(16).

A LLA-B apresenta elevada taxa de sobrevida, com remissão da doença ocorrendo na maioria dos pacientes, contudo, a recidiva da doença (recaída) continua sendo a causa principal de óbito. Além disso, estudos genômicos em crianças com LLA-B mostraram que durante a

recaída podem surgir clones minoritários, os quais já adquiriram alterações genômicas que conferem resistência ao tratamento (17–21).

1.2 Telômero

Os telômeros são fragmentos de DNA compostos por sequências repetitivas (TTAGGG) com papel crucial na manutenção dos cromossomos e na via de sinalização da senescência (22).

No desenvolvimento embrionário, ainda na fase de zigoto, o telômero cresce de forma exponencial até a fase de embrião. Na forma de blastocisto, o telômero mantém tamanho quase constante a fim de desempenhar suas funções de proteção, evitando a perda de material genético codificante pela redução das fitas de DNA a cada divisão celular, realizando, assim, expressivo no desenvolvimento do organismo e no envelhecimento (figura 1). A estrutura telomérica é reconhecida como um atrativo biomarcador utilizado para rastrear mudanças relacionadas com o envelhecimento humano, bem como na progressão de patologias (23,24). Nesse sentido, a redução do tamanho do telômero funciona como marcador de doenças relacionadas com a maior idade (25,26).

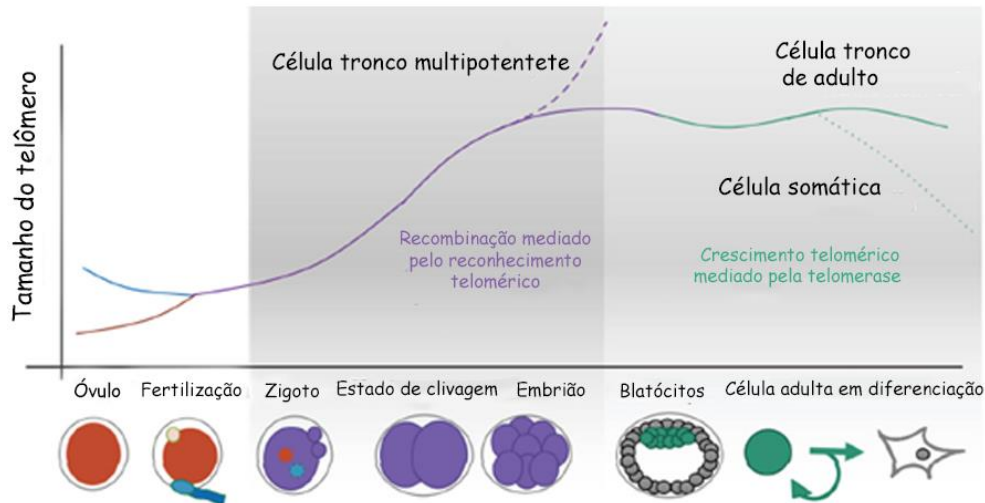


Figura 1. Esquema do tamanho do telômero e sua reprogramação no desenvolvimento de mamíferos. Figura e legenda adaptadas de KALMBACH et al, (2014).

A estrutura telomérica é formada por um *loop* no final do cromossomo juntamente com a produção de RNA rico em guanina resultante da sua transcrição. A junção do *loop* com essa fita forma uma estrutura denominada “*G overhang*”, a qual se molda resultando nas estruturas de fita dupla conhecidas como *T-loop* e *D-loop* (figura 2), que são relevantes para a proteção

contra degradações prematuras do material genético, uma vez a célula possui proteínas especializadas em reconhecer e destruir estruturas de fita simples (27).

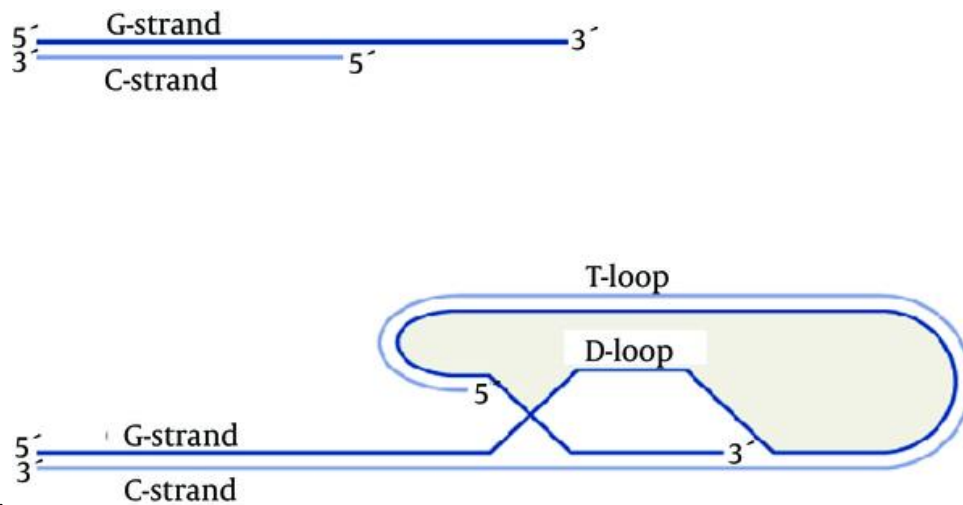


Figura 2. *D-loop* e *T-loop* na estrutura telomérica. Figura e legenda adaptada de Eskandari-Nasab et al, (2015).

A formação da estrutura telomérica de fita dupla tem características análogas à heterocromatina, o que gera a possibilidade de sua transcrição resultando na longa porção de RNA não codificante, denominada de TERRA. Tais moléculas desempenham papel chave na regulação dos telômeros, na atividade da telomerase e na formação de heterocromatina na porção final do DNA (28). A função clássica que permitiu a descrição dos telômeros, contudo, refere-se à incapacidade da DNA polimerase de completar a replicação da parte final da porção 3' do DNA, resultando no encurtamento das fitas de 50 a 200 pares de bases a cada ciclo celular. Isso gera o denominado “*end replication problem*” (problema de replicação do fim), uma vez que na ausência de telômeros funcionais, a célula fica inabilitada a se dividir, sob pena de perder porções importantes do DNA ou se sujeitar a ciclos de fusões cromossômicas, resultando na formação de proteínas aberrantes (28).

Também já foi descrito na literatura que os telômeros podem sofrer danos oxidativos levando a célula à senescência. Considerando esse fato, foi possível associar o encurtamento do telômero, e conseqüente redução do potencial proliferativo da célula, à parada do ciclo celular (29,30). Por outro lado, os telômeros podem ter seu tamanho aumentado em algumas células, como as germinativas e algumas do sistema imunológico, que requerem elevadas taxas de replicação para exercer suas funções orgânicas. Ademais, em algumas células tronco da medula óssea a telomerase pode estar ativa, de modo controlado, para que durante a proliferação não haja problemas advindos do encurtamento do telômero (22,31).

O cuidado com a saúde também pode afetar o tamanho dos telômeros, a exposição de adultos a fatores ambientais como as infecções, estresse, atividade física e nutrição está intimamente ligada ao tamanho do telômero e a velocidade que esse pode encurtar (31–34). Nessa perspectiva, a exposição ao estresse pode ocorrer nas fases de desenvolvimento pré e pós natal, a qual promove o encurtamento dessas estruturas por acionamento de vias de sinalização específicas, gerando a senescência celular e levando o organismo ao rápido envelhecimento. O encurtamento, ou erosão telomérica, também está implicado em outras patologias relacionadas com a idade, tais como problemas cardíacos e diabetes (35–37), além de aterosclerose, condições associadas ao aumento da proliferação celular, como o câncer, e até maior mortalidade por covid-19 (38,39).

Com base no exposto, os telômeros podem ser o fator chave no entendimento do envelhecimento, assim como de doenças relacionadas ao seu funcionamento (40). Além disso, seu papel em diversos cânceres é extremamente importante, tanto para seu desenvolvimento, quanto para sua proliferação e manutenção, sendo o entendimento dessa estrutura imprescindível para elucidar detalhes da carcinogênese.

De fato, uma etapa crucial na evolução de qualquer neoplasia para um estágio clinicamente detectável é a “imortalização celular”, como é chamado o fenômeno de manutenção do comprimento dos telômeros de células tumorais (41). Como se tratam de doenças proliferativas, nesses casos as células precisam evitar o *end replication problem*, o que é feito, em cerca de 85% dos casos, pela expressão de uma enzima capaz de catalisar a síntese de telômeros, um antígeno onco-fetal de nome telomerase (42).

1.3 Telomerase

1.3.1 Função da Telomerase

Os telômeros são mantidos em comprimento compatível com a proliferação celular pela enzima telomerase, a qual apresenta dois domínios: o denominado TERT, responsável pela parte catalítica da enzima, e o TERC que é um componente de RNA que serve de *template* (molde) para o alongamento telomérico (figura 3) (43).

Nos humanos, a telomerase é expressa nas primeiras fases da embriogênese e em grande parte das células a expressão vai reduzindo com o passar do tempo (44). Todavia, alguns tecidos podem manter a telomerase ativa por mais tempo, a exemplo das células germinativas, dos blastos, e células com alta capacidade de diferenciação, como os linfócitos e as células tronco pluripotentes (45). Contudo, mesmo nessas células essa enzima não é capaz de manter o

alongamento telomérico durante todo o ciclo de vida, o que faz com que, mesmo nelas, haja o processo de redução gradual dos telômeros (46).

A telomerase, por funcionar como uma transcriptase reversa, é capaz de sintetizar as sequências teloméricas e evitar o problema do encurtamento dos telômeros. Como resultado, ao exercer sua função canônica (manutenção do tamanho dos telômeros), a telomerase proporciona estabilidade genômica, viabilizando a proliferação contínua(47).

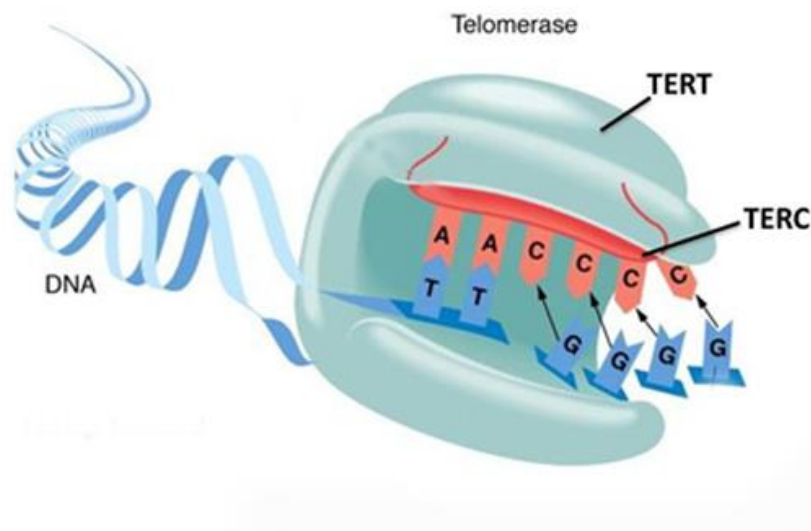


Figura 3. Estrutura esquemática da telomerase. Figura adaptada de Zhang et al., (2011).

A atividade da telomerase e a regulação do telômero são fatores chaves envolvidos na carcinogênese e na manutenção das células cancerosas. Durante a divisão celular alguns eventos podem levar as células a inativar proteínas reguladoras da manutenção da integridade de DNA e do ciclo celular, como a P53 e a proteína de retinoblastoma (Rb), o que permite que a redução telomérica resulte em crise. Durante esse evento ocorre quebra de DNA e instabilidade genômica ocasionando elevada morte celular. Esse contexto acaba por selecionar as poucas células sobreviventes que desreprimem a expressão do gene da telomerase (*hTERT*) para realizar a manutenção do seu material genético e estabilizar os danos teloméricos (45,47,48).

A telomerase é a enzima responsável pela manutenção dos telômeros na maioria dos diferentes tipos de cânceres, sendo sua ativação frequentemente o último passo no processo de imortalização celular e na transformação tumorigênica. Isso sugere que a telomerase confere uma forte vantagem seletiva para contribuir com o crescimento de células malignas. Além disso, a expressão e a função do gene *hTERT* se mostra indispensável, em grande parte dos casos, para a manutenção da proliferação celular (46).

Além do exposto, recentemente foram descritas diversas funções não canônicas para a telomerase, como a proteção de DNA não telomérico contra danos, promoção de crescimento, da proliferação, alteração no ciclo celular e proteção dos danos à integridade do DNA mitocondrial devido ao estresse oxidativo (49). Todas essas ações contribuem, de alguma forma, para a manutenção dos tumores, o que aumenta a relevância dessa enzima no processo carcinogênico.

Nas células B *naive*, de memória e nos centros germinativos, a telomerase está ativa e associada a elevados índices de atividade, sendo o centro germinativo o que apresenta a maior atividade da telomerase e as células com o maior tamanho de telômero (figura 4).

A expressão da telomerase nos centros germinativos ocorre principalmente durante a resposta imunológica, após a estimulação de anti-IgM juntamente com as interleucinas: IL2, IL4 e IL13, bem como as moléculas de superfície BCR e CD40. Além disso, independentemente da proliferação e estimulação, a expressão basal de *hTERT* nos linfócitos B é maior do que nas outras células. Portanto, a relação entre a telomerase e a proliferação nos linfócitos B, juntamente com seu papel anti-apoptótico, atribui a essa enzima um papel significativo na resposta imunológica. (48).

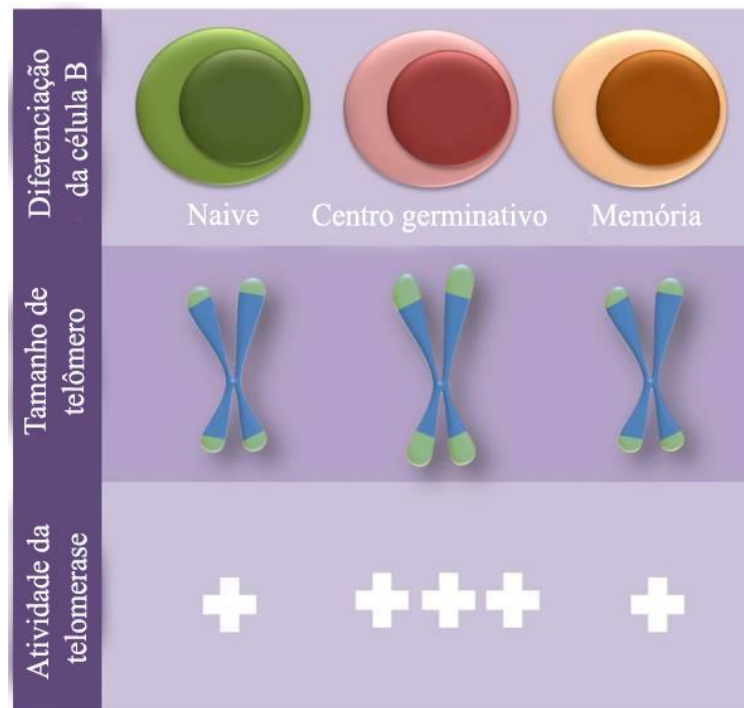


Figura 4. Modelo da regulação dos telômeros nas células B. Figura adaptada de da Mota et al., (2023).

1.3.2 Regulação da Telomerase

A ativação e a regulação da transcrição de *hTERT* são pontos-chaves para entender melhor seu funcionamento. Seu controle está relacionado a múltiplos fatores os quais envolvem *loops de feedback*, controles genéticos e epigenéticos.

Entre os fatores reguladores da transcrição têm-se o c-MYC, o NF- κ B, as proteínas STAT, as da família PAX, Mad1, SP3 entre outros. O c-Myc, juntamente com outras proteínas, se liga a estruturas denominadas de “*E-boxes*” as quais recrutam acetiltransferases de histonas, o que promove a ativação de diferentes genes, entre eles o *hTERT*. Já nos linfócitos T, a proteína quinase C ativa o NF- κ B, que aumenta a ligação do promotor de *hTERT* com c-Myc promovendo a maior ativação da telomerase (50).

O NF- κ B é um fator de transcrição com complexidade elevada que está envolvido em diferentes cascatas de sinalização relacionadas com a inflamação, diferenciação celular, tumorigênese e apoptose. Esse complexo proteico é um dos fatores de transcrição do gene *hTERT*. Por outro lado, uma das funções não canônicas da telomerase é promover alça de retroalimentação induzindo aumento da expressão de NF- κ B, que, por sua vez, Ademais regula também a expressão de proteínas envolvidas na via da apoptose e na senescência como o cFLIP, a survivina, o c-Myc e a P53 (51,52).

As proteínas da classe STAT então relacionadas ao *hTERT* em diversos cânceres, como os tumores gástricos, de mama e glioblastoma, sendo uma peça-chave para a manutenção desses tumores. Foi evidenciado que a STAT3 se liga ao CD44 e ao NF- κ B para a regulação da expressão da telomerase, a STAT5, quando está fosforilada, interage com a proteína JAK regulando a expressão de *hTERT*. Outra relação na regulação da telomerase, pela influência das proteínas STAT, é a formação do complexo proteico JAK2/STAT5/c-Myc que por meio da eritropoetina ativa a transcrição de *hTERT* (52–54).

As proteínas da família PAX se ligam a regiões proximais do gene do *hTERT* e posteriormente ativam sua transcrição. A PAX5 se liga a dois sítios distintos com a ação de controlar a transcrição da telomerase, já o PAX8 se liga à 4 sítios *upstreams* com o mesmo fim. Também já foi relatado que o PAX 8 pode interagir diretamente com a porção TERC da telomerase (55).

A Mad1 é um antagonista da proteína Myc que concorre pelo mesmo sítio de ligação, mas com a ação de reprimir a expressão gênica. Essa se liga a regiões promotoras do *hTERT* mediadas por um domínio N terminal responsável por interações com outras proteínas

repressoras, como o Sin3A, que impede a atividade do c-Myc. O SP3 é um antagonista de SP1, o qual está relacionado com a remodelação da cromatina. Sua interação com a telomerase se dá através do recrutamento da HDAC1, que promove alterações epigenéticas que resultam no silenciamento do *hTERT* (56).

Na LLA, tanto a alta atividade da telomerase, quanto os telômeros curtos estão associados a progressão da doença, resistência a quimioterapia e prognóstico ruim (57). Nesse sentido a telomerase nos blastos leucêmicos também pode bloquear a apoptose, o que resulta em progressão rápida da doença. Além disso, em outro estudo a metilação de *hTERT* já foi indicada como possível indicador de bom prognóstico em pacientes menores de 18 anos de idade com LLA-B (29,58).

Dado sua relevância, a telomerase vem sendo alvo de estudos no campo da oncologia experimental, seja para ampliar o entendimento da biologia tumoral, seja para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos. A principal razão desse interesse é o fato desse ser um alvo pan-tumoral e, principalmente, relativamente específico, já que a maioria das células somáticas normais não expressam telomerase. Como os linfócitos representam exceção a essa regra, até pouco tempo a implicação dessa enzima em leucemias era negligenciada, mas com a descrição das funções não canônicas da telomerase, mais pesquisadores passaram a se debruçar sobre o tema. Os estudos recentes mostraram a expressão da telomerase está relacionada com a formação das leucemias (29,45,46,58–60), e que a telomerase pode ser utilizada como alvo para tratamento de leucemia linfóide aguda B *in vitro*, contudo, a literatura ainda é pobre em informações sobre sua real relevância para essa doença, assim como a utilidade clínica da expressão do hTERT como marcador diagnóstico ou prognóstico em LLA-B.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar o papel prognóstico da expressão do gene *hTERT*, e marcadores moleculares associados à telomerase, na LLA-B, bem como estudar o potencial da telomerase como alvo farmacológico nessa doença.

2.1 Objetivo específico

- Avaliar a possível correlação entre expressão de *hTERT* (no momento do diagnóstico) nas células leucêmicas de pacientes pediátricos com LLA-B e as variáveis clínicas disponíveis ou marcadores moleculares já classicamente utilizados;
- Investigar a influência do nível de expressão da telomerase na resposta à quimioterapia convencional em LLA-B;
- No caso de correlação estatisticamente significativa, levantar e testar hipóteses sobre a explicação biológica.
- Avaliar, *in vitro*, o potencial terapêutico do inibidor de telomerase MST-312 como agente adjuvante.

3. METODOLOGIA

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de estudo misto (retrospectivo e prospectivo), observacional (sem intervenção), que inclui acesso a informações médicas e material biológico de pacientes pediátricos do Hospital da Criança de Brasília (HCB) com diagnóstico de LLA-B. As amostras utilizadas no estudo são alíquotas remanescentes do material empregado no diagnóstico do paciente, assim como em testes para o monitoramento de resposta ao longo do tratamento (figura 5).

Os experimentos envolvendo as amostras dos pacientes foram realizados exclusivamente nas dependências do próprio HCB.

Na Universidade de Brasília foi conduzida a cultura de células nas linhagens de LLA-B (NALM-6, Reh, 697 e RS4:11). Nessas células, foram realizadas o teste de transfecção com o RNA de interferência (siRNA) para a inibição de *hTERT*. Posteriormente foram feitos testes de viabilidade celular utilizando o Cell Titer Blue em monoterapia (doxorubicina, MST-312 e metotrexato) e em terapia combinada (doxorubicina + MST-312 e metotrexato + MST-312). realizadas etapas do estudo estão esquematizadas na figura 5, e os experimentos detalhados nos tópicos seguintes.

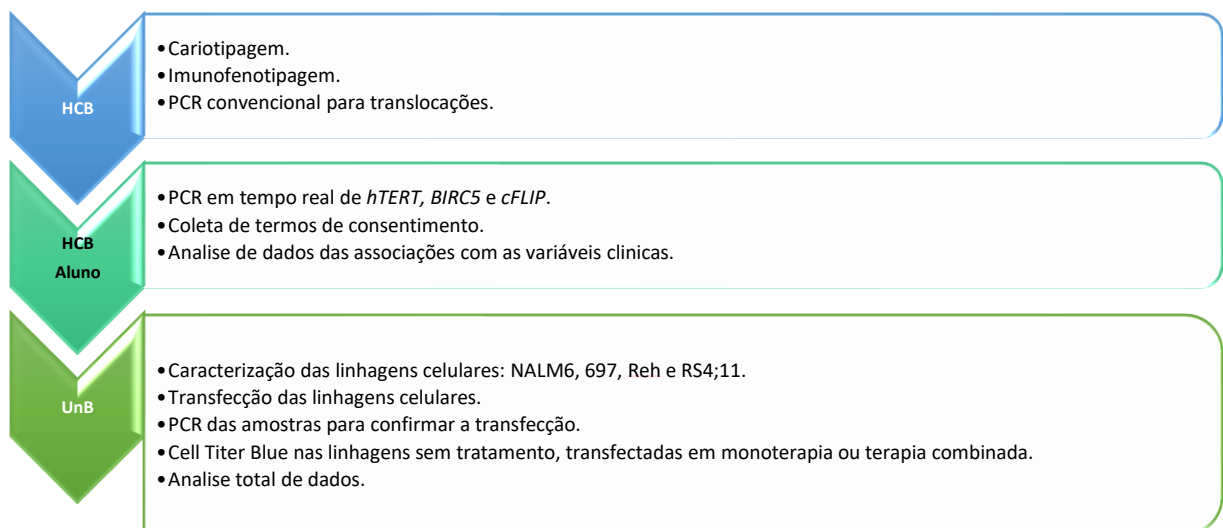


Figura 5. Fluxograma do desenho metodológico empregado no estudo. Inicialmente, no Hospital da Criança de Brasília (HCB), foram realizados procedimentos de cariotipagem, imunofenotipagem e identificação das principais translocações associadas à formação de leucemias, para fins de diagnóstico independentes desta pesquisa. O aluno envolvido neste estudo teve acesso aos dados dos prontuários dos pacientes, após a obtenção dos termos de consentimento livre e esclarecido. Além disso, nessa instituição, foi conduzida a reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) para amplificação dos genes *hTERT*, *BIRC5* e *cFLIP*. Após a conclusão dessa etapa no HCB, o aluno prosseguiu para a Universidade de Brasília, onde trabalhou com as culturas celulares das linhagens de leucemia linfoblástica aguda B (LLA-B) NALM-6, 697, Reh e RS4;11 nas quais foi realizada a

transfecção para inibição do *hTERT* com confirmação posterior por PCR em tempo real. Além disso, foram realizados testes utilizando o ensaio Cell Titer Blue, tanto em monoterapia (utilizando doxorubicina, MST-312 e metotrexato) quanto em terapia combinada (doxorubicina + MST-312 e metotrexato + MST-312).

3.2 Pacientes, período de coleta, local de estudo e considerações éticas

No estudo, foram incluídas amostras de aspirado de medula óssea (BM) de 79 pacientes com leucemia linfoblástica aguda B. A inclusão dos pacientes ocorreu após a aprovação do comitê de ética (24841219.4.0000.8093) e a obtenção dos respectivos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLEs) dos participantes, conforme descritos nos Anexos 3-5 do estudo. Todos os pacientes selecionados apresentavam leucemia linfoblástica aguda B e foram diagnosticados ou estavam em tratamento durante o período de 07/2019 a 09/2021. Vale ressaltar que os participantes desse estudo eram exclusivamente crianças e adolescentes com idades compreendidas entre 0 e 17 anos.

3.3 Atividade realizada pelo aluno

3.3.1 Coletas de dados clínicos via prontuário

As informações clínicas de idade, raça, leucometria ao diagnóstico, sexo, evolução clínica, esquema terapêutico e estratificação de risco final foram obtidas por meio do prontuário eletrônico do paciente. Dados biológicos (classificação imunofenotípica, avaliação das principais translocações cromossômicas, aneuploidia e resposta da medula durante o tratamento quimioterápico) foram obtidos através dos testes laboratoriais do Laboratório de Pesquisa Translacional do HCB. O conjunto dessas informações foi armazenado em um banco de dados, sempre respeitando o sigilo do acesso à informação dos pacientes.

A estratificação de risco utilizada nesse trabalho se baseou nos padrões adotados pelo Instituto Nacional do Câncer e referenciados em diversos estudos (14,61,62). Os pacientes com LLA-B foram estratificados em determinados grupos de risco de acordo com o quadro 1. No que se refere aos dados de estratificação, a equipe médica foi responsável por determinar a classificação de risco final de cada paciente, com o objetivo de direcionar o tratamento de acordo com o protocolo estabelecido pelo BFM 2009 (63). A classificação de risco é baseada em uma análise abrangente dos dados clínicos, laboratoriais e de exames específicos de cada paciente. Essa estratificação é fundamental para garantir que cada paciente receba o tratamento mais adequado, levando em consideração o seu perfil de risco específico.

Os valores de doença residual mínima (DRM) desempenham um papel significativo na determinação do risco final. Elas são avaliadas em diferentes momentos, geralmente aos 15, 33

e 78 dias após o início do tratamento. Com o passar do tempo, espera-se que haja uma redução na presença de blastos clonais, o que é indicativo de uma melhor resposta ao tratamento.

Para a estratificação de risco, são utilizados limiares específicos de porcentagem de blastos clonais. Valores acima de 5% no dia 15 e acima de 0,01% no dia 78 são considerados de alto risco, indicando uma maior carga residual da doença. Por outro lado, valores inferiores a 1% no dia 15 e inferiores a 0,01% no dia 78 são considerados de baixo risco, sugerindo uma resposta mais favorável ao tratamento e uma menor carga residual da doença.

Portanto, a análise da DRM ao longo do tempo é fundamental para a estratificação de risco e auxilia na determinação do plano de tratamento mais adequado para cada paciente.

A infiltração no sistema nervoso central (SNC) é considerada um fator de risco por si só, uma vez que não é esperado que células clonais migrem para essa região. Portanto, valores acima de zero são considerados de alto risco, indicando a presença de células leucêmicas no SNC. Por outro lado, valores iguais a zero são considerados de baixo risco, indicando a ausência de células clonais no SNC. Essa avaliação do risco baseada nos valores de infiltração no SNC é importante para determinar o plano de tratamento adequado para cada paciente (Quadro 1).

Quadro 1. Estratificação de risco individualizado para cada variável clínica utilizadas nesse estudo.

Critério	Risco		
	Baixo	Intermediário	Alto
Leucometria inicial /μL			
Menor que 50000 (<50000)	+		
Maior que 50000 (>50000)			+
Tipo genotípico			
ETV6-RUNX1	+		
BCR-ABL			+
PH-LIKE			+
TCF3-PBX			+
KMT2A/MLLT3			+
DRM D15			
Menor que 1% (<1%)	+		
Entre 1% e 5%		+	
Maior que 5% (>5%)			+
DRM D33			
Menor que 0,1% (<0,1%)	+		
Entre 0,1% e 1%		+	
Maior que 1% (>1%)			+
DRM D78			
Menor que 0,01 (<0,01%)	+		

Maior que 0,01(>0,01%)			+
Infiltração do SNC			
Maior que 0 (>0)			+
Igual a 0	+		
Idade			
Menor que 1 ano			+
Entre 1 e 10 anos	+		
Maior que 10 anos			+

* DRM = Doença residual mínima * SNC= Sistema nervoso central.

3.3.2 PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada para identificar a expressão da *hTERT*, *BIRC5* e *cFLIP*. Nesse sentido, após a confecção do cDNA foi realizada a PCR com o kit *Power SYBR™ Green PCR Master Mix da ThermoFisher*, sendo seguido todas as instruções do fabricante. O volume final de reação foi de 10µl e o *input* de amostra foi de 1µl, as especificações estão na tabela 1.

Tabela 1. Reagente para a PCR em tempo real.

Reagente	[] Estoque	[] final	Vol. (µL)
H ₂ O	-	-	3,6
Power syber green master mix	2X	1X	5
Primer Foward	10 µM	0,2 µM	0,2
Primer Reverse	10 µM	0,2 µM	0,2
Amostra	-	-	1
Volume final			10

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata. A curva de *melting* foi incluída em todas as reações para monitoramento da amplificação (figura 6). Experimentos com especificidade duvidosa foram descartados. As condições de ciclagem da PCR em tempo real foram de 10 minutos a 94 graus, seguidos de 40 ciclos com 94 graus por 30 segundos, 60 graus por 20 segundos e 10 segundos a 72 graus, para a leitura dos primers *cFLIP*, *HPRT1* e *hTERT* (figura 6, imagens D A e C), 75 graus para a de *B2M* (figura 6, imagem B) e 80 graus para a do *BIRC5* (Figura 6, imagem E).

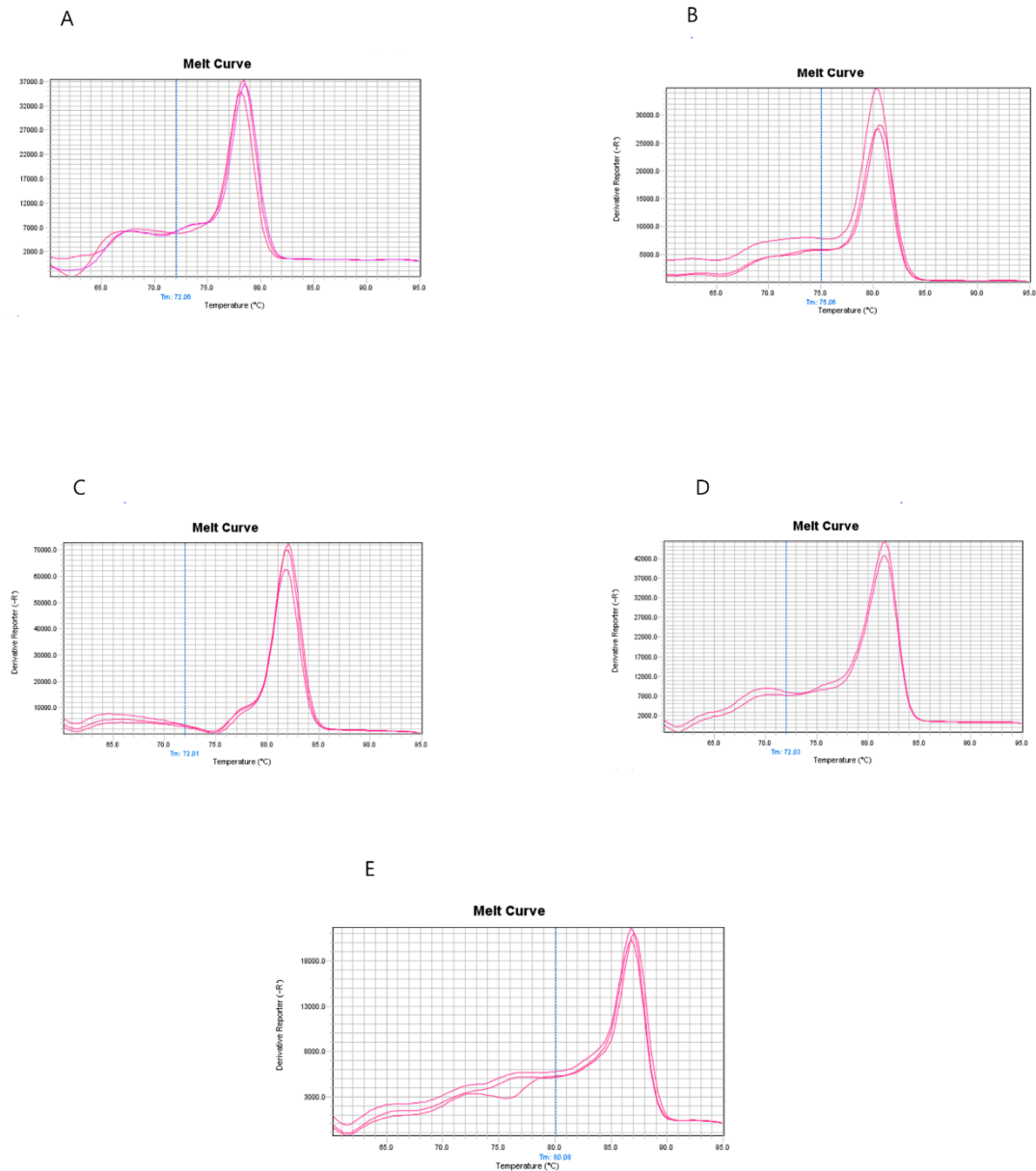


Figura 6. Curva de melting dos primers. A. Curva de melting do primer *HPRT1* com temperatura ótima de leitura de 72 graus. B. Curva de melting do primer de *B2M* com temperatura ótima de leitura de 75 graus. C. Curva de melting do primer de *hTERT* com temperatura ótima de leitura de 72 graus. D. Curva de melting do primer de *cFLIP* com temperatura ótima de leitura de 72 graus. E. Curva de melting do primer de *BIRC5* com temperatura ótima de leitura em 80 graus.

A análise de dados se deu pela quantificação relativa utilizando o método comparativo de *threshold* ($2^{\Delta\Delta Ct}$) com 2 genes endógenos, o *HPRT1* e o *B2M*. O parâmetro controle da expressão gênica para relativização dos dados foi a mediana dos valores dos *threshold* das amostras. A normalização da expressão gênica foi feita com ambos os endógenos.

3.3.3 Cultura de células e preparação de materiais

As Células de LLA-B - NALM-6, Reh, RS4:11 e 697- foram cultivadas no meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute- Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 10 U/ml de penicilina e estreptomicina. As células foram mantidas na estufa umidificada com CO₂ a 5% e temperatura de 37° C. O meio de cultivo foi trocado a cada 48 horas. Todos os compostos testados (MST-312, doxorrubicina e metrotrexato) foram primeiramente solubilizados em concentrações de estoque (em DMSO para o primeiro e água para os dois últimos) e posteriormente diluídas para a concentração de tratamento.

3.3.4 Análise de viabilidade celular

Para análise de viabilidade, as células foram distribuídas em uma placa de 96 poços, com 30 mil células por poço e submetidas aos tratamentos de interesse. O número total de amostras foi de 8 para cada concentração testada. Os quatro poços da primeira coluna foram utilizados como controle branco. Após o período de incubação de 24, 48 ou 72 horas, o meio de cultura foi substituído e o reagente Cell Titer Blue foi adicionado. As células foram então expostas ao composto por um período adicional de quatro horas, permitindo a redução do Resazurin para Resorufin. Para quantificação, a absorbância das amostras foi lida em um leitor de espectro, ELISA, nas faixas de 590nm e 570nm. Os resultados foram expressões em percentual em relação ao controle de células tratadas apenas com os respectivos diluentes das drogas, que ficou na mesma concentração em todos os poços.

3.3.5 Determinação de IC₅₀%.

Para o cálculo da estimativa do IC₅₀%, foi realizado o tratamento das culturas celulares com crescentes concentrações de MST-312, doxorrubicina e metrotrexato, bem como da combinação desses compostos, em placas de 96 poços utilizando o N amostral de 8 para cada concentração do composto. O tempo de exposição foi alternado entre 24 horas, 48 horas e 72 horas. Além do branco, foram utilizados 2 controles para cada placa, em que o primeiro consistia em meio de cultura puro, e o segundo continha diluente da droga, DMSO 0,1% para o MST-312 e PBS para doxorrubicina e metrotrexato. Os valores de absorbância de cada experimento foram analisados, e desde que não houvesse diferença estatística entre os dois grupos controle, o controle de DMSO ou PBS era utilizado como parâmetro para conversão dos dados em percentual de viabilidade. Por fim, através da regressão não linear era estimado o IC₅₀%.

3.3.6 Transfecção por siRNA in vitro

Um siRNA, contendo sequência complementar ao gene do *hTERT* (porção catalítica da telomerase humana), localizado no cromossomo 5p15.33, foi usado para inibir parcialmente a expressão do *hTERT*. Um siRNA "scramble" foi usado como controle do processo de transfecção. A confirmação da transfecção foi realizada por meio da PCR em tempo real. A transfecção foi realizada em placas de 6 poços com 10^6 células em cada poço. Ao siRNA era adicionada a Lipofectamine™ 2000 - Invitrogen™- e dessa forma seguiu-se o protocolo do fabricante. Após 72 horas da transfecção as células eram plotadas nas placas de 96 poços e o restante colocado em uma placa de 10 cm, própria para cultura celular. A partir dessa etapa considerava-se o tempo zero de tratamento para o teste de viabilidade celular e era realizada extração de RNA e RT-PCR para a confirmação da transfecção, o que foi repetido no tempo de 72 horas após a transfecção. Após 72 horas de exposição à droga a placa de 96 poços foi levada para mensuração de fluorescência e posterior análise da viabilidade celular; nessa etapa foi realizada nova RT-PCR em tempo real para mensurar a expressão ao final do experimento, ou seja, no tempo total de 144 horas após transfecção e de 72 horas pós exposição aos compostos (figura7).

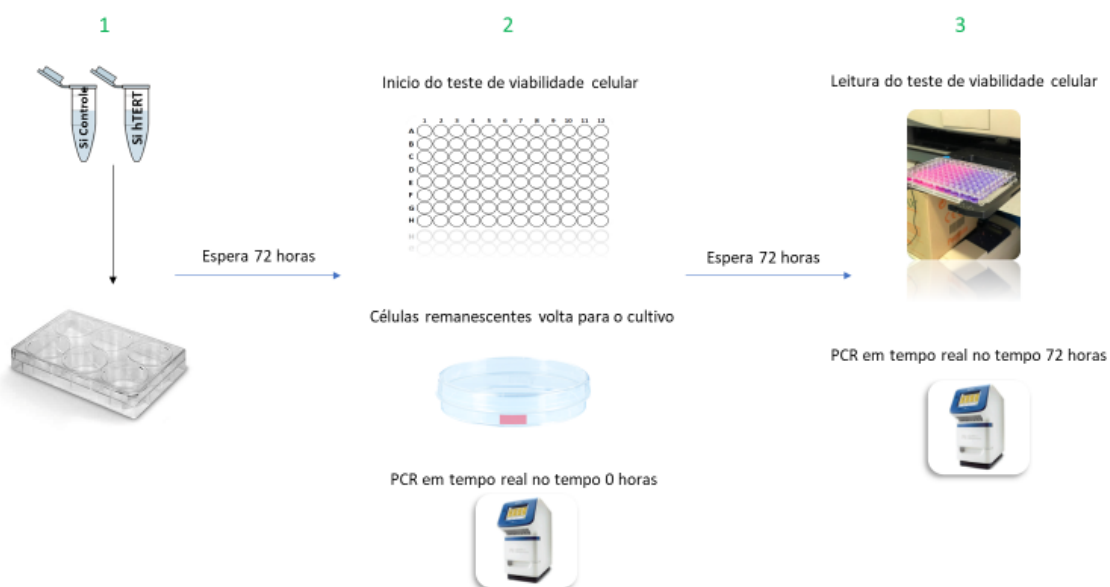


Figura 7. Fluxo utilizado pelo protocolo de transfecção. Inicialmente, procedeu-se à transfecção utilizando siRNA controle e si *hTERT*, responsável por inibir a telomerase. Em seguida, aguardou-se um período de 72 horas para permitir a divisão celular e possibilitar a realização do teste de viabilidade celular por meio do método “Cell Titer Blue”. Simultaneamente, as células transfectadas, tanto as de controle quanto as com *hTERT* inibido, foram dispostas em uma placa de cultura, e foi realizado um ensaio de PCR em tempo real no momento zero, com base no teste de viabilidade celular. Após 72 horas de exposição das células às drogas, realizou-se a leitura do teste de viabilidade celular. Nesse momento, extraiu-se o RNA das células restantes na placa e conduziu-se outra PCR em tempo real para confirmar a transfecção, considerando-se o período de 72 horas após a exposição às drogas para o teste de viabilidade celular.

3.4 Testes realizados de rotina pelo Hospital da Criança de Brasília

3.4.1 Amostras dos pacientes e fluxo do diagnóstico das neoplasias hematológicas

As amostras forem divididas entre os aspirados de medula óssea que foram coletados no momento do diagnóstico do paciente no HCB, e os que chegavam depois do início do tratamento. As amostras eram colhidas na chegada do paciente ao hospital e utilizadas para o diagnóstico, para a avaliação de translocações, e para a análise de cariótipo (a mesma amostra foi depois utilizada no estudo para avaliação da expressão dos genes *hTERT*, *cFLIP* e *BIRC5*). Para avaliação da DRM, a coleta de aspirado de medula óssea foi feita depois de 15, 33 ou 78 dias do início da fase de indução da quimioterapia. Em casos de recaída, ocorreram outras coletas de aspirado de medula óssea para avaliação e escolha do melhor protocolo clínico a ser utilizado.

A rotina do Hospital referente a esses procedimentos se inicia com a chegada do paciente, seguida pela triagem médica, na qual são analisados os sinais e sintomas característicos que indicam a possível presença de neoplasia das células sanguíneas. Após essa etapa inicial, amostras são coletadas e uma equipe de analistas conduz a avaliação morfológica das células por meio de microscopia óptica sendo a amostra colocada em lâminas, com o objetivo de identificar casos suspeitos de neoplasia. A confirmação do diagnóstico e a posterior estratificação de risco são realizadas pelo auxílio de diferentes testes complementares, incluindo análises citogenéticas, estudos de biologia molecular e imunofenotipagem (figura 8).

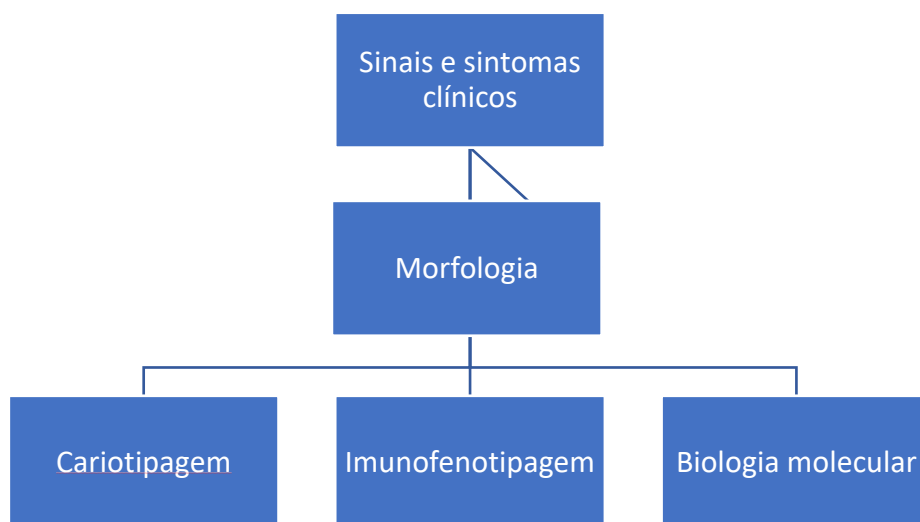


Figura 8. Fluxograma do diagnóstico da LLA-B utilizado pelo Hospital da Criança de Brasília.

3.4.2 Seleção das células mononucleares com posterior extração de RNA seguida da confecção de DNA complementar (cDNA)

As células mononucleares foram separadas dos demais componentes da medula óssea utilizando o gradiente de Ficoll. O aspirado de medula óssea foi colocado em um tubo de vidro de 15ml contendo 1ml de reagente de Ficoll e submetido a centrifugação em 2000g por 20 minutos. Após a separação por gradiente de densidade foi identificado o anel de células mononucleares, o qual era removido para extração de RNA e DNA genômico.

O RNA foi extraído usando o reagente de trizol da Invitrogen e em seguida 2 μ g desse foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizando o kit da ThermoFisher (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit), sendo todo o processo realizado com base nas instruções do fabricante.

3.4.3 PCR convencional

A PCR convencional, realizada de rotina pelo HCB para o diagnóstico, foi utilizada para identificação das translocações para a caracterização do tipo da leucemia que o paciente apresentava. Dando seguimento, realizou-se a reação da polimerase em Cadeia (PCR) conforme exposto na tabela 2. Como foi utilizado cDNA, a técnica é conhecida como *PCR com transcriptase reversa*, ou RT-PCR.

Tabela 2. Reagentes e suas respectivas concentrações para a PCR convencional.

Reagente	Concentração Estoque	Concentração final	Volume (μL)
H₂O	-	-	11
Tampão	10X	1X	1,5
MgCl₂	50 mM	1,5 mM	0,45
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,3
Taq Polimerase	5 U/ μ L	0,75 U	0,15
Primer Foward	10 μ M	0,2 μ M	0,3
Primer Reverse	10 μ M	0,2 μ M	0,3
Amostra	-	-	1
		Volume final	15

A PCR convencional foi utilizada para todas as translocações pesquisadas seguindo o fluxo da figura 9.

As condições de ciclagem para a PCR convencional foram de 3 minutos a 95 graus, seguido de 35 ciclos a 95 graus por 30 segundos; 30 segundos a temperatura específica de cada primer e 72 graus por 60 segundos. Por fim 1 ciclo a 72 graus por 5 minutos. O produto de PCR foi visualizado sob luz UV em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (10mg/ml). Todos os primer utilizados tanto na PCR convencional quanto na PCR em tempo real estão na tabela 3.

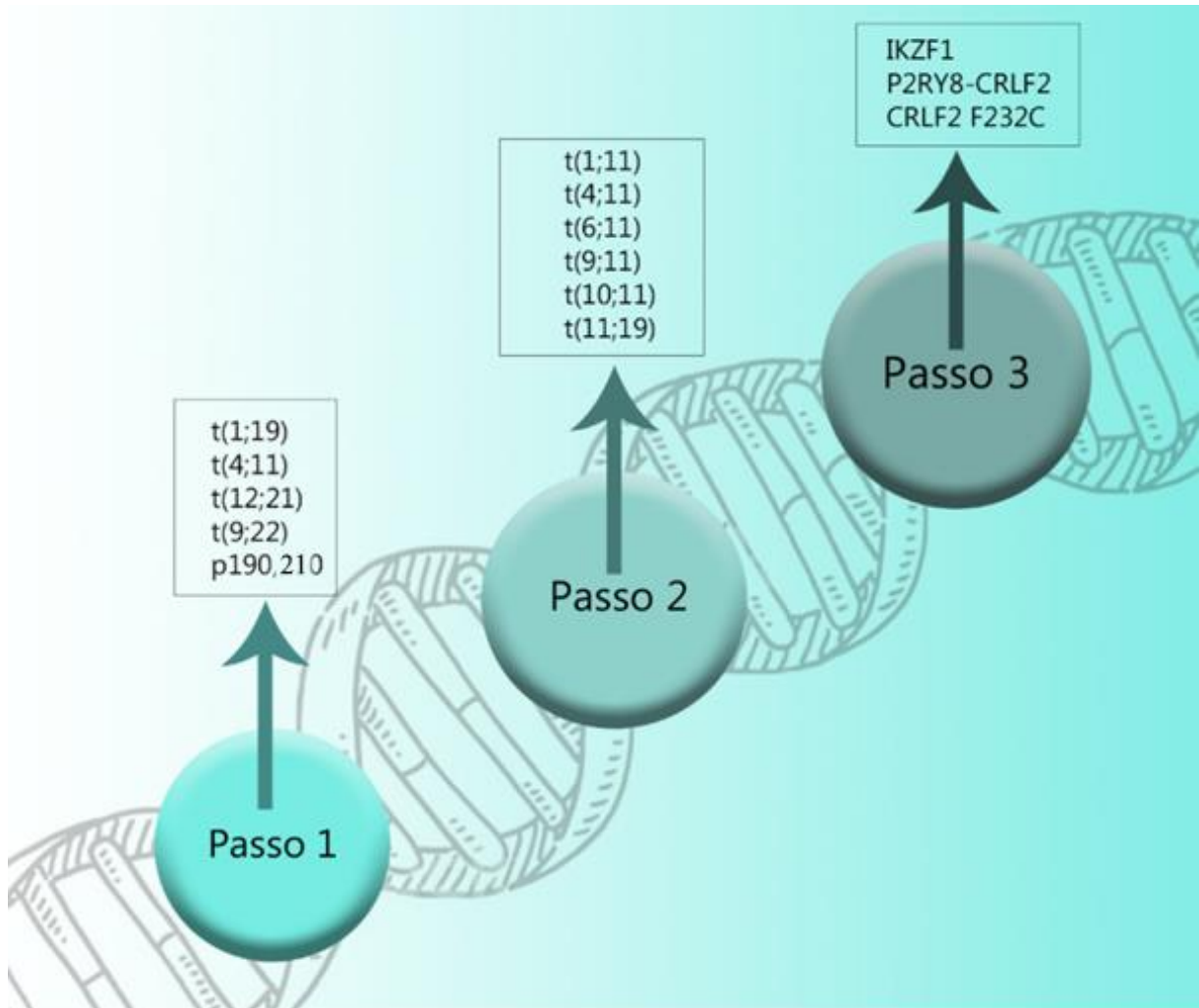


Figura 9. Fluxo de análise das principais translocações. Na primeira etapa é realizada PCR das translocações mais comuns, na segunda, prioriza-se a identificação das translocações envolvendo o MLL. Caso o resultado seja negativo, é realizada a terceira etapa, focando na identificação das translocações que envolvem o IKZF1. Amostras com resultado negativo para todas os testes realizados são classificadas como “outras leucemias” ou “não classificado”.

Tabela 3. Primers utilizados no estudo, tanto para a PCR convencional quanto para a PCR em tempo real. Acompanhados das respectivas temperaturas de anelamento após a padronização.

Nome do oligonucleotídeo	Objetivo	Sequência	Temperatura de anelamento
PR 055	RT-PCR P2RY8F01 (64)	CACGAACACCTTCTCAAGCA	68
PR 056	RT-PCR CRLF2R01 (64)	AGCCTCCCAGCAGAAAGAC	68
PR 057	RT-PCR CRLF2R02 (64)	GTCCCATTCTGATGGAGAAA	68
PR 058	RT-PCR CRLF2R03 (64)	GGTAGTTGGTGCCTGGTCA	68
IKZF1 Δ2a	Multiplex para delIKZF1 (65)	CAACAAGTGACCCATCCTTTG	60
IKZF1 Δ2b		CACACACTTCAAGATTATGCATTT	60
IKZF1 Δ4		TGTGAAGGTCACACCCTCTG	60
IKZF1 Δ7		AAAGAACCCTCAGGCATTCA	60
IKZF1 Δ8		GGGACTGGAAGTCACAGAA	60
IKZF1 GL		CACCTTGTGGTCCAGGCTA	60
P2RY8ex1		RT-PCR fusão CRLF2-P2RY8 (66)	TTGCAAGGTTGCTGGACAGATGGAA
CRLF2ex3	GTCTAGGAGGCACCCCGAAGTGTGA		68
MLL-7	Multiplex para MLL (67)	GATGCCTTCCAAAGCCTACCTG	65
MLL-9		CTCCCCGCCAAGTATCCCT	65
AF4-6		TGGGTTACAGAAGTACATGCTGA	65
AF4-11		GCTGCCATTTGTTTGTGTTGGAG	65
AF9-5		GCTGCTGGTATGAATACTCCTATTAG	65
AF9-6		GAGCTGGAGCTGGCAGGA	65
AF9-10		CTGTGAAGCTCTACCAGTTCATCT	65
ENL-2		AGCTCTAACCTCACCTGGACG	65
ENL-6		GCTTGGAGGTCTTGCTGCTC	65
ENL-7		CTGGAGTTGGACGGGCTTGAC	65
ELL-3		AGTCAGGCTGGGGGATGGAGATGT	65
ELL-6		GCCGTCTTAGCACTCATGTTGGC	65
AF10-6		ACCAGTGGCTGCTTTGCTTTCTCT	65
AF10-9		ACCAATGCAGGTGATGGTTCTGGCT	65
AF10-11		TGCTGATGACTGTTGGGAGTGAGAGT	65
AF10-16		TGGTGCCTGACTGAGAGAAGATCCA	65
AF6-2		GCGTTTCGATTACATCTTGAGTGG	65
AF6-21		GAGTCGAGAAGACAGTCCAGAGCT	65

EPS15-6		TGATTAGCAAAGGACTACTGGTATCAT	65
EPS15-14		TCTCCCTTTGAACTTCATCTTGAAGA	65
MLL-4		ATCTTATCTCCAGATTTGGTCTCTGAT	65
B2M_F	Gene constitutivo B2M	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	60
B2M_R	(68)	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT	60
TBP_F	Gene constitutivo HPRT1	TGACACTGGCAAACAATGCA	60
TBP_R	(69)	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT	60
C1423	Seq. Fusão CRLF2-P2RY8	CGGTTTGGGGACTTTCAGAGCACAA	68
C1445	DNA	TCACCTGCTACTTCTGCCGCTGCTT	68
C1450	(70)	GGCATGAGCCACCGCGCCCCGCCCAATGC	68
BCR-b1-A	BCR-ABL P210	GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC	65
ABL-a3-B	(71)	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	65
BCR-b2-C		CAGATGCTGACCAACTCGTGT	65
ABL-a3-D		TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	65
ABL-a3-E39		TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT	65
TCF3-A	TCF3-PBX	CACCAGCCTCATGCACAAC	65
PBX-B	(71)	TCGCAGGAGATTCATCACG	65
TCF3-C		CACCCTCCCTGACCTGTCT	65
PBX-D		GGCCTGCTCGTATTTCTCC	65
PBX-E39		TGAACTTGCGGTGGATGAT	65
KMT2A-A	AF4-KMT2A	CCGCCTCAGCCACCTAC	65
AF4-B	(71)	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG	65
KMT2A-C		AGGACCGCCAAGAAAAGA	65
AF4-D		CGTTCCTTGCTGAGAATTTG	65
KMT2A-E59		AAGCCCGTCGAGGAAAAG	65
ETV6-A	ETV6-RUNX1	TGCACCCTCTGATCCTGAAC	65
RUNX1-B	(71)	AACGCCTCGCTCATCTTGC	65
ETV6-C		AAGCCCATCAACCTCTCTCATC	65
RUNX1-D		TGGAAGGCGGCGTGAAGC	65
ETV6-E59		CGCACCAGGAGAACAACCAC	65
BCR-e1-A	BCR-ABL P190	GACTGCAGCTCCAATGAGAAC	65
ABL-a3-B	(71)	GTTTGGGCTTCACACCATTCC	65
BCR-e1-C		CAGAACTCGCAACAGTCCTTC	65
ABL-a3-D		TTCCCCATTGTGATTATAGCCTA	65
ABL-a3-E39		TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT	65
TERT F	hTERT	TCACGGAGACCACGTTCAA	60
TERT R	(72)	TTCAAGTGCTGTCTGATTCCAAT	60
cFLIP R	cFLIP	ACTTGTCCCTGCTCCTTGAA	60
cFLIP F		TAAGCTGTCTGTCTGGGACT	60

BIRC5 (survivina) F	Survivina	AGGACCACCGCATCTCTACAT	60
BIRC5 (survivina) R		AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	60

*Em preto, os *primers* utilizados apenas na PCR convencional. Em azuis aqueles utilizados tanto na PCR convencional como na PCR em tempo real, e em vermelho os utilizados apenas na PCR em tempo real.

3.4.4 Citometria de fluxo

A amostra de medula óssea dos pacientes foi testada para os marcadores descritos no Quadro 2 para triar qual o tipo de leucemia. As marcações foram realizadas em tubos separados com diferentes *pools* de anticorpos, sendo o primeiro deles o de triagem, que permite a classificação da natureza da célula (célula B, célula T ou mieloide) patológica. Toda a citometria foi realizada de rotina pelo HCB para o acompanhamento do paciente.

Quadro 2. Triagem das leucemias agudas conforme o protocolo do HCB.

Tubo 1
CD3
MPO
CD34
CD117
CD79A
CD19
CD3
CD45

Ao passar pela triagem a amostra foi submetida à análise pelo painel expandido (Quadro 3) que permite a identificação das células patogênicas e a avaliação da presença de aberrações imunofenotípicas.

Quadro 3. Painel estendido com a finalidade de identificar e classificar as LLA-B com base no protocolo utilizado pelo HCB.

Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
CD81	IGM	-
CD66c	NG2	CD13
CD34	CD34	CD34
CD19	CD19	CD117
CD10	CRLF2	-
CD38	CD38	CD19
CD20	CD20	CD33
CD45	CD45	CD45

A avaliação da DRM foi feita com base na fase de indução de quimioterapia nos dias 15, 33 e 78 (73,74) . O painel que foi utilizado está descrito no quadro 4.

Quadro 4. Painel para a marcação das DRMs nos dias de 15, 33 e 78 dias com base na fase de indução da quimioterapia. Painel utilizado pelo HCB com base no estudo de THEUNISSEN *et al.* (2017).

Tubo 1	Tubo 2
CD81	CD81
CD66c + CD123	CD304 + CD73
CD34	CD34
CD19	CD19
CD10	CD10
CD38	CD38
CD20	CD20
CD45	CD45

Quanto às reações de marcação de antígeno, primeiramente, foi realizada a aquisição do volume de amostra equivalente a 10^6 leucócitos, foram adicionados os anticorpos de superfície, conforme a tabela 4, com posterior incubação por 15 minutos. Então foi adicionado 100 μ L de fixador sob homogeneização e seguiu-se nova incubação por mais 15 minutos. Ao término desse período, foram acrescentados 2ml de tampão fosfato salino (PBS) e realizada a centrifugação pelo período de 5 minutos em 2500rpm. Por fim, foi retirado o sobrenadante e adicionado 100 μ l de solução permeabilizadora.

A aquisição e a análise foram realizadas imediatamente após o processo de marcação utilizando o BD FACS Canto II, 10 parâmetros e 8 cores, e o software FACS Diva versão 8.0.1. Para a análise de dados foi utilizado o software INFINICITY. Para o diagnóstico considerou-se a captura de 100.000 eventos, já para identificação da DRM, 5.000.000 de eventos. Os anticorpos utilizados nesse trabalho, bem como seus fluorocromos com as respectivas titulações, estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4. Painel de anticorpos utilizados pelo HCB contendo.

Anticorpo	Empresa de origem	Fluorocromo	Título da bula (μ l)	Título sugerido (μ l)
CD 10	BECKMAN COULTER	APC	10	5
CD 117	BECKMAN COULTER	APC	10	3
CD 123	BD	APC	5	1
CD 13	BECKMAN COULTER	APC ALEXA FLUOR 750	5	5
CD 19	BECKMAN COULTER	APC ALEXA FLUOR 750	10	3
CD 19	BECKMAN COULTER	FITC	20	10
CD 20	BECKMAN COULTER	FITC	20	5
CD 3	DBR	FITC	5	10
CD 304	BECKMAN COULTER	KROME ORANGE	10	5
CD 33	BECKMAN COULTER	PACIFC BLUE	10	10
CD 34	BECKMAN COULTER	PACIFIC BLUE	10	3
CD 38	BD	PACIFIC BLUE	5	10
CD 3I	DBR	PE	20	5
CD 45	BECKMAN COULTER	PE	20	20
CD 66c	BD	PE	5	5
CD 73	BD	PE	20	5
CD 79A	DBR	PE	10	5
CD 81	BECKMAN COULTER	PE	20	10
CRLF2	BECKMAN COULTER	PE	20	10
IGM	BECKMAN COULTER	PECY7/PC7	10	5
MPO	BECKMAN COULTER	PECY7/PC7	10	5
NG2	DBR	PERCP CY5.5	4	4

3.4.5 Cariotipagem

3.4.5.1 banda G

Os testes de cariotipagem foram feitos de rotina pelo HCB para diagnóstico do paciente. Primeiramente foram colhidos 4mL de aspirado de medula óssea do paciente em tubo heparinizado, submetido à cultura em meio estéril contendo 9 mL de meio RPMI, acrescidos de penicilina e estreptomicina (100 U/mL), e 15% de soro fetal bovino. As garrafas de cultura ficaram na estufa a 37 °C por até 72 horas. Dando seguimento, foi acrescentado 280 μ L de colchicina (0,16 μ g/10mL) por 40 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado por cinco minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e adicionou-se 14 mL de solução hipotônica KCl 0,075M. Em seguida, foram centrifugados novamente por sete minutos a 1000 rpm, desprezado o sobrenadante e adicionados 7mL de solução fixadora (metanol e

ácido acético glacial). Ao término do processo de fixação, procedeu-se a ressuspensão cujo conteúdo foi gotejado nas lâminas de vidro previamente preparadas (limpas com solução saturada de KOH).

3.4.5.2 Coloração das lâminas

As lâminas preparadas para a coloração para banda G foram transferidas para o banho contendo 50 mL de tampão HBSS (Hanks Balance Salt Solution) e 100 µL de tripsina (2,5%) a 37 °C por 30 segundos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em solução contendo 50 mL de HBSS e 1 mL de soro fetal bovino. Após o processo de lavagem, as lâminas foram secas e adicionou-se o corante Giemsa (4% em tampão fosfato pH 6.8) por 10 minutos. Ao final, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas em temperatura ambiente. A análise citogenética foi realizada no microscópio Imager D2, através do software Ikaros versão 5.8.9 que permitiu analisar se os pacientes apresentaram alterações cromossômicas.

4. RESULTADOS

A parceria com o Hospital da Criança de Brasília deu-se em 03/07/2019 e com a posterior aprovação do comitê de ética o trabalho foi iniciado. Ao todo foram coletados 83 termos de consentimento e assentimento, assinados pelos pais e as crianças. Desse total, 79 geraram amostras passíveis de análise.

4.1 Perfil demográfico e laboratorial dos pacientes

A faixa etária dos pacientes foi dividida em 3 grupos (menores que 1 ano, entre 1 e 10 anos, maiores de 10 anos). A maior parte dos pacientes tinha entre 1 a 10 anos de idade (79,74%), seguido do grupo que se apresentava com mais de 10 anos (17,72%) e por último aquele composto por menores de um ano (2,53%). Os pacientes do sexo masculino foram maioria, contudo essa diferença é pequena em relação ao feminino, 50,63% e 49,37 respectivamente.

A quantidade de leucócitos ao diagnóstico maior que 50000 leucócitos por $\text{mm}^3/\mu\text{L}$ (alto risco) foi representado por 18,99% dos casos, sendo a maior incidência (81,01%) de contagem de leucócito menor que 50000 $\text{mm}^3/\mu\text{L}$ (baixo risco).

Os pacientes com síndrome de Down têm maior predisposição ao desenvolvimento da leucemia e nesse estudo foram representados por 6,32% dos casos.

Alterações cromossômicas numéricas, também chamadas de aneuploidias, são classificadas de diversas formas, a depender do tipo e da quantidade. Nesse trabalho foi possível segregar em 4 grupos: elevada hiperdiploidia, hiperdiploide, normal e hipodiploide. A elevada hiperdiploidia (>56 cromossomos) teve menor prevalência (8,82%), seguido da hiperdiploidia (>46 e <56 cromossomos), com 15,18%, sem alterações cariotípicas (46 cromossomos), com 72,05% e, por último, hipodiploidia (<46 cromossomos), com 1,46% dos casos.

Rearranjos gênicos, como as translocações cromossômicas, desempenham um papel significativo na patogênese da LLA-B. Neste estudo observou-se que a translocação ETV6-RUNX1, geralmente associada ao bom prognóstico, ocorreu em 22,74% dos casos estudados. Além disso, foi identificado que a translocação TCF3-PBX estava presente em cerca de 7,59% dos casos de LLA-B analisados.

Pacientes com o subtipo BCR-ABL1 são considerados de alto risco. Nesse estudo esse subtipo representou 3,8% do total de casos. Outras translocações de alto risco são os rearranjos

envolvendo o gene KMT2A, que ocorrem, na grande maioria dos casos, nos pacientes menores de 1 ano de idade. Em nosso estudo essas translocações representaram 2,53% dos dados. Outro subtipo, também associado a prognóstico pior, é o PH^{like} também conhecido como cromossomo Filadélfia like ou Ph-like, que se caracteriza pelo perfil clínico e de expressão gênica muito similar aos casos com translocação BCR-ABL1 (cromossomo Filadélfia), mas sem a apresentação desta. Neste estudo a prevalência de Ph-like foi de 7,59%. Por fim, 55,69% dos casos foram classificados como “outras translocações”.

A doença residual mínima (DRM) foi determinada pela co-expressão de marcadores distintos (tabela 5), com a finalidade de diferenciar as células clonais das normais. Nesse sentido a DRM foi avaliada após 15 (D15), 33 (D33) e 78 (D78) dias de tratamento, os quais representam momentos específicos da quimioterapia. A MDR permite a estratificação do risco do paciente em baixo, intermediário ou alto. Em D15, 62,66% dos casos foram de baixo risco, 22,66% intermediário e 14,66% de alto risco. No mesmo seguimento, em D33 os casos de baixo risco foram maioria (81,06%), seguidos dos de risco intermediário (13,51%) e de alto risco (5,4%). Por outro lado, em D78 só se distingue baixo ou alto risco. Nesse caso, baixo risco compreendem 90,27% dos casos.

A recaída ocorreu em 21,51% dos casos, os óbitos em 10,12% e a remissão, que compreendeu a maior parte dos casos, representou 88,89%.

A partir de todos os parâmetros clínicos, a equipe de saúde do HCB se reúne com a finalidade de realizar a classificação de risco final do paciente, para adequação de protocolo de tratamento (o que foi denominado “classificação de risco final” no presente estudo). Assim, a classificação de risco final foi: alto para 18,98% dos casos, intermediário para 58,22%, e baixo para 22,78% deles.

Todas as informações referentes aos dados demográficos e laboratoriais dos pacientes estão discriminadas na tabela 5.

Tabela 5. Características demográficas e laboratoriais das crianças com leucemia linfóide aguda B atendidas no Hospital da Criança de Brasília no período do estudo.

	Classificação	N=79/ (%)
Sexo	Feminino	39 (49,37)
	Masculino	40 (50,63)
Raça	Branca	12 (15,18)
	Parda	64 81,12)

	Negra	2 (2,53)
	Amarela	1(1,26)
Síndrome de Down	SIM	5 (6,32)
	NÃO	74 (93,67)
Idade (anos)	0-1	2 (2,53)
	1-10	63 (79,74)
	>10	14 (17,72)
Leucometria célula/μL	< 50000	64 (81,01)
	> 50000	15 (18,99)
Aneuploidia	Elevada hiperdiploidia	6 (8,82)
	Hiperdiploide	12 (15,18)
	Sem alteração cariotípica	49 (72,05)
	Hipodiploide	1 (1,46)
Tipo genotípico	BCR-ABL- t (9;22)	3 (3,8)
	ETV6-RUNX1- t (12;21)	18 (22,74)
	TCF3-PBX - t (1;19)	6 (7,59)
	KMT2A/MLLT3 – t (9;11)	2 (2,53)
	PH-like	6 (7,59)
	Outras LLA-B	44 (55,69)
DRM de 15 dias	Menor que 1%	47 (62,66)
	Entre 1% e 5%	17 (22,66)
	Maior que 5%	11 (14,66)
DRM de 33 dias	Menor que 0,1%	60 (81,08)
	Entre 0,1% e 1%	10 (13,51)
	Maior que 1%	4 (5,4)
DRM de 78 dias	Menor que 0,01%	65 (90,27)
	Maior que 0,01	7 (9,72)
Evolução clínica	Recaída	17 (21,51)
	Óbito com recaída	4 (5,06)
	Óbito total	8 (10,12)
	Remissão	71 (89,88)
Infiltração no SNC	Menor que 0	57 (78,08)
	Maior que 0	16 (21,91)
Classificação de risco final	Alto	15 (18,98)
	intermediário	46 (58,22)
	Baixo	18 (22,78)

* SNC = Sistema Nervoso Central/ * D15, D33 e D78 são as DRMs de 15, 33 e 78 dias respectivamente.

4.2 Relação da expressão do gene *hTERT* com as variáveis estudadas

A expressão relativa do gene da telomerase foi medida para identificação de possíveis relações com as demais variáveis estudadas. O mesmo foi feito com genes que estão associados à resistência a múltiplas drogas e que mantêm alguma relação direta com o *hTERT*.

Nesse estudo, todas as amostras foram telomerase positiva. Ao analisar o histograma de expressão relativa de *hTERT* (figura 10) identifica-se que a maioria dos pacientes (aproximadamente 56) apresentaram amostras com expressão aumentada, no intervalo de valores compreendidos de 0-10 vezes (em relação à mediana do grupo). Dentre esses pacientes, 39 se encontram no segundo nível, com até 5 vezes mais expressão. Os demais exibem expressão de *hTERT* com distribuição de modo assimétrico com desvio à direita.

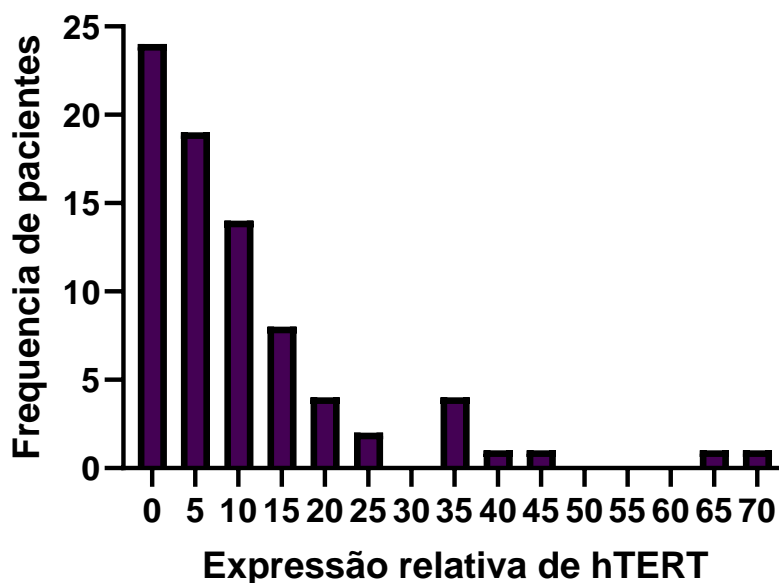


Figura 10. Histograma para a demonstração da distribuição de expressão relativa de *hTERT* nas amostras de pacientes com LLA-B. O eixo X representa a expressão relativa do gene *hTERT*, que foi dividida em grupos de amplitude de 5 unidades. Cada grupo abrange um intervalo de valores, por exemplo, a primeira barra representa valores de 0 a 4,9, a segunda, valores de 5 a 9,9 e assim sucessivamente, até o valor máximo de 70. O eixo Y representa o número de pacientes em cada um dos grupos. Os dados foram normalizados pela mediana da expressão amostral. O N amostral foi de 79 pacientes.

Dando prosseguimento, foi demonstrado que houve correlação positiva ($p < 0,05$) da alta expressão de *hTERT* com a Idade (figura 11, imagem A). Os pacientes foram então extratificados em baixo risco e alto risco de acordo com a idade. Ao associá-los com a expressão relativa de *hTERT* foi visto que pacientes de maior risco têm maior expressão relativa de *hTERT*

quando comparados aos de menores riscos (figura 11, imagem B). A correlação com a idade é relevante uma vez que essa variável é amplamente empregada como critério de estratificação de risco, juntamente com outras variáveis, para determinar o risco final do paciente.

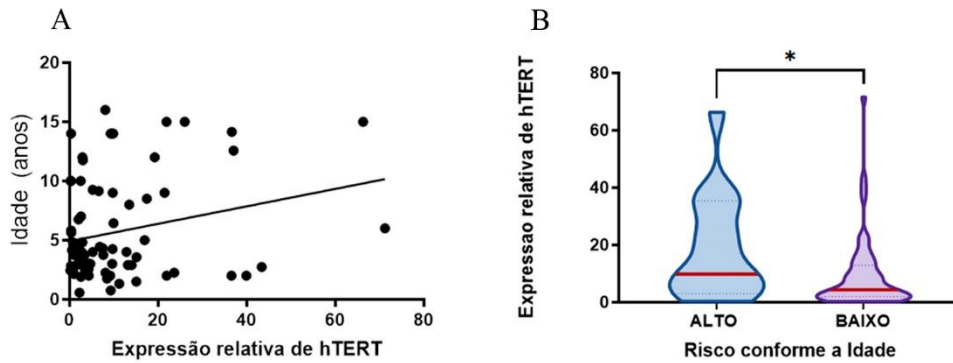


Figura 11. Associações e correlações que associam idade com a expressão relativa de *hTERT*. Todas as correlações estão em um intervalo de confiança de 95% com um nível de significância (alfa) de 5%. Imagem A. Correlação da idade com a expressão de *hTERT* com $R = 0,2405$ e $p = 0,03$. Imagem B. Gráfico de violino demonstrando diferença significativa ($p = 0,023$) na expressão de *hTERT* ao diagnóstico nos grupos de alto e baixo risco conforme idade (teste utilizado: Mann-Whitney).

No mesmo sentido, também foi avaliada a possível relação entre expressão do *hTERT* e aneuploidias, visto que essas são frequentes nas leucemias que envolvem as células B. Todavia, neste estudo, embora o padrão dos dados aponte para uma expressão proporcional ao grau de aneuploidia, não houve diferença significativa entre os grupos -figura 12.

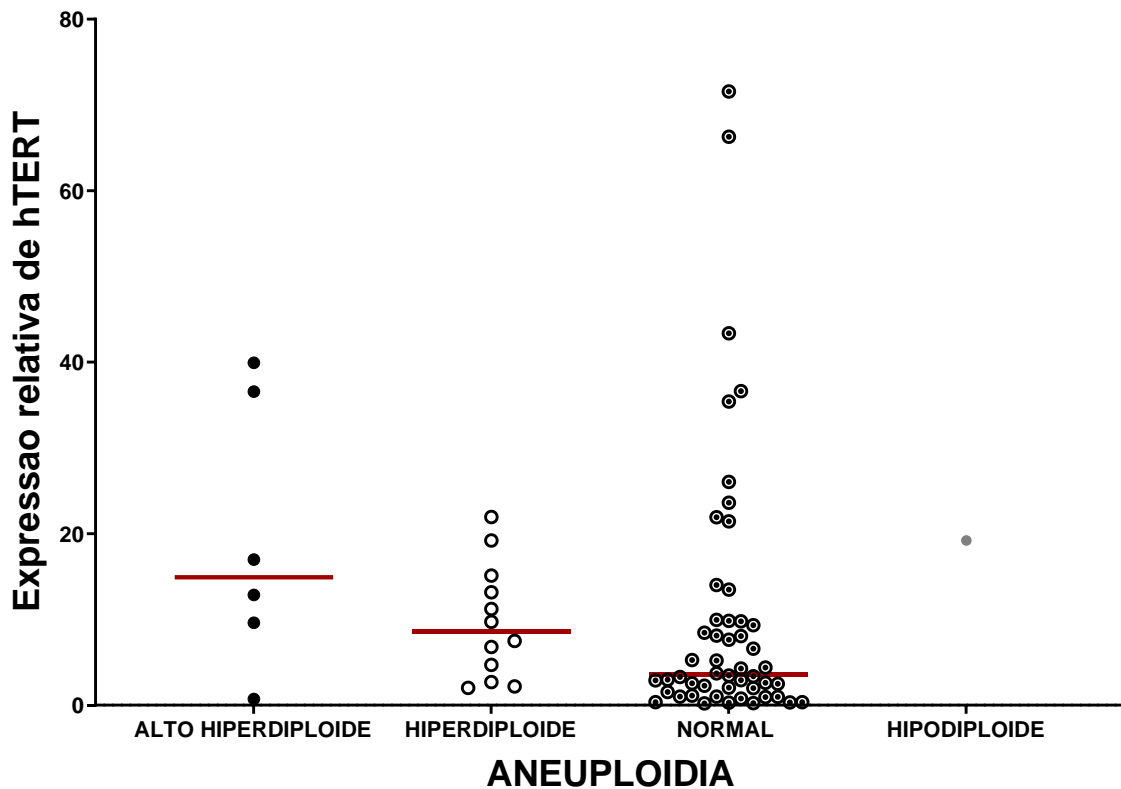


Figura 12. Gráfico *scatter plot* demonstrando expressão relativa de *hTERT* em grupos com diferentes graus de aneuploidia. O teste realizado foi o de Kruskal-Wallis com os pós teste de Dunns ($p = 0,2$).

A análise de infiltração do sistema nervoso central é feita para ajudar a estratificar o risco do paciente, sua presença é o suficiente para classificar o paciente como de alto risco. No entanto não foi vista diferença estatística na expressão de *hTERT* em grupos com distintas estratificações de risco baseadas nesse critério (Figura 13).

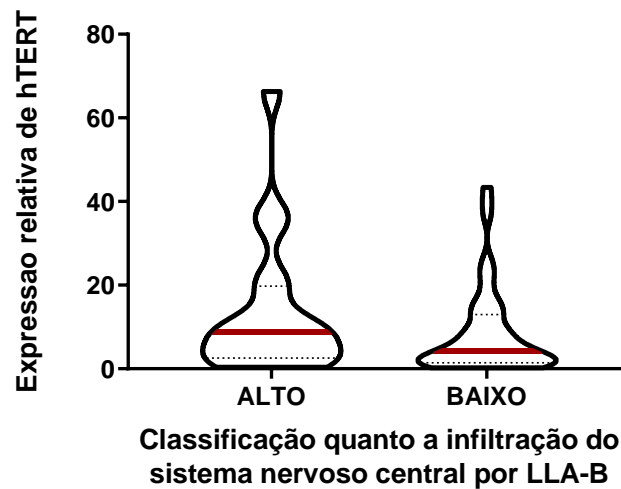


Figura 13. Gráfico de violino demonstrando expressão relativa de *hTERT* em grupos com diferentes classificações de risco com base na infiltração do sistema nervoso central.

A expressão de *hTERT* também foi comparada entre os grupos com diferentes classificações de risco com base na DRM. Ao se observar a DRM de 15 dias (figura 14, imagem A), pode-se inferir que não há distinção entre as medianas dos grupos. Em sentido diverso, na DRM de 33 dias (figura 14, imagem B) já é possível identificar certa diferença de mediana entre os pacientes de alto risco quando comparado aos de baixo risco, mesmo que tal dado não seja estatisticamente significativo, provavelmente devido ao baixo número amostral do grupo de alto risco. A DRM de 78 dias, todavia, evidenciou que os pacientes de alto risco apresentaram a expressão da telomerase maior do que aqueles de risco inferior, com significância (valor de p) de 0,02 (figura 14, imagem C).

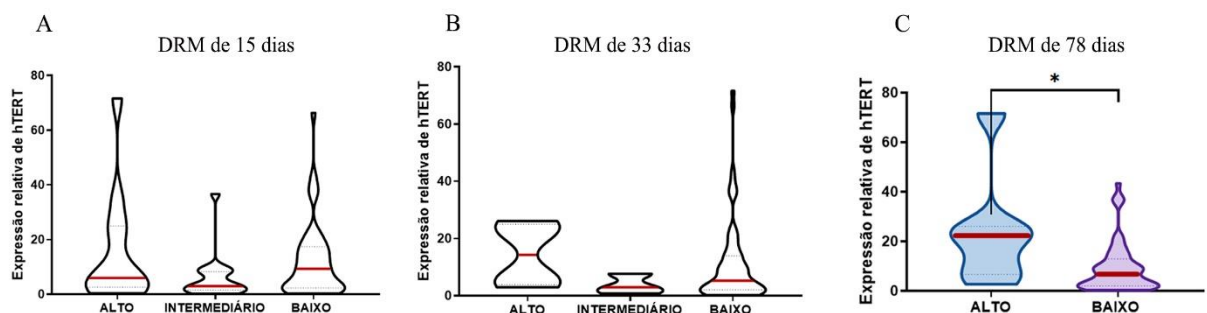


Figura 14. Gráficos de violino demonstrando expressão relativa de *hTERT* em grupos com diferentes classificações de risco com base nas DRMs. Imagem A. Resultados após 15 dias de início do tratamento. Imagem B. Resultados após 33 dias de início do tratamento. Imagem C. Resultados após 78 dias de início do tratamento (teste de Mann-Whitney, $p = 0,02$).

Foi avaliado se havia associação entre a estratificação de risco com base na DRM de 78 dias e a expressão de *hTERT*, visto que já foi evidenciado anteriormente que quanto maior a DRM de 78 dias maior o risco de recaída do paciente. Tal achado é amplamente conhecido, já que a DRM é padrão referencial na estimativa de recaída ou remissão. Do mesmo modo, foi avaliado se havia associação do risco final atribuído pelos profissionais de saúde com a expressão de *hTERT*, e não foi identificada nenhuma associação relevante (figura 15).

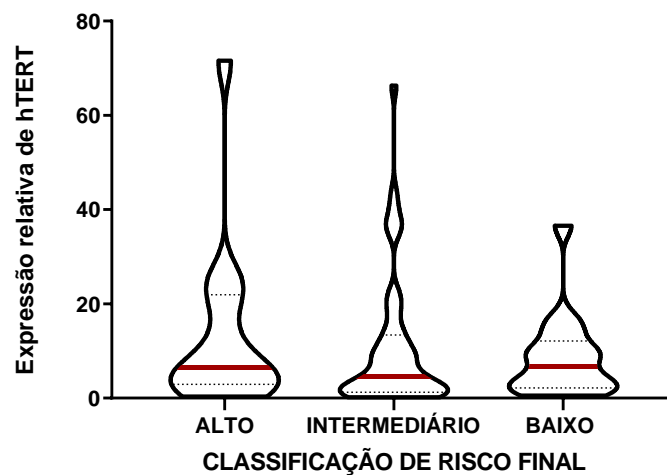


Figura 15. Gráfico de violino demonstrando expressão de *hTERT* em grupos com diferentes classificações de risco final (atribuídas aos pacientes com LLA-B pela equipe médica do HCB). O teste de Kruskal-Wallis apresentou p de 0,3427.

Considerando os resultados que apontaram para associação significativa entre risco segundo a DRM em 78 dias e expressão de *hTERT* (Figura 14), foi analisado se os pacientes que tinham maior expressão de telomerase também apresentavam a maior recaída. Nesse contexto, nosso estudo evidenciou que quanto maior a expressão de *hTERT*, mais provável a chance do paciente recair ($P < 0,03$), o que veio a se configurar como o achado central desse trabalho, indicando a possibilidade de descrição de novo biomarcador prognóstico para LLA-B (figura 16).

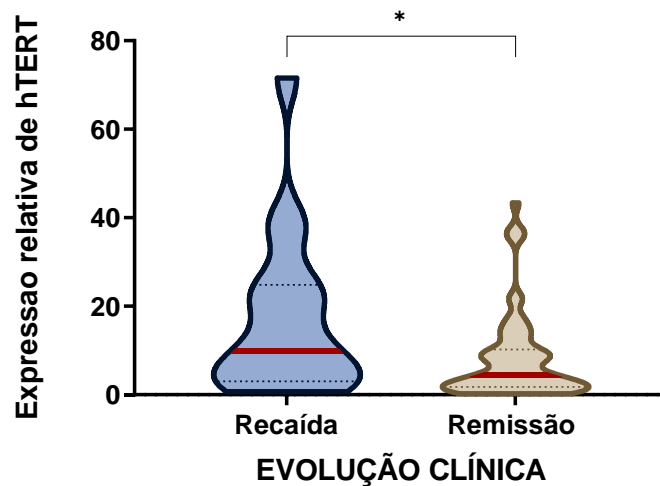


Figura 16. Gráfico de violino demonstrando a expressão relativa de *hTERT* de acordo com a evolução clínica dos pacientes. Foi aplicado o teste de Mann-Whitney com p de 0,028.

Ao considerar que o acompanhamento do paciente é contínuo e que a doença pode recidivar a qualquer momento, torna-se evidente a necessidade de estabelecer um período único de acompanhamento para evitar o viés de inclusão de pacientes que virão a sofrer recidiva no grupo de remissão. Para descartar esse viés, foi realizada uma análise de dispersão de tempo de acompanhamento, que não revelou diferenças significativas entre os grupos (figura 17, imagem A). Adicionalmente, selecionamos, com base na mediana do período de acompanhamento (960 dias), o intervalo de tempo para compor os estratos do grupo inicial e permitir a reanálise dos dados. Nessa nova análise, em que todos os pacientes foram acompanhados exatamente pela mesma quantidade de dias a partir do diagnóstico, a associação entre a expressão da telomerase e a evolução clínica foi novamente investigada, e novamente demonstrou uma significância estatística, com um valor de p de 0,0389 (figura 17, imagem B).

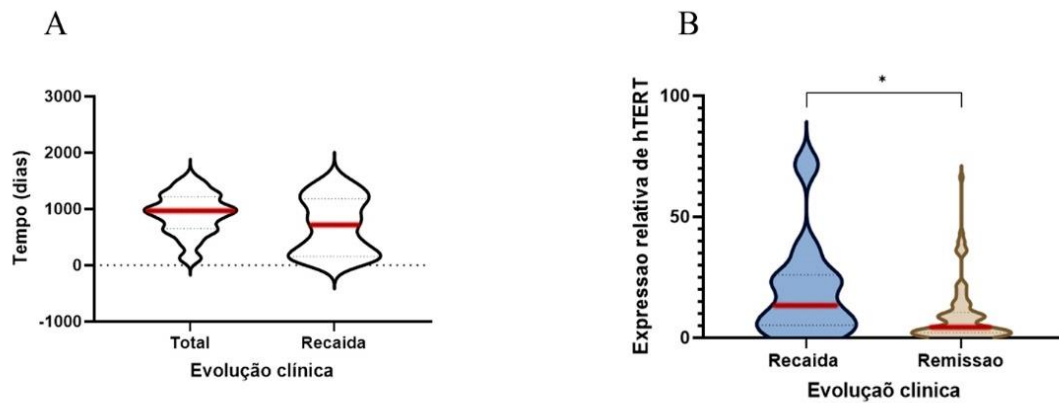


Figura 17. Imagem A. Dispersão dos dados em relação ao tempo de acompanhamento dos pacientes em relação àqueles que compõem o grupo de recaída. Não houve diferença no tempo mediano de acompanhamento entre os grupos. Imagem B. Expressão relativa de *hTERT* nos grupos de pacientes com a diferentes evoluções clínica (N amostral de 79) após exatos 960 dias de acompanhamento desde o diagnóstico. O teste estatístico empregado foi o de Mann-Whitney, com $p = 0,0389$.

Para investigar a relação da expressão do *hTERT* com as diferentes translocações relacionadas com os principais subtipos de LLA-B, foram testadas associações de cada uma delas com os dados de PCR. A distribuição de dados está demonstrada na figura 18, imagens A e B.

Ao segregar as translocações de forma individual, foi visto que amostras com a translocação 12:21, ETV6-RUNX1, relacionada a um bom prognóstico, tem baixa expressão de telomerase ($p < 0,0001$) (figura 18, imagem C). As translocações BCR-ABL, MLL e Ph-like não demonstraram associação significativa com a expressão do gene (figura 18, imagens A e D). Contudo, amostras contendo mutação em TCF3-PBX apresentaram valor mediano de expressão maior que os demais subtipos, sendo essas medianas 18,15 e 4,9 respectivamente ($p = 0,051$) (figura 18, imagem E).

Ressalta-se aqui que a translocação TCF3-PBX ainda é alvo de muita discussão na literatura quanto ao seu impacto no prognóstico. Neste estudo, observou-se que os pacientes com essa translocação apresentam uma expressão elevada da telomerase, o que, por sua vez, está associado com o aumento do risco de recidiva da doença.

Os pacientes que não foram classificados quanto ao tipo de translocação nesse trabalho foram maioria (55% dos casos). Ao comparar a expressão da telomerase nas amostras desses pacientes com o mesmo dado naqueles com translocações já conhecidas, foi visto que o grupo “outras LLA-B” apresentou maior expressão de *hTERT*, com $p < 0,0001$ (figura 18, imagem F).

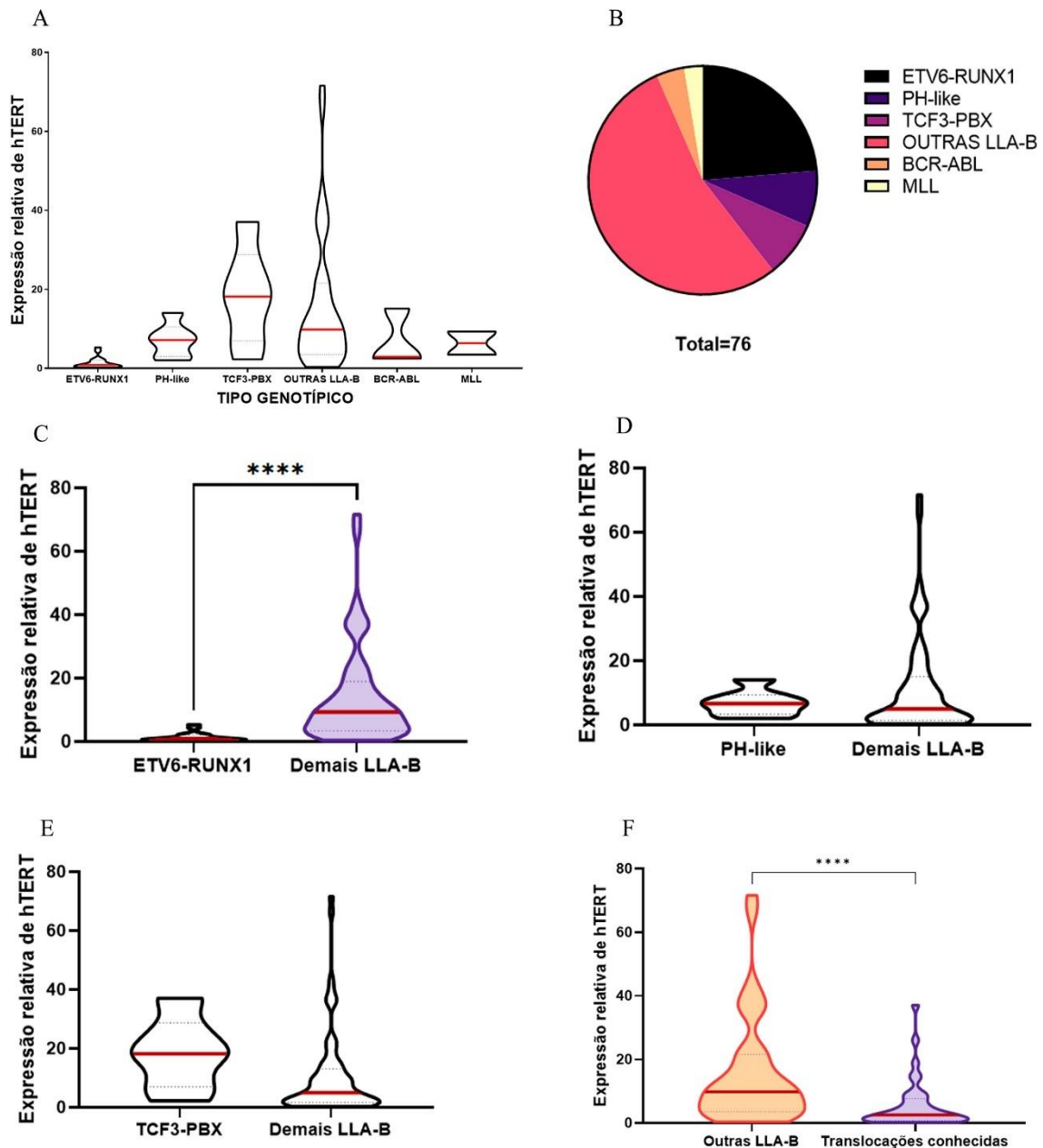


Figura 18 Associação de expressão de *hTERT* ao diagnóstico com as diferentes translocações envolvidas na formação da LLA-B. Imagem A. Gráfico de violino que ilustra a distribuição dos dados de expressão de *hTERT* por tipo de translocação pesquisada. Imagem B. Gráfico de setores que demonstra a distribuição de dados brutos totais por grupo de pacientes de acordo com as translocações detectadas (N de 76). Imagem C. Comparação da expressão de *hTERT* em amostras do grupo com translocação ETV6-RUNX1 com os demais subtipos de LLA-B. O teste realizado foi de Mann-Whitney e o $p < 0,0001$. Imagem D. Comparação da expressão de *hTERT* em amostras do grupo com leucemias classificadas como *filadélfia like* com outras LLA-B. Nesse caso não houve diferença entre os grupos. Imagem E. Comparação da expressão de *hTERT* em amostras do grupo com translocação TCF3-PBX com outras LLA-B. Nesse caso não houve diferença significativa ($p = 0,05184$). Imagem F. Comparação da expressão de *hTERT* em amostras do grupo com LLA-B não classificadas pelo nosso painel de translocações com o conjunto daquelas que testaram positivas para quaisquer das translocações testadas. O teste realizado foi de Mann-Whitney e o $p < 0,0001$.

As translocações genéticas conhecidas desempenham um papel importante no desenvolvimento da evolução clínica do paciente. A menor expressão da telomerase aparenta estar associada com t12:21, que é um conhecido marcador de bom prognóstico, reforçando a ideia de que baixa expressão de *hTERT* estaria associada a indicadores de bom prognóstico, ao passo que elevadas expressões desse gene estaria associada àqueles de prognóstico ruim.

A recaída está intimamente relacionada à falha terapêutica, nesse sentido, foram investigadas vias de sinalização relacionadas com resistência ao tratamento quimioterápico. Para isso foram selecionados os genes *c-FLIP* e *BIRC5*, os quais as proteínas de c-FLIP e Survivina, respectivamente. Essas têm papel central em mecanismos de resistência, principalmente por promoção de evasão da apoptose promovida pelas drogas. Além disso, ambos os genes sobre tem sua expressão regulada pelo NF- κ B, que, por sua vez, sofre influência da telomerase (uma de suas funções não canônicas mais amplamente descrita).

4.3 Associação de genes relacionados a resistência com a expressão de *hTERT* em LLA-B

Com base na figura 19, foi observado que a expressão relativa de *BIRC 5* apresentou correlação positiva com a expressão de *hTERT*, com valor de p menor que 0,0001 (figura 19, imagem A). Por outro lado, no caso do *cFLIP*, não houve significância estatística (figura 19, imagem B).

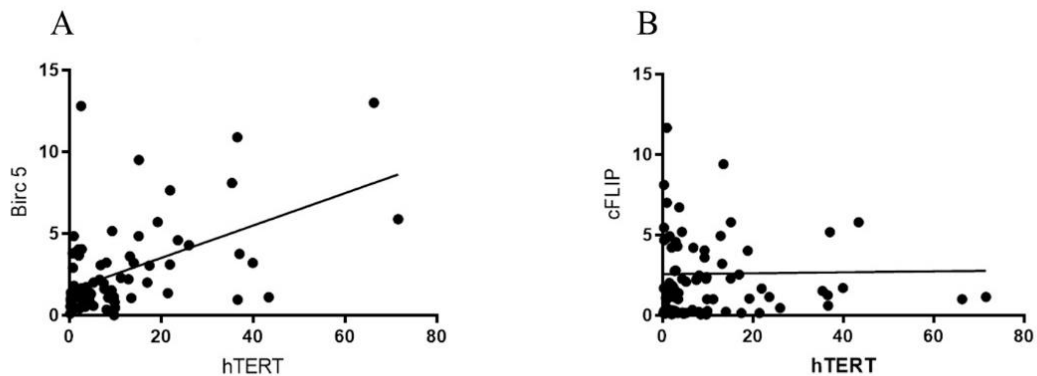


Figura 19. Correlação entre a expressão de *BIRC 5* e *cFLIP* e a expressão de *hTERT* nas amostras. Imagem A. Correlação da expressão relativa de *BIRC 5* com a do *hTERT*, em que $p < 0,0001$ e r de Pearson = 0,51. Imagem B. Correlação da expressão relativa de *cFLIP* com a do *hTERT*, em que $p = 0,9158$.

Devido à correlação identificada entre expressão do *BIRC 5* e do *hTERT*, pensou-se que aquela também estaria associada com a recaída, contudo, o que ficou evidenciado foi que não havia associação entre a expressão de *BIRC 5* com a evolução clínica. Também foi testada correlação entre a expressão de *hTERT* e de *cFLIP*, a qual não apresentou resultado significativo (figura 20, imagens A e B).

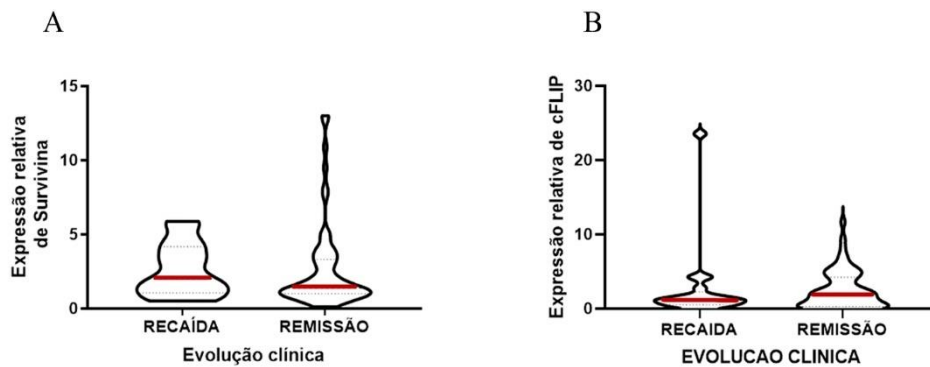


Figura 20. Gráfico de violino demonstrando expressão dos genes *cFLIP* e *BIRC5* em amostras de pacientes divididos segundo evolução clínica. Imagem A. Ausência de associação entre a expressão de *BIRC5* e a evolução clínica ($p=0,37$). Imagem B. Ausência de associação entre a expressão de *cFLIP* e a evolução clínica ($p=0,59$).

Embora as expressões de *BIRC 5* e *cFLIP* não tenham sido associadas a indicadores clínicos, ambos os genes podem ter influência na resposta terapêutica. Nesse sentido, a correlação da expressão de *hTERT* com a do *BIRC 5* reforça a hipótese de que a predisposição à recaída nos pacientes com elevada expressão de telomerase poderia ter vínculo com a resistência à quimioterapia. Nesse aspecto, buscou-se identificar, *in vitro*, se a telomerase influencia a resposta a quimioterápicos utilizados no tratamento de LLA-B, sendo eles a doxorubicina (DOXO) e o metotrexato (MTX).

4.4 Atividade *in vitro* da telomerase na resposta de linhagens leucêmicas a quimioterápicos

O MST-312 é um inibidor da telomerase amplamente conhecido capaz de induzir a parada do ciclo celular por promover dano telomérico. Nesse estudo foram utilizadas as combinações de MST-312 com DOXO ou MTX a fim de avaliar se a influência da telomerase na resposta a esses quimioterápicos.

Para identificar qual o melhor tempo de exposição ao MST-312, foram realizados testes de viabilidade celular em 24, 48 e 72 horas de exposição nas linhagens de LLA-B: NALM-6, 697, RS4:11 e Reh.

Em todas as linhagens houve atividade citotóxica do MST-312, de modo tempo e dose dependentes (figura 21, imagens A-D). Dos dados, deduz-se que após 24 horas não ocorreu redução superior a 50% da viabilidade em nenhuma das linhagens, impossibilitando o cálculo de IC50%. Por outro lado, os testes feitos em 48 e 72 horas demonstraram redução da

viabilidade a níveis próximos da totalidade nas maiores concentrações. Da mesma forma, as linhagens de NALM-6 e de RS 4:11 no tempo maior de exposição, 72 horas, mostraram-se mais sensíveis ao composto (Figura 21, imagens A e C). Nesse aspecto priorizou-se a combinação de MST-312 com DOXO ou MTX com 72 horas de exposição.

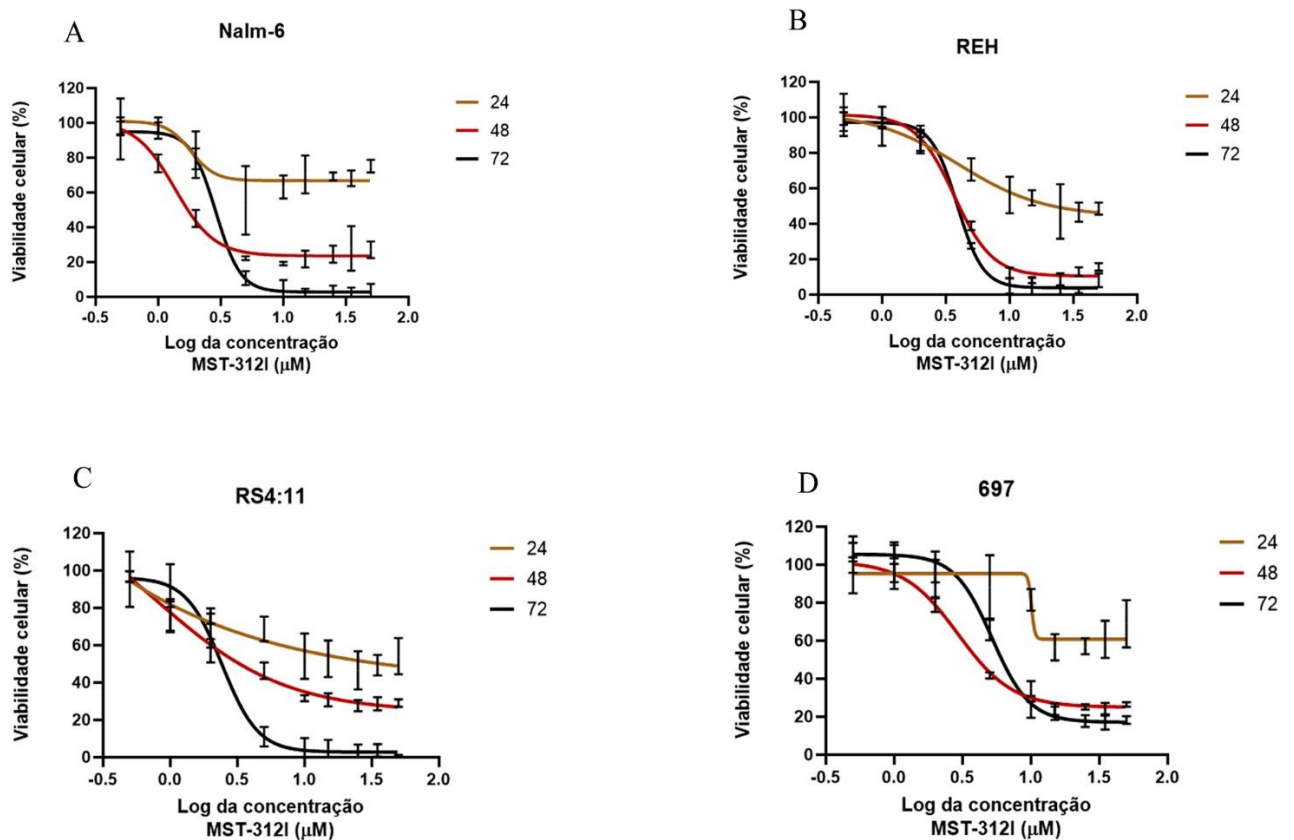


Figura 21. Teste de viabilidade celular nas linhagens de NALM-6, Reh, RS4:11 e 697 nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição ao MST-312. As concentrações testadas variaram de 0,5 a 50μM.

Os quimioterápicos testados também apresentaram efeito dose dependente em todas as linhagens no tempo de 72 horas de exposição, sendo a DOXO mais eficaz na Reh e na NALM-6 (figura 22, imagem A). O MTX foi mais tóxico em NALM-6 e em RS4:11 (figura 22, imagem B) e aparentemente a linhagem de 697 foi a mais resistente para ambos os compostos.

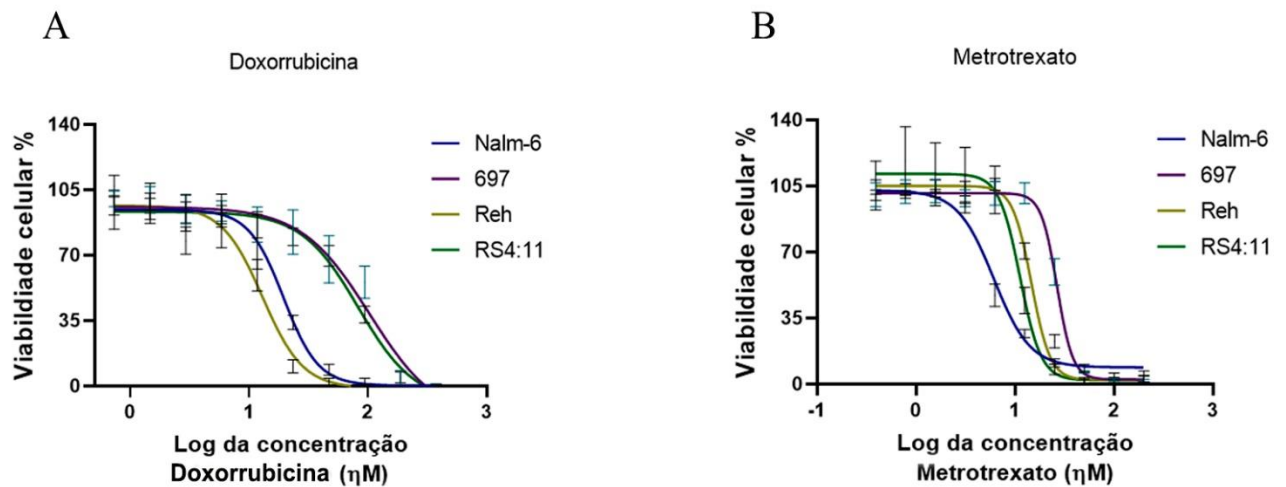


Figura 22. Teste de viabilidade celular nas linhagens de NALM-6, Reh, RS4:11 e 697 no tempo de 72 horas de exposição aos dois quimioterápicos testados. Imagem A. tratamento com doxorubicina. Imagem B. Tratamento com metotrexato.

Para saber se o inibidor de telomerase MST-312 atuaria com sinergismo quando associado com os quimioterápicos foi necessário identificar uma concentração subtóxica do composto. Assim, foi utilizado como parâmetro inicial o teste de viabilidade de 72 horas em que as maiores concentrações não tóxicas foram de 0,5 e 1 μ M para todas as linhagens. A concentração de 2 μ M (usualmente utilizada em teste de inibição da enzima) não foi selecionada devido ao fato dessa estar próxima do IC50%.

As linhagens foram, então, submetidas ao tratamento combinado, com MST-312 nas concentrações de 0,5 e 1 μ M, e DOXO ou MTX. As concentrações de DOXO variaram em progressão geométrica de razão $\frac{1}{2}$, cuja maior foi de 375 e a menor de 0,73nM. Do mesmo modo, as concentrações de metotrexato variaram de 200 até 0,39nM, com o N=8 para todos os testes.

Consoante mostrado na figura 23, imagens A D, G e H, primeiramente foi realizado o teste com os controles de MST-312 nas concentrações de 0,5 e 1 μ M (comparando com as células exposta apenas ao meio de cultura, composto por RPMI e DMSO 0,1%), os quais não apresentaram toxicidade em nenhuma das linhagens. Posteriormente, foi identificado que não houve efeito sinérgico do MST-312 com o MTX (figura 23 imagens C, I e L), exceto na linhagem de 697, em que houve aparente sinergia com o MST-312 na concentração de 1 μ M (figura 23, imagem F).

Por outro lado, a combinação de DOXO com MST-312 apresentou efeito sinérgico em todas as linhagens. No caso da NALM-6 essa sinergia foi aumentada na concentração do inibidor de 1 μM quando comparada com 0,5 μM (figura 23, imagem B). O efeito da combinação se acentua principalmente nas concentrações intermediárias do quimioterápico. Também foi possível estimar a diferença de sensibilidade pelo cálculo IC50%, que reduziu 63,13%, passando de 18,31nM para 6,2nM (Tabela 6).

Na linhagem 697 o efeito foi menos aparente, todavia ainda presente, já que na concentração de 0,5 μM não ocorreu diferença estatística, mas essa foi evidenciada a 1 μM (figura 23, imagem E). Igualmente a NALM-6, a 697 também teve a IC50% reduzida, sendo 78,87 nM na ausência de MST-312 e 47,53 nM quando em terapia combinada com MST-312 a 1 μM (Tabela 6).

Na linhagem de Reh a terapia combinada foi mais impactante desde as primeiras concentrações testadas, apresentando bom sinergismo entre os compostos (figura 23, imagem H). Da mesma forma que nas outras linhagens, nessa houve redução na IC50%, de 12,83 para 6,86 nM (Tabela 6).

Por fim, a linhagem RS4:11 também demonstrou um sinergismo entre DOXO e MST-312, sendo maior em 1 μM (figura 23, imagem K). Essa linhagem celular foi a que apresentou maior redução de IC50% na terapia combinada, apresentando baixa de 71% - 24,13 para 6,85 nM - (Tabela 6).

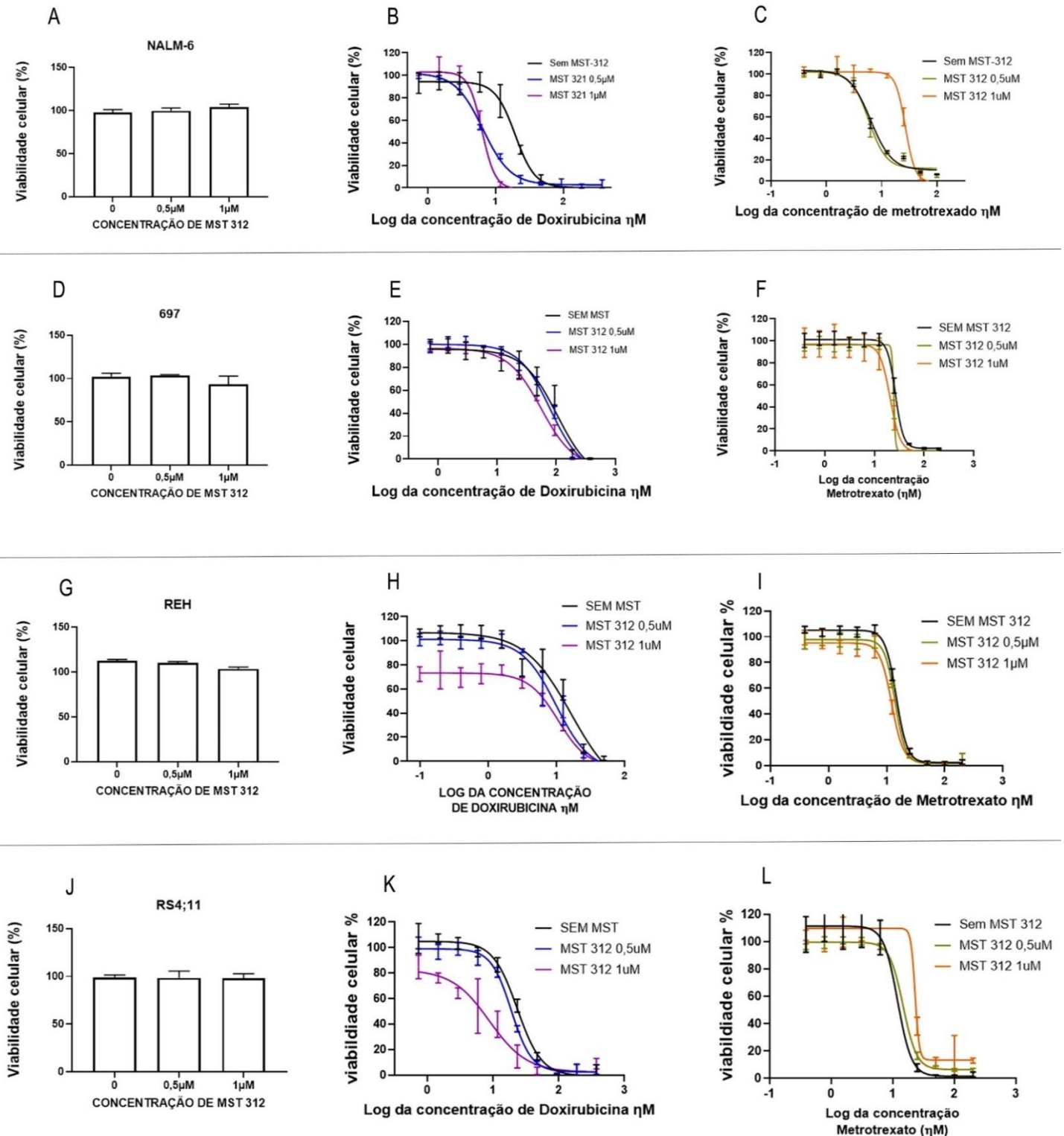


Figura 23. Teste de viabilidade celular em terapia combinada de MST-312 com doxorubicina e metotrexato. Os gráficos A, B e C são de experimentos realizados em NALM-6. Gráficos C, D e E em 697. Gráficos G, H e I em Reh. Gráficos J, K e L em Rs4:11. A. Gráfico de barras, controle, demonstrando que em nenhuma concentração testada de MST-312 apresentou toxicidade por si só na linhagem de NALM-6. B. Regressão não linear que demonstra que as células que apresentaram exposição às maiores concentrações de MST-312 apresentaram maior sinergia a DOXO na linhagem de NALM-6. C. Regressão não linear da combinação de MST-312 com MTX, não foi encontrado nenhuma sinergia entre os compostos. D. Gráfico de barras, controle, demonstrando que em nenhuma concentração testada de MST-312 apresentou toxicidade por si só na linhagem de 697. E. Regressão não linear que demonstra que as células que apresentaram exposição às maiores concentrações de MST-312 apresentaram maior sinergia a DOXO na linhagem de 697. F. Regressão não linear da

combinação de MST-312 com MTX, não foi encontrado nenhuma sinergia entre os compostos. G. Gráfico de barras, controle, demonstrando que em nenhuma concentração testada de MST-312 apresentou toxicidade por si só na linhagem de Reh. H. Regressão não linear que demonstra que as células que apresentaram exposição na concentração de 1 μ M de MST-312 apresentaram maior sinergia a DOXO quando comparada as demais na linhagem de Reh. I. Regressão não linear da combinação de MST-312 com MTX, não foi encontrado nenhuma sinergia entre os compostos. J. Gráfico de barras, controle, demonstrando que em nenhuma concentração testada de MST-312 apresentou toxicidade por si só na linhagem de RS4;11. K. Regressão não linear que demonstra que as células que apresentaram exposição às maiores concentrações de MST-312 apresentaram maior sinergia a DOXO na linhagem de RS4;11. L. Regressão não linear da combinação de MST-312 com MTX, não foi encontrado nenhuma sinergia entre os compostos.

Tabela 6. IC50% e R² de doxorrubina e metotrexato quando combinados com MST-312 nas linhagens de LLA-B (NALM-6, 697, Reh e RS4;11).

Linhagens	□ MST-312 (μM)	R ² DOXO	IC50% DOXO (nM)	R ² MTX	IC50% MTX (nM)
NALM-6	0	0,97	18,31	0,98	7,21
	0,5	0,99	6,75	0,98	6,52
	1	0,98	6,2	0,98	27,05
697	0	0,93	78,87	0,99	26,84
	0,5	0,98	68,83	0,99	24,47
	1	0,99	47,53	0,95	20,37
Reh	0	0,95	12,83	0,99	15,04
	0,5	0,96	9,17	0,99	13,92
	1	0,95	6,86	0,98	12
RS4;11	0	0,98	24,13	0,95	12,74
	0,5	0,99	19,12	0,99	15,16
	1	0,92	6,85	0,94	16,09

Em síntese, todas as linhagens leucêmicas testadas apresentaram maior sensibilidade à DOXO quando combinado com MST-312, principalmente na concentração de 1 μ M. Por outro lado, o mesmo não foi observado para o MTX.

O efeito de sinergia demonstrado com o inibidor de telomerase evidenciou que quando há redução na atividade da enzima ocorre maior sensibilidade ao tratamento, o que pode estar ligado ao fato de que pacientes com maior expressão do gene *hTERT* tenha maior percentual de recaída.

Em baixas concentrações, o MST-312 atua como inibidor da telomerase. Contudo, em concentrações maiores ele pode agir como inibidor da DNA topoisomerase 2. Quando atua como inibidor da telomerase, o composto promove dano no telômero, já ao inibir a

topoisomerase 2, o dano acontece de forma generalizada em todo o DNA. Portanto, o MST-312 pode atuar em outras vias de sinalização não abordadas nesse trabalho, o que dificultaria afirmar que o efeito sensibilizador proporcionado visualizado seja resultante da inibição da atividade da telomerase apenas. Para contornar essa questão, foram realizados experimentos complementares envolvendo produção de células *knockdown* para o gene *hTERT* por meio de siRNA (a produção de células *knockout*, ou seja, completamente sem expressão de telomerase, é inviável, pois o bloqueio completo da enzima é incompatível com a sobrevivência das células em cultura).

A transfecção que resultou no *knockdown* foi realizada em todas as linhagens, e posteriormente foi avaliado a toxicidade de DOXO e MTX nas células que receberam o siRNA de controle de transfecção e na linhagem com *hTERT* subexpresso. Os dados de transfecção e das concentrações que apresentaram significância foram expostos na tabela 7.

A linhagem de NALM-6 foi transfectada com redução na expressão de *hTERT* de 74% em relação ao controle (figura 24, imagem A) e ficou mais sensível a DOXO quando comparada ao controle, mas o MTX não apresentou diferença entre controle e tratado (figura 24, imagens B e C).

Nas células de RS4:11, embora a transfecção tenha reduzido a expressão de *hTERT* em 93% (figura 24, imagem D), a sensibilidade à DOXO foi menos acentuada, contudo ainda presente na concentração de 46,87nM -Tabelas 7- (figura 24, imagem E). Por outro lado, a redução na expressão gênica não influenciou a resposta ao MTX (figura 24, imagem F).

Tabela 7. Aumento da sensibilidade à DOXO em células com redução da expressão de *hTERT* via siRNA. O teste realizado foi o “multiple t test unpaired” com $p < 0,05$.

Linhagens	Redução da expressão de <i>hTERT</i>	[] DOXO nM*	Valor de P
NALM-6	74%	0,73-93,75	<0,0001
697	71%	5,85-23,43	<0,0001
Reh	73%	-	-
697	71%	5,85-23,43	<0,0001
RS4:11	93%	46,87	0,007

*Concentração ou faixa de concentrações cujo efeito citotóxico foi significativamente maior nas células *knockdown* para *hTERT* em relação às células controle.

Na linhagem 697 o knockdown foi de 71% (figura 24, imagem G). Essa linhagem demonstrou maior sensibilidade à DOXO que a linhagem de RS4:11 (figura 24, imagem H). Em compensação, a transfecção não influenciou o efeito do MTX (figura 24, imagem I).

Por fim, a linhagem Reh apresentou redução da expressão de telomerase em 73% (figura 24, imagem J). Contudo, não foi identificada nenhuma diferença estatística entre os grupos transfectado e controle, seja para o tratamento com DOXO ou com MTX (figura 22, imagens K e L).

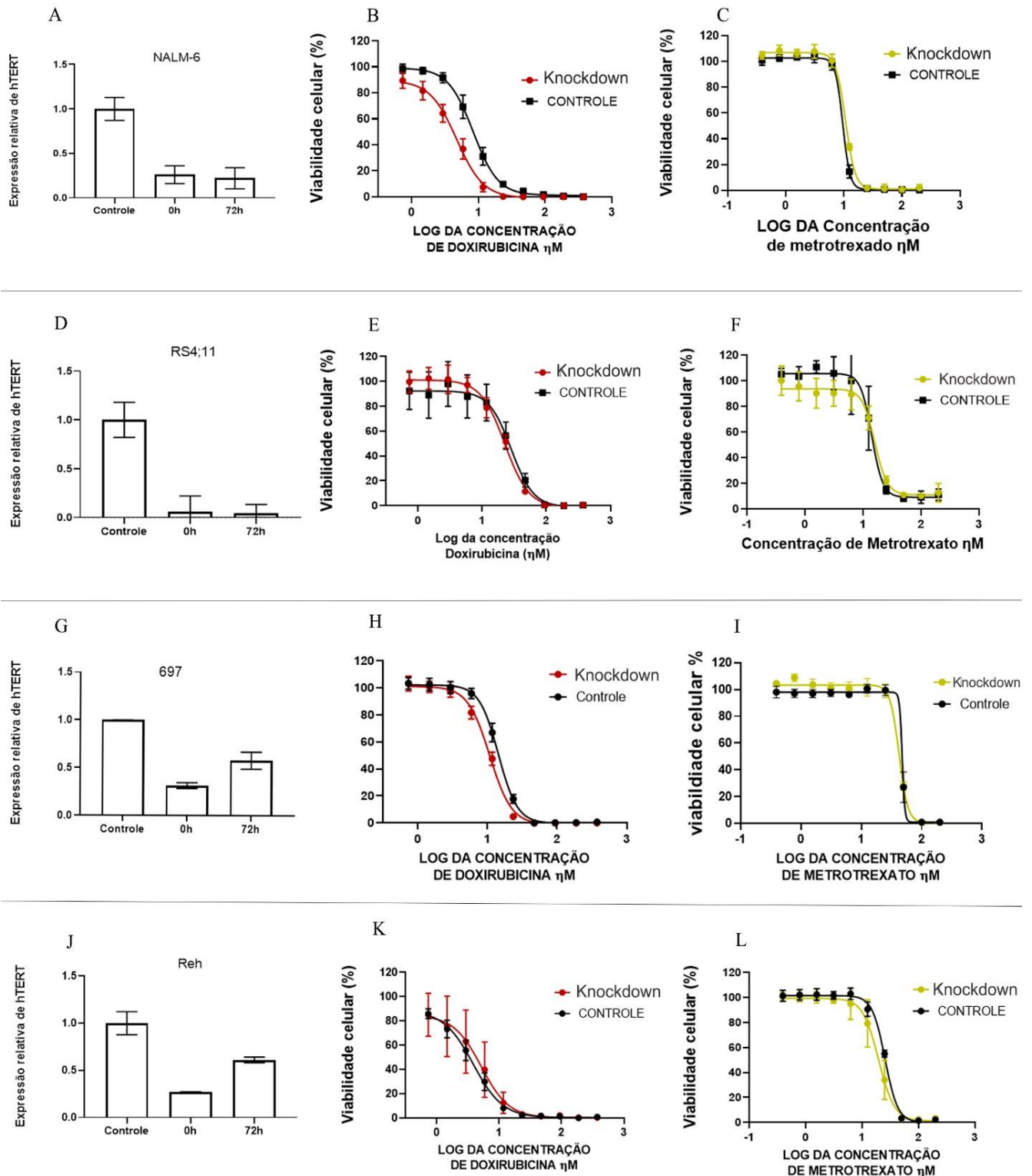


Figura 24. Transfecção com siRNA para *knockdown* de *hTERT* com posterior teste de viabilidade celular utilizando doxorubicina e metotrexato. Os gráficos A, B e C são referentes à linhagem de NALM-6. Gráficos D, E e F para RS4:11. G, H e I para 697 e J, K e L para a linhagem de Reh.

É importante ressaltar que os dados foram obtidos em células *knockdown* para *hTERT*, e não *knockout*, ou seja, células com expressão residual de telomerase. Nesse contexto, mesmo significâncias estatísticas pequenas podem representar efeitos maiores, amenizados por essa expressão residual. No mesmo sentido, as diferenças encontradas nas linhagens NALM-6 e 697 provavelmente seriam ainda maiores que as observadas em um cenário de bloqueio completo da telomerase.

Por fim, constatou-se que a expressão relativa elevada de *hTERT* está significativamente associada a taxas mais altas de recaída. O conjunto de resultados apresentados permite supor que essa associação pode ser atribuída ao fato de que a superexpressão dessa enzima dificulta a eficácia do tratamento, especialmente com doxorubicina, resultando em uma resposta terapêutica inferior e aumentando as chances de recidiva da doença.

5. DISCUSSÃO

Estudos recentes sobre leucemias, em especial LLA-B, vêm cada vez mais tentando elucidar as possíveis causas de recaída e buscando tratamentos que sejam mais eficazes e menos prejudiciais para o paciente (76–80). Nesse contexto, entender melhor os marcadores clínicos convencionais e a evolução clínica ajudariam na efetividade da terapia e em maiores índices de remissão.

A literatura sobre o tema demonstra que a prevalência de LLA-B é maior entre pacientes do sexo masculino (81). Em nosso trabalho, meninos foram maioria, contudo, a diferença foi pequena quando comparada com as meninas. A classificação dos pacientes quanto a raça mostrou que os que se declararam como pardos foram a maioria (82,69% dos casos). Esse dado pode estar relacionado a maior predominância dessa etnia em todo o Brasil, o que repercute também em Brasília.

A maior prevalência de LLA-B em pacientes com idade superior a um ano é comum também segundo a literatura especializada (15). Por outro lado, em pacientes com idade inferior a um ano a doença costuma ser extremamente agressiva e geralmente ocasionada por rearranjo do gene *KMT2A*, que por si só já requer o tratamento de maior risco (82,83).

Outro fator relevante é a síndrome de Down, que está associada ao aumento do risco de LLA-B, principalmente com rearranjo de *CRLF2*. Esta síndrome, por decorrer do acréscimo de um cromossomo 21, está ligada a eventos que afetam a hematopoese, podendo provocar um bloqueio da diferenciação de células B e resultar no aumento da frequência de células tronco hematopoiéticas (84–87).

Outro indicador importante é a leucometria ao diagnóstico, que pode variar desde a leucopenia até contagem elevadas de células (>300000 células/ μL). Segundo a literatura, pacientes com a contagem de leucócitos maior que 50000 células/ μL são considerados de alto risco, e esses são minoria, o que corrobora nossos dados (88,89). Esses achados são relevantes devido ao fato de tais marcadores auxiliarem na estratificação de risco do paciente.

As alterações cromossômicas de hiperdiploidia podem ocorrer na LLA-B infantil chegando em 30% dos casos. Nesse sentido, as alterações mais comuns são a inclusão de cópias dos cromossomos 21, X, 14, 4, 10 e 17. Diante dos fatos já documentados, normalmente as alterações de hiperdiploidia estão associadas ao bom prognóstico, ao passo que a hipodiploidia

vem sendo associada ao ruim (17,90–92). No nosso trabalho, apenas um paciente apresentou hipodiploidia, sendo a maioria com cariótipo não alterado. Além dessas, existem as alterações genéticas pseudodiploide, como as translocações, que são de grande relevância para a triagem de risco da LLA-B.

A translocação ETV6-RUNX1 é a mais prevalente em crianças, chegando a representar 25% dos casos, e geralmente vem associada com bom prognóstico (93). No entanto, a translocação BCR-ABL, que geralmente representa até 5% dos casos, é altamente ligada ao prognóstico ruim devido aos pacientes não responderem bem ao tratamento (94). Outra característica dessa translocação é que sua prevalência aumenta com a idade, sendo mais prevalente em adultos (95). No nosso estudo as proporções estão próximas do descrito, dado que a translocação ETV6-RUNX1 apresentou prevalência em 22,3% e BCR-ABL em 3,8% dos casos.

A translocação TCF3-PBX1 apresenta uma prevalência de 3-5%, tanto em adultos quanto em crianças. Contudo, é relevante ressaltar que nos estudos já realizados essa translocação é bastante ambígua quanto ao valor prognóstico, sendo esse afetado pela etnia do grupo estudado (15,96). Outra translocação relevante é a KMT2A/MLLT3, que impacta negativamente a estratificação de risco dos pacientes. Dentre as mais de 100 translocações que o KMT2A pode performar, as mais comuns são as fusões com AFF1 e com o MLLT3. No entanto, em menos de 5% dos casos de leucemias essas translocações estão presentes (97). Nesse contexto, nossos dados também se mostraram condizentes com a literatura. Além disso, no âmbito do Distrito Federal, a população é heterogênea quanto a etnia e são poucos os estudos que relacionam quadro clínico com translocações específicas.

Outras alterações genéticas relevantes são representadas pelo perfil PH-like, o qual constitui-se como um fator de classificação de alto risco e normalmente vem acompanhado com a deleção de IKZF1, ativação da JAK-STAT, da via RAS, entre outras. Geralmente sua incidência é de 10-15% em crianças, chegando a até 20% em adultos. No presente estudo, a incidência de PH-like foi de 10,91%, o que está de acordo com os dados de diferentes estudos (98–100). Dado que esse tipo de mutação é recorrente e geralmente de mau prognóstico, é relevante explicar que, no âmbito da saúde pública, seria interessante triar de forma mais efetiva os casos de PH-like.

As leucemias que não foram classificadas, chamadas de outras LLA-B, foram a maioria nesse estudo (55%). Isso faz supor a presença de outros subtipos como aqueles com rearranjo

de DUX4, ETV6-RUNX1-like, ZNF384, MYC, MEF2D, NUTM1, PAX5alt, PAX5-P80R entre outros (61,101), os quais têm padrões específicos e cuja identificação requer metodologias não utilizadas no nosso trabalho, como o sequenciamento de genoma completo ou sequenciamento de nova geração. No contexto geral do Brasil, e considerando as políticas públicas existentes, triar os principais subtipos de LLA-B é extremamente importante para melhor caracterizar as leucemias e aumentar ainda mais as taxas de remissão.

Uma técnica fundamental no acompanhamento de doenças hematológicas é a citometria de fluxo, que, no caso da LLA-B, permite realizar a avaliação das doenças residuais mínimas que, no período de tratamento, tem papel chave como indicador de prognóstico. Os períodos de avaliação das DRMs de 15, 33 e 78 dias após a introdução da quimioterapia são amplamente utilizados em diversos laboratórios para a classificação de risco, sendo também já constatada a associação da presença elevada de blastos identificados pelas DRMs com o risco de recidiva da doença (73). Ademais, a avaliação da DRM em 15 dias é fundamental para avaliar como o paciente está respondendo a quimioterapia, sendo a de 33 dias uma ferramenta complementar com um indicativo mais robusto. Por último, em 78 dias já é possível identificar falha ao tratamento.

Neste trabalho, 14,66% dos pacientes apresentaram índice que indica alto risco em D15, sendo que no D33 esse percentual é reduzido para 5,4% e no D78 ocorre um leve aumento para 9,2%. Tal fato ocorre porque no D15 o tratamento ainda está em progresso. Porquanto, a DRM nesse espaço de tempo inicial é fundamental para que haja rápidas decisões a respeito do tratamento (102).

No D33 e D78 a terapia já está mais consolidada, o que evidencia menor número de pacientes com classificação de alto risco. Isso pode ser devido à estratificação de risco promovida pelo D15 que faz com que esses pacientes sejam tratados da forma mais eficiente, o que faz decaírem os índices de alto risco em 33 e 78 dias, ou pode estar relacionado ao maior tempo de quimioterapia que, em muitos casos, começa a produzir efeito promovendo a melhora clínica e a redução de blastos clonais circulantes (103).

VROOMAN *et al.*, em seu estudo, estratificaram pacientes com base na doença residual mínima de 33 dias com aproximadamente 8% deles classificados como de alto risco, semelhante aos dados do nosso trabalho. O risco atribuído ao paciente auxilia na aplicação do protocolo de tratamento mais efetivo, o que promove maiores índices de remissão.

Atualmente os índices de remissão dos pacientes pediátricos excedem 90%, contudo, aproximadamente 20% desses recaem e 10% continuam incuráveis (80). No nosso trabalho os índices estão próximos desses dados, sendo a taxa de remissão de 89,88%, recaída de 21% e óbitos 10,12%.

No contexto do tratamento das leucemias, a recaída é um problema vigente, justificando os esforços para uma terapia mais eficaz. A recaída tem relação com diversos mecanismos de resistência celular a fármacos, como mutações em receptores de glicocorticoides como A484D, P515H, L756N, Y663H, L680P, e R714W0, em que as células se tornam menos responsivas aos corticoides (105), ao metotrexato (106) e à doxorrubicina, quando as células passam a apresentar altos níveis de ABCA2, promovendo a redução da atuação desse composto por ativar ERK1 e ERK2 (107). Contudo, os mecanismos de resistência que levam à recaída ainda não estão totalmente elucidados, o que indica uma brecha na literatura sobre o tema (61,80,108).

Nesse estudo, a expressão da telomerase apresentou associação com a recaída, e por ser uma enzima relacionada com diversas vias de sinalização e com a constituição de diferentes tipos de tumores, essa apresenta alto potencial de exploração em estudos adicionais sobre LLA-B (109,110). No caso das leucemias, a desregulação do *hTERT* afeta gravemente o prognóstico da doença, estando associado a modificações epigenéticas, mutações e a variações estruturais (58).

A fim de avaliar a relevância da expressão do *hTERT* ao diagnóstico em amostras de crianças com LLA-B, foi feito primeiramente o histograma para identificar a distribuição da expressão gênica da telomerase, que demonstrou que a expressão relativa de *hTERT* tem distribuição assimétrica com deslocamento para a direita. Dada a importância da expressão da telomerase para o desenvolvimento e manutenção das células cancerosas, é esperado que essa esteja muito expressa para a manutenção da doença, o que explica o desvio à direita. Ademais, o processo de regulação telomérico apresenta assimetria por ser multifatorial, baseando-se em aspectos genéticos, estilos de vida e influências ambientais, o que implica alguns pacientes terem maiores telômeros que outros (111). Não é estranho que a expressão da telomerase acompanhe o comprimento telomérico quanto à distribuição assimétrica dos dados conforme visto nesse estudo.

Outro conhecido marcador de risco para LLA-B é a idade. Ao ser relacionada com a expressão de *hTERT*, essa variável demonstrou associação positiva, o que fortalece a hipótese de que a telomerase tem relação com o prognóstico adverso (79). Contudo, não era esperado tal

relação em crianças, uma vez que indivíduos jovens normalmente não apresentam comprometimento fisiológico dos telômeros que justifique a variação na expressão da telomerase. Além disso, nos leucócitos, a telomerase apresenta-se expressa mesmo nas células saudáveis. Com base no exposto, a correlação encontrada nesse trabalho entre a idade e a expressão de *hTERT* aumentada deve se dar por razões patológicas e provavelmente devido às funções não canônicas dessa enzima. Assim, foram testadas associações de outros fatores clínicos com a expressão desse gene.

Os valores de DRM, com a classificação do sub tipo de linhagem celular envolvida no processo neoplásico, desempenham papel essencial na confirmação do diagnóstico (112). Essa abordagem é extremamente sensível para detecção de recaídas, estando associadas à positividade na DRM de 33, 78 e 84 dias (89,113,114). No atual trabalho, não foi identificada associação entre recaída e a DRM de 33 dias. Contudo, foi observada uma associação significativa com a DRM de 78 dias, quando os pacientes de alto risco apresentaram uma expressão aumentada de *hTERT*. Do mesmo modo, também foram identificadas associações da DRM de 78 dias com a expressão relativa de *hTERT*, no sentido de que pacientes de alto risco (>0,01%) apresentaram maior expressão, ao passo que os de baixo risco menor expressão do gene. Nesse âmbito, as DRMs são utilizadas para orientar o tratamento visando obter a melhor evolução clínica do paciente, sendo que o *hTERT*, mais uma vez, está associado a um prognóstico desfavorável.

Ao ser avaliada a evolução clínica do paciente em relação à expressão de *hTERT*, foi possível concluir que, de fato, há significância na diferença entre os valores dessa variável, no sentido de que pacientes com recaída apresentam maior expressão de telomerase do que aqueles em remissão. Contudo, não foi identificada a relação da expressão de *hTERT* com a taxa de óbito, diferente do encontrado na literatura, em que já foi visto relação entre o aumento da atividade da telomerase e a menor sobrevida em crianças (115).

A recaída é um aspecto clínico extremamente debatido nos trabalhos científicos com a finalidade de ter o melhor entendimento dos seus mecanismos de ocorrência e para realizar o tratamento mais efetivo (116–118). Outros estudos já haviam demonstrado que a telomerase está associada ou com a taxa de sobrevida, ou que atua como um biomarcador proeminente para o desenvolvimento da doença (29,58,119). No entanto, o presente estudo identificou especificamente a associação entre a supraexpressão de *hTERT* e a ocorrência de recaída na LLA-B.

A associação da expressão de *hTERT* com a recaída pode contribuir na seleção do protocolo de tratamentos clínicos mais eficazes por auxiliar na escolha da melhor terapia, dando maior margem para a conduta correta. Contudo, não é possível afirmar que seria um marcador de risco independente, mas complementar - juntamente das doenças residuais mínimas, idade entre outros indicadores - para classificação de risco dos pacientes. Nesse contexto, buscou-se identificar os mecanismos dessa associação; especificamente se estaria vinculada a perfis moleculares mais severos, instabilidade genética, ou com uma possível influência da telomerase na resposta à quimioterapia.

As alterações genéticas continuam sendo um dos principais marcadores de instabilidade genética e leucemogênese em pacientes com LLA-B. A translocação ETV6-RUNX1 é associada ao bom prognóstico (112), em sentido diverso, as outras (BCR-ABL, PH-like, MLL e TCF3-PBX) geralmente indicam prognóstico ruim. Sobretudo, todas fazem parte de um grande rol de modificações estruturais para terapia específica (120).

Neste estudo foi visto que pacientes com LLA-B do subtipo ETV6-RUNX1 apresentaram baixa expressão de telomerase em leucócitos ao diagnóstico quando comparado com os demais subtipos. Por ser um marcador de bom prognóstico tal achado ajuda a corroborar nossa hipótese de que, quanto maior a expressão de *hTERT*, pior o prognóstico.

Os pacientes com as leucemias não classificadas apresentaram elevado nível de expressão do *hTERT*. Esse grupo é bastante heterogêneo, podendo ser formado por pacientes com distintas modificações cromossômicas nas células leucêmicas, o que dificulta a estratificação de risco (121,122). Nesse aspecto, um marcador de mal prognóstico como a telomerase pode, em certa medida, compensar a ausência de classificações convencionais para a estratificação de risco na LLA-B, a fim de direcionar para o melhor protocolo de tratamento. Nesse sentido, a associação do *hTERT* com as leucemias não classificadas pode ser de extrema relevância no contexto de políticas públicas, uma vez que os recursos orçamentários são limitados e o desenvolvimento e aplicação de novas técnicas apresentam altos custos.

Muito embora a telomerase tenha relação com as alterações cromossômicas das translocações, essas não parecem ser fator determinante na associação entre telomerase e recaída. Nesse sentido, foi investigado se a expressão do *hTERT* teria relação com a resposta à terapia. Assim posto, foram investigados dois genes relacionados à resistência, e cujas expressões são influenciadas pela telomerase, dada sua atividade não canônica. São eles os genes *cFLIP* e *BIRC5*.

O cFLIP é uma proteína anti-apoptótica que, quando em elevada concentração, consegue aumentar a sobrevivência das células neoplásicas auxiliando nos mecanismos de escape ao tratamento (123). A survivina (codificada pelo gene *BIRC5*), por sua vez, possui dupla função: de atividade anti-apoptótica e de regulação da divisão celular, e também já foi evidenciado seu papel na resistência das células tumorais à quimioterapia e à radioterapia. A redução da expressão gênica do *BIRC5* reduz o crescimento tumoral por aumentar a apoptose, promovendo sensibilização ao tratamento (124). De fato, ambas as proteínas estão relacionadas com resistência celular a diversos tratamentos em muitos tipos de câncer (97,125,126,126,127), mas foram pouquíssimos explorados nas LLA-B infantil.

No atual trabalho, foi identificada correlação positiva entre a expressão de *hTERT* e de *BIRC5*, no entanto, não foi vista associação significativa da expressão desse com a evolução clínica. Cabe ressaltar que foi avaliada apenas a transcrição gênica, a tradução da proteína precisaria ser analisada para permitir inferências acerca dessa ausência de significância. Quanto à expressão de *cFLIP*, não apresentou associação com nenhum dos parâmetros testados.

A correlação das expressões relativas de *BIRC5* e *hTERT*, sem impacto direto no perfil clínico, demonstra indícios de que a telomerase está atuando por diversas vias na piora da resposta a terapia. Para testar a hipótese de forma, mas direta, foram utilizados dois quimioterápicos convencionais – metotrexato e doxorrubicina- em associação com o inibidor da atividade da telomerase MST-312, em cultura de células das linhagens NALM-6, Reh, 697 e RS4:11.

O metotrexato é um antagonista de folato que inibe proteínas da via de biossíntese de purinas. A inibição da síntese de ácido nucleico leva ao efeito tóxico da droga, principalmente para as células de rápida proliferação. Além do exposto, o MTX reduz a viabilidade de leucócitos e neutrófilos durante a resposta inflamatória por intermédio da sinalização do NF- κ B (128).

A doxorrubicina é um antibiótico antracíclico utilizado como quimioterápico em uma vasta quantidade de tumores. Seu mecanismo de ação envolve intercalação nos pares de base do DNA resultando na quebra desse e prevenindo a síntese de RNA e DNA. Além disso, também estimula a apoptose por inibir a topoisomerase 2 (129,130).

O MST-312 atua nas células neoplásicas através do efeito agudo citotóxico que causa dano telomérico devido a inibição da atividade da telomerase (131). Assim posto, nesse trabalho

buscou-se identificar se a inibição química da atividade da telomerase alteraria a resposta das células aos quimioterápicos.

Já havia sido demonstrado que o MST-312, quando combinado com doxorrubicina, promove inibição do crescimento celular e indução de apoptose de modo sinérgico nas linhagens de Nalm-6 e Reh (59). Neste trabalho, o inibidor de telomerase apresentou sinergia com as drogas, especialmente DOXO, em todas as linhagens testadas, especialmente na concentração de 1 μ M. Assim posto, infere-se que quando a célula tem reduzida a ação da telomerase, torna-se mais sensível à DOXO. Outro pressuposto que pode ser inferido desses dados é que a sinergia apresentada tem potencial aplicação clínica, já que o MST-312 agiu como adjuvante da doxorrubicina. O potencial do MST-312 para o possível uso clínico já foi demonstrado em outros modelos de câncer, como em glioblastoma, câncer de pulmão e adenocarcinoma de ovário (131–133).

A despeito desses resultados, é importante ressaltar que o MST-312 não atua de forma específica como inibidor da telomerase. De fato, essa droga tem a ação de reduzir a atividade canônica dessa enzima, mas pode atuar em vias distintas, como na inibição de topoisomerase 2, o que leva a danos no DNA e posterior morte celular (131). Portanto, foi necessário realizar a inibição parcial da expressão do *hTERT* para gerar dados complementares. Nesse contexto, foi realizada a transfecção com siRNA, e foi visto que em 3 das 4 linhagens testadas houve a infra expressão dessa enzima, o que resultou em aumento da sensibilidade a DOXO.

A sensibilidade nas linhagens testadas apresentou significância estatística mesmo com baixo deslocamento da curva quando comparada com os controles. De modo esperado, tal deslocamento é pequeno provavelmente devido à expressão residual do *hTERT*, que mesmo nas células em *knockdown* consegue desempenhar efeito biológico significativo. Possivelmente a inibição total mostraria efeito maior, porém, o *knockout* da telomerase é incompatível com a viabilidade celular, o que impossibilitou essa abordagem. Assim posto, mesmo sendo sutil, o efeito foi significativo, demonstrando que, em células com menor expressão de *hTERT*, há maior sensibilidade à terapia com DOXO, indicando possível explicação biológica para a associação encontrada entre expressão relativa de *hTERT* e a recaída.

A telomerase vem sendo estudada como um potencial alvo para o tratamento de diferentes tipos de cânceres (58,134,135). Na LLA-B seu papel ainda não é muito bem estabelecido, contudo, já foi visto que a expressão aumentada do *hTERT* está relacionada com

menor taxa de sobrevida (58), como também que em blastos clonais com maior atividade da telomerase a doença tende a ser de maior prognóstico (29).

Esse estudo demonstrou que a elevada expressão de *hTERT* tem associação com diversos marcadores clínicos de prognóstico ruim como a elevada idade, a maior estratificação de risco na DRM de 78 dias, bem como com a piora da evolução clínica. Além disso, foi demonstrado que a expressão de *BIRC5* está correlacionada com a de *hTERT*, o que sugere papel da telomerase no desenvolvimento de resistência.

Por fim, a estratégia metodológica que faz uso do inibidor MST-312 combinado com quimioterápicos abre a perspectiva de associações dessa natureza na proposta de novos esquemas terapêuticos que se utilizem da inativação das propriedades pró-oncogênicas da telomerase para melhorar a resposta a drogas convencionais.

6. CONCLUSÃO

Os dados clínicos obtidos nesta pesquisa são congruentes com os parâmetros descritos na literatura internacional. Adicionalmente, identificou-se uma associação significativa entre a expressão elevada de *hTERT* e indicadores de prognóstico desfavorável, como idade avançada, positividade na DRM de 78 dias e, principalmente, piora na evolução clínica com maior chance de recidiva. Esses resultados demonstram o potencial da expressão da telomerase como um possível biomarcador.

As associações entre a telomerase e os perfis moleculares estudados não apresentaram um efeito claro para compreender o mecanismo subjacente que leva à associação entre a alta expressão de *hTERT* e o risco aumentado de recidiva da doença. No entanto, a ação potencializadora do efeito da doxorubicina promovida pelo inibidor MST-312 sugere papel da telomerase na falha terapêutica, fornecendo uma base para se compreender o possível mecanismo pelo qual a telomerase está envolvida na piora da evolução clínica da doença. Essas descobertas podem ser importantes para descrição de novos biomarcadores e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento da LLA-B.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Chen Z, Xin Q, Wei W, Wu Y. The pathogenesis and development of targeted drugs in acute T lymphoblastic leukemia. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2023 Jan 9; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.16029>
2. Inaba H, Pui C-H. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Apr 29;10(9):1926. Available from: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/9/1926>
3. Marcotte EL, Spector LG, Mendes-de-Almeida DP, Nelson HH. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Front Pediatr* [Internet]. 2021 Apr 23;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fped.2021.639479/full>
4. Tran TH, Hunger SP. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and precision medicine opportunities. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2022 Sep;84:144–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X20302182>
5. Chennamadhavuni A, Lyengar V, Mukkamalla SKR, Shimanovsky A. Leukemia [Internet]. *StatPearls*. 2023. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254>
6. Cao H-Y, Wan C-L, Xue S-L. Comparing the efficacy of salvage regimens for relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukaemia: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Hematol* [Internet]. 2023 Jan 17;102(1):155–65. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00277-022-05040-1>
7. Santos MM dos, Santos AS dos, Santos HH de M, Santos L da S, Nascimento RJM, Torres AJL. Immunophenotypic characterization of acute leukemias in Bahia, Brazil. *einstein (São Paulo)* [Internet]. 2022 Dec 19;21. Available from: <https://journal.einstein.br/article/immunophenotypic-characterization-of-acute-leukemias-in-bahia-brazil/>
8. Della Starza I, De Novi LA, Elia L, Bellomarino V, Beldinanzi M, Soscia R, et al. Optimizing Molecular Minimal Residual Disease Analysis in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2023 Jan 6;15(2):374. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/2/374>
9. Blaeschke F, Willier S, Stenger D, Lepenies M, Horstmann MA, Escherich G, et al. Leukemia-induced dysfunctional TIM-3+CD4+ bone marrow T cells increase risk of relapse in pediatric B-precursor ALL patients. *Leukemia* [Internet]. 2020 Oct 13;34(10):2607–20. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41375-020-0793-1>
10. Duell J, Dittrich M, Bedke T, Mueller T, Eisele F, Rosenwald A, et al. Frequency of regulatory T cells determines the outcome of the T-cell-engaging antibody blinatumomab in patients with B-precursor ALL. *Leukemia* [Internet]. 2017 Oct 25;31(10):2181–90. Available from: <http://www.nature.com/articles/leu201741>
11. Dworzak MN, Buldini B, Gaipa G, Ratei R, Hrusak O, Luria D, et al. AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2018 Jan;94(1):82–93. Available from:

- <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.21518>
12. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch* [Internet]. 2023 Jan 24;482(1):11–26. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00428-022-03448-8>
 13. Pastorczak A, Domka K, Fidyk K, Poprzeczko M, Firczuk M. Mechanisms of immune evasion in acute lymphoblastic leukemia. *Cancers (Basel)*. 2021;13(7):1–25.
 14. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2020;105(11):2524–39.
 15. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2020 Sep 10;105(11):2524–39. Available from: <https://haematologica.org/article/view/haematol.2020.247031>
 16. Colunga-Pedraza PR, Colunga-Pedraza JE, Peña-Lozano SP, Gómez-De León A, Ruiz-Delgado GJ, Ribeiro RC. Diagnosis and treatment of acute lymphoblastic leukemia in Latin America. *Hematology* [Internet]. 2022 Dec 31;27(1):971–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/16078454.2022.2117119>
 17. Chen Z, Sun Y, Xie W, Wang SA, Hu S, Li S, et al. Is hyperdiploidy a favorable cytogenetics in adults with B-lymphoblastic leukemia? *Cancer Med*. 2019;8(9):4093–9.
 18. Oshima K, Zhao J, Pérez-Durán P, Brown JA, Patiño-Galindo JA, Chu T, et al. Mutational and functional genetics mapping of chemotherapy resistance mechanisms in relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Nat Cancer* [Internet]. 2020 Nov 19;1(11):1113–27. Available from: <http://www.nature.com/articles/s43018-020-00124-1>
 19. Evensen NA, Madhusoodhan PP, Meyer J, Saliba J, Chowdhury A, Araten DJ, et al. MSH6 haploinsufficiency at relapse contributes to the development of thiopurine resistance in pediatric B-lymphoblastic leukemia. *Haematologica* [Internet]. 2018 May;103(5):830–9. Available from: <http://www.haematologica.org/lookup/doi/10.3324/haematol.2017.176362>
 20. Fielding AK, Richards SM, Chopra R, Lazarus HM, Litzow MR, Buck G, et al. Outcome of 609 adults after relapse of acute lymphoblastic leukemia (ALL); an MRC UKALL12/ECOG 2993 study. *Blood* [Internet]. 2007 Feb 1;109(3):944–50. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/109/3/944/23882/Outcome-of-609-adults-after-relapse-of-acute>
 21. Zeng XL, Heneghan MB, Badawy SM. Adherence to Oral Chemotherapy in Acute Lymphoblastic Leukemia during Maintenance Therapy in Children, Adolescents, and Young Adults: A Systematic Review. *Curr Oncol* [Internet]. 2023 Jan 5;30(1):720–48. Available from: <https://www.mdpi.com/1718-7729/30/1/56>
 22. Revy P, Kannengiesser C, Bertuch AA. Genetics of human telomere biology disorders. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2023 Feb 23;24(2):86–108. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41576-022-00527-z>
 23. Hastings WJ, Shalev I, Belsky DW. Translating Measures of Biological Aging to Test Effectiveness of Geroprotective Interventions: What Can We Learn from Research on Telomeres? *Front Genet* [Internet]. 2017 Nov 22;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2017.00164/full>

24. López-Otín C, Pietrocola F, Roiz-Valle D, Galluzzi L, Kroemer G. Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metab* [Internet]. 2023 Jan;35(1):12–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413122004922>
25. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217(1):65–77.
26. Dewhurst SM, Yao X, Rosiene J, Tian H, Behr J, Bosco N, et al. Structural variant evolution after telomere crisis. *Nat Commun*. 2021;12(1):1–17.
27. Lim CJ, Cech TR. Shaping human telomeres: from shelterin and CST complexes to telomeric chromatin organization. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2021 Apr 9;22(4):283–98. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41580-021-00328-y>
28. Lalonde M, Chartrand P. TERRA, a Multifaceted Regulator of Telomerase Activity at Telomeres. *J Mol Biol* [Internet]. 2020 Jul;432(15):4232–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022283620301546>
29. Karow A, Haubitz M, Oppliger Leibundgut E, Helsen I, Preising N, Steiner D, et al. Targeting Telomere Biology in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jun 22;22(13):6653. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/13/6653>
30. Eskandari-Nasab E, Dahmardeh F, Rezaeifar A, Dahmardeh T. Telomere and Telomerase: From Discovery to Cancer Treatment. *Gene, Cell Tissue* [Internet]. 2015 Jul 25;2(3). Available from: <https://brieflands.com/articles/gct-14819.html>
31. Banszerus VL, Vetter VM, Salewsky B, König M, Demuth I. Exploring the Relationship of Relative Telomere Length and the Epigenetic Clock in the LipidCardio Cohort. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jun 21;20(12):3032. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/12/3032>
32. Canudas S, Becerra-Tomás N, Hernández-Alonso P, Galié S, Leung C, Crous-Bou M, et al. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr* [Internet]. 2020 Nov 16;11(6):1544–54. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/11/6/1544/5879005>
33. Galiè S, Canudas S, Muralidharan J, García-Gavilán J, Bulló M, Salas-Salvadó J. Impact of Nutrition on Telomere Health: Systematic Review of Observational Cohort Studies and Randomized Clinical Trials. *Adv Nutr* [Internet]. 2020 May 1;11(3):576–601. Available from: <https://academic.oup.com/advances/article/11/3/576/5613358>
34. Srinivas N, Rachakonda S, Kumar R. Telomeres and Telomere Length: A General Overview. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2020 Feb 28;12(3):558. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/558>
35. Liddiard K, Grimstead JW, Cleal K, Evans A, Baird DM. Tracking telomere fusions through crisis reveals conflict between DNA transcription and the DNA damage response. *NAR Cancer*. 2021;3(1):1–20.
36. Jacome Burbano MS, Gilson E. The Power of Stress: The Telo-Hormesis Hypothesis. *Cells*. 2021;10(5):1–21.
37. Pinzaru AM, Kareh M, Lamm N, Lazzerini-Denchi E, Cesare AJ, Sfeir A. Replication stress conferred by POT1 dysfunction promotes telomere relocalization to the nuclear pore. *Genes Dev*. 2020;34(23–24):1619–36.

38. Virseda-Berdices A, Concostrina-Martinez L, Martínez-González O, Blancas R, Resino S, Ryan P, et al. Relative telomere length impact on mortality of COVID-19: Sex differences. *J Med Virol* [Internet]. 2023 Jan 19;95(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.28368>
39. Vulsteke J-B, Smith V, Bonroy C, Derua R, Blockmans D, De Haes P, et al. Identification of new telomere- and telomerase-associated autoantigens in systemic sclerosis. *J Autoimmun* [Internet]. 2023 Feb;135:102988. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841122001962>
40. Rossiello F, Jurk D, Passos JF, d'Adda di Fagagna F. Telomere dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2022 Feb 14;24(2):135–47. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41556-022-00842-x>
41. de Bardet JC, Cardentey CR, González BL, Patrone D, Mulet IL, Siniscalco D, et al. Cell Immortalization: In Vivo Molecular Bases and In Vitro Techniques for Obtention. *BioTech* [Internet]. 2023 Jan 28;12(1):14. Available from: <https://www.mdpi.com/2673-6284/12/1/14>
42. Judasz E, Lisiak N, Kopczyński P, Taube M, Rubiś B. The Role of Telomerase in Breast Cancer's Response to Therapy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Oct 25;23(21):12844. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/21/12844>
43. He Y, Feigon J. Telomerase structural biology comes of age. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2022 Oct;76:102446. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959440X22001257>
44. Rubtsova M, Dontsova O. Human Telomerase RNA: Telomerase Component or More? *Biomolecules* [Internet]. 2020 Jun 6;10(6):873. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/10/6/873>
45. Rafat A, Dizaji Asl K, Mazloui Z, Movassaghpour AA, Farahzadi R, Nejati B, et al. Telomerase-based therapies in haematological malignancies. *Cell Biochem Funct* [Internet]. 2022 Mar;40(2):127–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbf.3687>
46. Vishwakarma K, Dey R, Bhatt H. Telomerase: A prominent oncological target for development of chemotherapeutic agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2023 Mar;249:115121. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0223523423000363>
47. Thompson CAH, Wong JMY. Non-canonical Functions of Telomerase Reverse Transcriptase: Emerging Roles and Biological Relevance. *Curr Top Med Chem* [Internet]. 2020 Apr 13;20(6):498–507. Available from: <http://www.eurekaselect.com/178901/article>
48. da Mota THA, Camargo R, Biojone ER, Guimarães AFR, Pittella-Silva F, de Oliveira DM. The Relevance of Telomerase and Telomere-Associated Proteins in B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes (Basel)* [Internet]. 2023 Mar 10;14(3):691. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/3/691>
49. Marinaccio J, Micheli E, Udroui I, Di Nottia M, Carozzo R, Baranzini N, et al. TERT Extra-Telomeric Roles: Antioxidant Activity and Mitochondrial Protection. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Feb 23;24(5):4450. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4450>

50. Sheng W-Y, Chen Y-R, Wang T-C V. A major role of PKC θ and NF κ B in the regulation of hTERT in human T lymphocytes. *FEBS Lett* [Internet]. 2006 Dec 22;580(30):6819–24. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2006.11.044>
51. Huangfu J, Hao C, Wei Z, Wormstone IM, Yan H, Fan X. Cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) critically maintains apoptotic resistance in human lens epithelial cells. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021;12(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-021-03683-y>
52. Leveille E, Johnson NA. Genetic Events Inhibiting Apoptosis in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(9):2167.
53. Alsheikh HAM, Metge BJ, Pruitt HC, Kammerud SC, Chen D, Wei S, et al. Disruption of STAT5A and NMI signaling axis leads to ISG20-driven metastatic mammary tumors. *Oncogenesis* [Internet]. 2021;10(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41389-021-00333-y>
54. Peng HY, Hsiao JR, Chou ST, Hsu YM, Wu GH, Shieh YS, et al. MiR-944/CISH mediated inflammation via STAT3 is involved in oral cancer malignance by cigarette smoking. *Neoplasia (United States)* [Internet]. 2020;22(11):554–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neo.2020.08.005>
55. Chen Y-J, Campbell HG, Wiles AK, Eccles MR, Reddel RR, Braithwaite AW, et al. PAX8 Regulates Telomerase Reverse Transcriptase and Telomerase RNA Component in Glioma. *Cancer Res* [Internet]. 2008 Jul 15;68(14):5724–32. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-08-0058>
56. Ramlee M, Wang J, Toh W, Li S. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene. *Genes (Basel)* [Internet]. 2016 Aug 18;7(8):50. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4425/7/8/50>
57. WANG Y, FANG M, SUN X, SUN J. Telomerase activity and telomere length in acute leukemia: correlations with disease progression, subtypes and overall survival. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2010 Apr;32(2):230–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1751-553X.2009.01178.x>
58. Nogueira BMD, da Costa Pantoja L, da Silva EL, Mello Júnior FAR, Teixeira EB, Wanderley AV, et al. Telomerase (hTERT) Overexpression Reveals a Promising Prognostic Biomarker and Therapeutical Target in Different Clinical Subtypes of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 Oct 17;12(10):1632. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/12/10/1632>
59. Ghasemimehr N, Farsinejad A, Mirzaee Khalilabadi R, Yazdani Z, Fatemi A. The telomerase inhibitor MST-312 synergistically enhances the apoptotic effect of doxorubicin in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018 Oct;106:1742–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0753332218339696>
60. Bashash D, Zareii M, Safaroghli-Azar A, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Hematology* [Internet]. 2017 Jul 3;22(6):330–40. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10245332.2016.1275426>
61. Roberts KG, Mullighan CG. The biology of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia.

- Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(7):1–22.
62. Chen Y, Lu GP. Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute respiratory distress syndrome. *Chinese J Contemp Pediatr*. 2018;20(9):717–23.
 63. Myriam Campbell et al. ALL IC-BFM 2009 A Randomized Trial of the I-BFM-SG for the Management of Childhood non-B Acute Lymphoblastic Leukemia. 2009. 178 p.
 64. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I, Cazzaniga G, Schmitz M, Chalker J, et al. Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: A report from the International BFM Study Group. *Blood*. 2010;115(5):1006–17.
 65. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, Drunat S, Soulier J, Gandemer V, et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(4):597–601.
 66. Yoda A, Yoda Y, Chiaretti S, Bar-Natan M, Mani K, Rodig SJ, et al. Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2010 Jan 5;107(1):252–7. Available from: www.pnas.org/cgi/content/short/1415439112
 67. Burmeister T, Meyer C, Gröger D, Hofmann J, Marschalek R. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res [Internet]*. 2015;39(2):242–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2014.11.017>
 68. William D, Walther M, Schneider B, Linnebacher M, Classen CF. Temozolomide-induced increase of tumorigenicity can be diminished by targeting of mitochondria in in vitro models of patient individual glioblastoma. *PLoS One*. 2018;13(1):1–14.
 69. Jensen O, Ansari S, Gebauer L, Müller SF, Lowjaga KAAT, Geyer J, et al. A double-Flp-in method for stable overexpression of two genes. *Sci Rep [Internet]*. 2020;10(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71051-5>
 70. Harvey RC, Mullighan CG, Chen I-M, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood [Internet]*. 2010 Jul 1;115(26):5312–21. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/115/26/5312/130845/Rearrangement-of-CRLF2-is-associated-with-mutation>
 71. van Dongen J, Macintyre E, Gabert J, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. 1999;13(12):1901–28.
 72. Mancini A, Xavier-Magalhães A, Woods WS, Nguyen K-T, Amen AM, Hayes JL, et al. Disruption of the β 1L Isoform of GABP Reverses Glioblastoma Replicative Immortality in a TERT Promoter Mutation-Dependent Manner. *Cancer Cell [Internet]*. 2018 Sep;34(3):513-528.e8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S153561081830357X>
 73. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Mörnicke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and

- adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results in 3184 patients of the AIEOP-BFMALL 2000 study. *Blood*. 2010;115(16):3206–14.
74. Radu LE, Colita A, Pasca S, Tomuleasa C, Popa C, Serban C, et al. Day 15 and Day 33 Minimal Residual Disease Assessment for Acute Lymphoblastic Leukemia Patients Treated According to the BFM ALL IC 2009 Protocol: Single-Center Experience of 133 Cases. *Front Oncol*. 2020;10(June):1–9.
 75. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 2017 Jan 19;129(3):347–57. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/129/3/347/36021/Standardized-flow-cytometry-for-highly-sensitive>
 76. Junk S V., Schaeffeler E, Zimmermann M, Mörcke A, Beier R, Schütte P, et al. Chemotherapy-related hyperbilirubinemia in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a genome-wide association study from the AIEOP-BFM ALL study group. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2023 Jan 13;42(1):21. Available from: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-022-02585-x>
 77. Boissel N, Chiaretti S, Papayannidis C, Ribera J-M, Bassan R, Sokolov AN, et al. Real-world use of blinatumomab in adult patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia in clinical practice: results from the NEUF study. *Blood Cancer J* [Internet]. 2023 Jan 4;13(1):2. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41408-022-00766-7>
 78. Dean EA, Peters KR, Adams CB, Hiemenz JW. Pattern of brexucabtagene autoleucel-related neurotoxicity on magnetic resonance imaging of the brain in a patient with relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and prior leptomeningeal disease. *Radiol Case Reports* [Internet]. 2023 Mar;18(3):1093–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1930043322011219>
 79. Wang W, Dong Y, Ji M, Zhang X, Cai J. Health utility of children with acute lymphoblastic leukemia in China. *Front Public Heal* [Internet]. 2023 Jan 4;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2022.1069336/full>
 80. Varadarajan I, Pierce E, Scheuing L, Morris A, El Chaer F, Keng M. Post-Hematopoietic Cell Transplantation Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia: Current Challenges and Future Directions. *Onco Targets Ther* [Internet]. 2023 Jan;Volume 16:1–16. Available from: <https://www.dovepress.com/post-hematopoietic-cell-transplantation-relapsed-acute-lymphoblastic-l-peer-reviewed-fulltext-article-OTT>
 81. Gupta S, Teachey DT, Chen Z, Rabin KR, Dunsmore KP, Larsen EC, et al. Sex-based disparities in outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children’s Oncology Group report. *Cancer* [Internet]. 2022 May 24;128(9):1863–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.34150>
 82. Sanjuan-pla A, Bueno C, Prieto C, Acha P, Stam RW, Marschalek R. Revisiting the biology of infant t(4;11)/MLL-AF4+ B-cell acute lymphoblastic leukemia. 2015;126(25):2676–86.
 83. Holz C, Lange S, Sekora A, Knuebel G, Krohn S, Murua Escobar H, et al. Combined BCL-2 and PI3K/AKT Pathway Inhibition in KMT2A-Rearranged Acute B-Lymphoblastic Leukemia Cells. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan 10;24(2):1359. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1359>

84. Winer P, Muskens IS, Walsh KM, Vora A, Moorman A V., Wiemels JL, et al. Germline variants in predisposition genes in children with down syndrome and acute lymphoblastic leukemia. *Blood Adv.* 2020;4(4):672–5.
85. Cowfer BA, Hunley TE, Mason EF, Dulek DE, Benedetti DJ. Thrombotic Microangiopathy Due to Progressive Disseminated Histoplasmosis in a Child With Down Syndrome and Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2023 Jan;45(1):38–40. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/MPH.0000000000002556>
86. Verdoni AM, Zilla ML, Bullock G, Guinipero TL, Meade J, Yatsenko SA. B-cell acute lymphoblastic leukemia with iAMP21 in a patient with Down syndrome due to a constitutional isodicentric chromosome 21. *Am J Med Genet A* [Internet]. 2022 Aug;188(8):2325–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35678493>
87. Behluli E, Nuhii N, Liehr T, Temaj G. Suspicions regarding the genetic inheritance of acute lymphoblastic leukemia in patients with down syndrome. *J mother child* [Internet]. 2022 Jul 20; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35853737>
88. KERKETTA LS, GHOSH K, NADKARNI A, MADKAIKAR M, VUNDINTI BR. Centrosome Aberration Frequency and Disease Association in B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *In Vivo (Brooklyn)* [Internet]. 2017 Mar 5;31(2):215–20. Available from: <http://iv.iiarjournals.org/content/31/2/215.abstract>
89. Zhang R, Zhu H, Yuan Y, Zhao J, Yang X, Tian Z. Risk factors for relapse of childhood b cell acute lymphoblastic leukemia. *Med Sci Monit.* 2020;26:1–7.
90. Moreno Lorenzana D, Juárez Velázquez M del R, Reyes León A, Martínez Anaya D, Hernández Monterde A, Salas Labadía C, et al. CRLF2 and IKZF1 abnormalities in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia and recurrent gene fusions: exploring surrogate markers of signaling pathways. *J Pathol Clin Res.* 2021;7(4):410–21.
91. Zhang X, Rastogi P, Shah B, Zhang L. B lymphoblastic leukemia/lymphoma: New insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy. *Oncotarget.* 2017;8(39):66728–41.
92. Cai C-X, Zheng Y-Z, Li J, Wen H, Weng K-Z, Zhuang S-Q, et al. [Clinical features and prognosis of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia: a multicenter retrospective analysis in Fujian Province, China]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* [Internet]. 2023 Jan 15;25(1):38–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/36655662>
93. Jakobczyk H, Jiang Y, Debaize L, Soubise B, Avner S, Sérandour AA, et al. ETV6-RUNX1 and RUNX1 directly regulate RAG1 expression: one more step in the understanding of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia leukemogenesis. *Leukemia* [Internet]. 2022 Feb 17;36(2):549–54. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-021-01409-9>
94. Sun H, Yan Z, Zhang S. Three atypical BCR/ABL transcripts detected simultaneously in a Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia patient showing resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Int J Hematol* [Internet]. 2023 Jan 10;117(1):134–6. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12185-022-03451-4>
95. Saleh K, Fernandez A, Pasquier F. Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive

- Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Apr 1;14(7):1805. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/7/1805>
96. Malhotra P, Jain S, Agarwal A, Sharma A, Agarwal N, Kapoor G. Incidence and Prognostic Impact of TCF3-PBX1 Fusion in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Single Centre Experience. *Indian J Hematol Blood Transfus* [Internet]. 2022 Jan 22;38(1):164–8. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12288-021-01452-7>
 97. Panagopoulos I, Andersen K, Eilert-Olsen M, Zeller B, Munthe-Kaas MC, Buechner J, et al. Therapy-induced deletion in 11q23 leading to fusion of KMT2A with ARHGEF12 and development of B lineage acute lymphoblastic leukemia in a child treated for acute myeloid leukemia caused by t(9;11)(p21;q23)/ KMT2A-MLLT3. *Cancer Genomics and Proteomics*. 2021;18(1):67–81.
 98. Wang J, Sun K, Chen W-M, Wang X, Li L-D, Hao Y, et al. The prognostic significance of CRLF2 expression at diagnosis in adult Ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* [Internet]. 2023 Jan 15;1–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2022.2164193>
 99. Lee SHR, Antillon-Klussmann F, Pei D, Yang W, Roberts KG, Li Z, et al. Association of Genetic Ancestry With the Molecular Subtypes and Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol* [Internet]. 2022 Mar 1;8(3):354. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2788576>
 100. Tzankov A, Reichard KK, Hasserjian RP, Arber DA, Orazi A, Wang SA. Updates on eosinophilic disorders. *Virchows Arch* [Internet]. 2023 Jan 7;482(1):85–97. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00428-022-03402-8>
 101. Arabi S, Yousefian S, Kavosh A, Mansourian M, Nematollahi P. The prognostic significance of hematogones in childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* [Internet]. 2023 Feb 10;70(2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.30138>
 102. Tierens A, Stockley TL, Campbell C, Fulcher J, Leber B, McCready E, et al. Consensus recommendations for mrd testing in adult b-cell acute lymphoblastic leukemia in ontario. *Curr Oncol*. 2021;28(2):1376–87.
 103. Chen X, Gao Q, Roshal M, Cherian S. Flow cytometric assessment for minimal/measurable residual disease in B lymphoblastic leukemia/lymphoma in the era of immunotherapy. *Cytom Part B Clin Cytom* [Internet]. 2023 Jan 22; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cyto.b.22113>
 104. Vrooman LM, Blonquist TM, Harris MH, Stevenson KE, Place AE, Hunt SK, et al. Refining risk classification in childhood b acute lymphoblastic leukemia: Results of DFCI ALL consortium protocol 05-001. *Blood Adv*. 2018;2(12):1449–58.
 105. Schmidt S, Irving JAE, Minto L, Matheson E, Nicholson L, Ploner A, et al. Glucocorticoid resistance in two key models of acute lymphoblastic leukemia occurs at the level of the glucocorticoid receptor. *FASEB J* [Internet]. 2006 Dec 31;20(14):2600–2. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.06-6214fje>
 106. Antosiewicz A, Jarmuła A, Przybylska D, Mosieniak G, Szczepanowska J, Kowalkowska A, et al. Human dihydrofolate reductase and thymidylate synthase form a complex in vitro and co-localize in normal and cancer cells. *J Biomol Struct Dyn*

- [Internet]. 2017 May 19;35(7):1474–90. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07391102.2016.1186560>
107. Aberuyi N, Rahgozar S, Moafi A. The role of ATP-binding cassette transporter A2 in childhood acute lymphoblastic leukemia multidrug resistance. *Iran J Pediatr Hematol Oncol* [Internet]. 2014;4(3):118–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25254091>
 108. Jędraszek K, Malczewska M, Parysek-Wójcik K, Lejman M. Resistance Mechanisms in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Mar 12;23(6):3067. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/6/3067>
 109. Vaiserman A, Krasnienkov D. Telomere Length as a Marker of Biological Age: State-of-the-Art, Open Issues, and Future Perspectives. *Front Genet* [Internet]. 2021 Jan 21;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.630186/full>
 110. Robinson NJ, Schiemann WP. Telomerase in Cancer: Function, Regulation, and Clinical Translation. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2022 Feb 5;14(3):808. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/3/808>
 111. Xu J, de Oliveira DM, Trudeau MA, Yang Y, Chin JJY, Sin DD, et al. Mild catalytic defects of tert rs61748181 polymorphism affect the clinical presentation of chronic obstructive pulmonary disease. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Feb 22;11(1):4333. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-83686-z>
 112. Lee SHR, Yang W, Gocho Y, John A, Rowland L, Smart B, et al. Pharmacotypes across the genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia and impact on treatment response. *Nat Med* [Internet]. 2023 Jan 5;29(1):170–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-022-02112-7>
 113. Pulsipher MA, Han X, Maude SL, Laetsch TW, Qayed M, Rives S, et al. Next-Generation Sequencing of Minimal Residual Disease for Predicting Relapse after Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discov* [Internet]. 2022 Jan 1;3(1):66–81. Available from: <https://aacrjournals.org/bloodcancerdiscov/article/3/1/66/675483/Next-Generation-Sequencing-of-Minimal-Residual>
 114. Zhang H-H, Wang H-S, Qian X-W, Fan C-Q, Li J, Miao H, et al. Genetic variants and clinical significance of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Ann Transl Med*. 2019;7(14):296–296.
 115. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Iwama H, Hayashi S, Toyama K, Shay JW. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res* [Internet]. 1997 Apr;3(4):619–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9815729>
 116. Kaczmarek A, Derebas J, Pinkosz M, Niedźwiecki M, Lejman M. The Landscape of Secondary Genetic Rearrangements in Pediatric Patients with B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia with t(12;21). *Cells* [Internet]. 2023 Jan 18;12(3):357. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/3/357>
 117. Locatelli F, Zugmaier G, Rizzari C, Morris JD, Gruhn B, Klingebiel T, et al. Improved survival and MRD remission with blinatumomab vs. chemotherapy in children with first high-risk relapse B-ALL. *Leukemia* [Internet]. 2023 Jan 8;37(1):222–5. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-022-01770-3>

118. Song F, Hu Y, Zhang Y, Zhang M, Yang T, Wu W, et al. Safety and efficacy of autologous and allogeneic humanized CD19-targeted CAR-T cell therapy for patients with relapsed/refractory B-ALL. *J Immunother Cancer* [Internet]. 2023 Feb 20;11(2):e005701. Available from: <https://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jitc-2022-005701>
119. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood* [Internet]. 2010 Apr 22;115(16):3206–14. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/115/16/3206/27056/Molecular-response-to-treatment-redefines-all>
120. Zhang L, Habeebu SSM, Li W. Prognostic and Predictive Biomarkers in Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia [Internet]. *Leukemia*. 2022. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28665419>
121. Ziętara KJ, Lejman J, Wojciechowska K, Lejman M. The Importance of Selected Dysregulated microRNAs in Diagnosis and Prognosis of Childhood B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2023 Jan 9;15(2):428. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/15/2/428>
122. Aldoss I, Shah BD, Park JH, Muffly L, Logan AC, Brown P, et al. Sequencing Antigen-Targeting Antibodies and Cellular Therapies in Adults With Relapsed/Refractory B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Am J Hematol* [Internet]. 2023 Jan 24; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.26853>
123. Luo Y-X, Peng B-Y, Chen Z-H, Xiong X-K, Huang J-M, Chen M-F, et al. The Combination of Chrysin and Cisplatin Induces Apoptosis in HepG2 through Down-regulation of cFLIP and Activity of Caspase. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2023 Feb;23(4):432–9. Available from: <https://www.eurekaselect.com/206022/article>
124. Albadari N, Li W. Survivin Small Molecules Inhibitors: Recent Advances and Challenges. *Molecules* [Internet]. 2023 Feb 1;28(3):1376. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1376>
125. Padmanabhan C, Rellinger EJ, Zhu J, An H, Woodbury LG, Chung DH, et al. cFLIP critically modulates apoptotic resistance in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Nov 24;8(60):101072–86. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.19557>
126. Huangfu J, Hao C, Wei Z, Wormstone IM, Yan H, Fan X. Cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) critically maintains apoptotic resistance in human lens epithelial cells. *Cell Death Dis* [Internet]. 2021 Apr 9;12(4):386. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41419-021-03683-y>
127. Wang Z, Liang Y, Liu Y, Xia H, Liu J, Jin X, et al. The pH-triggered polyglutamate brush co-delivery of MDR1 and survivin-targeting siRNAs efficiently overcomes multi-drug resistance of NSCLC. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2020 Nov 1;46(11):1862–72. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03639045.2020.1822860>
128. AlAmeel T, Al Sulais E, Raine T. Methotrexate in inflammatory bowel disease: A primer

- for gastroenterologists. *Saudi J Gastroenterol* [Internet]. 2022;28(4):250. Available from: <http://www.saudijgastro.com/text.asp?2022/28/4/250/335634>
129. Ashrafizadeh M, Hushmandi K, Mirzaei S, Bokaie S, Bigham A, Makvandi P, et al. Chitosan-based nanoscale systems for doxorubicin delivery: Exploring biomedical application in cancer therapy. *Bioeng Transl Med* [Internet]. 2023 Jan 13;8(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/btm2.10325>
 130. Syahputra RA, Harahap U, Dalimunthe A, Nasution MP, Satria D. The Role of Flavonoids as a Cardioprotective Strategy against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: A Review. *Molecules* [Internet]. 2022 Feb 15;27(4):1320. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/4/1320>
 131. Fernandes SG, Gala K, Khattar E. Telomerase inhibitor MST-312 and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation by promoting DNA damage. *Transl Oncol* [Internet]. 2023 Jan;27:101569. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1936523322002285>
 132. Andrade da Mota TH, Reis Guimarães AF, Silva de Carvalho AÉ, Saldanha-de Araujo F, Pinto de Faria Lopes G, Pittella-Silva F, et al. Effects of in vitro short- and long-term treatment with telomerase inhibitor in U-251 glioma cells. *Tumour Biol* [Internet]. 2021;43(1):327–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34957975>
 133. Villarinho NJ, Vasconcelos F da C, Mazzoccoli L, da Silva Robaina MC, Pessoa LS, Siqueira PET, et al. Effects of long-term exposure to MST-312 on lung cancer cells tumorigenesis: Role of SHH/GLI-1 axis. *Cell Biol Int* [Internet]. 2022 Sep;46(9):1468–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35811464>
 134. Mazloumi Z, Rafat A, Dizaji Asl K, Nozad Charoudeh H. A combination of telomerase inhibition and NK cell therapy increased breast cancer cell line apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2023 Jan;640:50–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X22016473>
 135. Wang J, Dai M, Xing X, Wang X, Qin X, Huang T, et al. Genomic, epigenomic, and transcriptomic signatures for telomerase complex components: a pan-cancer analysis. *Mol Oncol* [Internet]. 2023 Jan 31;17(1):150–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1878-0261.13324>

8. Anexos

8.1 Artigo científico relacionado a tese

Título: The Relevance of Telomerase and Telomere-Associated Proteins in B-Acute Lymphoblastic Leukemia.

Dados do periódico: Genes

Tipo do material: artigo de revisão

Qualis: A3

Forma de aquisição: Gratuito

Analisado JCR: Q2

Fator de impacto: 4.141 (2021); 5-Year Impact Factor: 4.474 (2021)

Base de dados relacionadas : Scopus, SCIE (Web of Science), PubMed, MEDLINE, PMC, Embase, PubAg, entre outras.

ISSN: 2073-4425

Anexo 1



Review

The Relevance of Telomerase and Telomere-Associated Proteins in B-Acute Lymphoblastic Leukemia

Tales Henrique Andrade da Mota ^{1,2,*}, Ricardo Camargo ³, Estefânia Rodrigues Biojone ³, Ana Flávia Reis Guimarães ², Fabio Pittella-Silva ¹ and Diégo Madureira de Oliveira ¹

¹ Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, University of Brasilia, Brasilia 70910-900, Brazil

² Laboratory of Molecular Analysis, Faculty of Ceilândia, University of Brasilia, Brasilia 72220-275, Brazil

³ Brasilia Children's Hospital José Alencar, Brasilia 70684-831, Brazil

* Correspondence: talescara@gmail.com

Abstract: Telomeres and telomerase are closely linked to uncontrolled cellular proliferation, immortalization and carcinogenesis. Telomerase has been largely studied in the context of cancer, including leukemias. Deregulation of human telomerase gene *hTERT* is a well-established step in leukemia development. B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) recovery rates exceed 90% in children; however, the relapse rate is around 20% among treated patients, and 10% of these are still incurable. This review highlights the biological and clinical relevance of telomerase for B-ALL and the implications of its canonical and non-canonical action on signaling pathways in the context of disease and treatment. The physiological role of telomerase in lymphocytes makes the study of its biomarker potential a great challenge. Nevertheless, many works have demonstrated that high telomerase activity or *hTERT* expression, as well as short telomeres, correlate with poor prognosis in B-ALL. Telomerase and related proteins have been proven to be promising pharmacological targets. Likewise, combined therapy with telomerase inhibitors may turn out to be an alternative strategy for B-ALL.

Keywords: *hTERT*; telomerase; telomere; leukemia; acute leukemia



Citation: da Mota, T.H.A.; Camargo, R.; Biojone, E.R.; Guimarães, A.F.R.; Pittella-Silva, F.; de Oliveira, D.M. The Relevance of Telomerase and Telomere-Associated Proteins in B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes* 2023, 14, 691. <https://doi.org/10.3390/genes14030691>

Received: 10 February 2023

Revised: 4 March 2023

Accepted: 8 March 2023

Published: 10 March 2023



Copyright © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leukemia is characterized by the production of abnormal leukocytes based on cytogenetic alterations, molecular modifications, clinical features and, notably, high proliferation [1]. Although knowledge on molecular alterations that lead to leukemogenesis as well as in the mechanisms involved in disease maintenance and propagation has gradually increased over the years, the identification of novel strategies to treat the disease is still lacking. Telomeres and telomerase are closely associated with cell proliferation, which makes them attractive targets for studies in oncology [2]. Telomerase is a reverse transcriptase that elongates the telomeres, thereby compensating the loss of telomere repeats after successive replication cycles; this is a phenomenon integrated to carcinogenesis known as cell immortalization [3]. Therefore, telomerase activity (TA) is detectable in almost all types of malignant cells, including leukemia cells. In this article, we discuss the relevance of telomerase and other telomere-associated factors to B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) as well as their implications for development of new treatments, highlighting the role of these proteins as potential markers of B-ALL.

2. Materials and Methods

We conducted a literature search using the NCBI database (PubMed) in September 2022 using the following combinations of keywords: (“telomerase” OR “*hTERT*”) AND (“Acute lymphoblastic leukemia” OR “B-ALL” OR “ALL-B” OR “ALL”) and (“telomerase” OR “*hTERT*”) AND (“Acute lymphoblastic leukemia”) AND “treatment”. Additional references were obtained from cross-referencing bibliographies.

8.2 Artigo científico relacionado a tese

Effects of in vitro short and long-term treatment with telomerase inhibitor in U-251 glioma cells

Dados do periódico: Tumor Biology

Tipo do material: artigo original

Qualis: A2

Forma de aquisição: gratuito

Analisado JCR: Q2

Fator de impacto: 3,65 com citescore 6.0

Base de dados relacionadas : Scopus, SCIE (Web of Science), PubMed, MEDLINE

ISSN: 1010-4283

Anexo 2

Tumor Biology 43 (2021) 327–340
 DOI:10.3233/TUB-211515
 IOS Press

327

Effects of *in vitro* short- and long-term treatment with telomerase inhibitor in U-251 glioma cells

Tales Henrique Andrade da Mota^{a,b}, Ana Flávia Reis Guimarães^{a,b},
 Amanda Évelin Silva de Carvalho^{c,d}, Felipe Saldanha- de Araujo^{c,d},
 Giselle Pinto de Faria Lopes^{e,f}, Fábio Pittella-Silva^b,
 Doralina do Amaral Rabello^{b,*} and Diêgo Madureira de Oliveira^{a,b}

^aMultidisciplinary Laboratory of Human Health, University of Brasília, Ceilândia, DF, Brazil

^bLaboratory of Molecular Pathology of Cancer, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^cLaboratory of Molecular Pharmacology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^dLaboratory of Hematology, Department of Pharmaceutical Sciences, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil

^eLaboratory of Cellular and Molecular Hemato-oncology, National Institute of Cancer (INCA), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^fMarine Biotechnology Department, Admiral Paulo Moreira Sea Studies Institute, IEAPM, Arraial do Cabo, RJ, Brazil

Received 26 February 2021

Accepted 22 October 2021

Abstract.

BACKGROUND: The inhibition of the enzyme telomerase (TERT) has been widely investigated as a new pharmacological approach for cancer treatment, but its real potential and the biochemical consequences are not totally understood.

OBJECTIVE: Here, we investigated the effects of the telomerase inhibitor MST-312 on a human glioma cell line after both short- and long-term (290 days) treatments.

METHODS: Effects on cell growth, viability, cell cycle, morphology, cell death and genes expression were assessed.

RESULTS: We found that short-term treatment promoted cell cycle arrest followed by apoptosis. Importantly, cells with telomerase knock-down revealed that the toxic effects of MST-312 are partially TERT dependent. In contrast, although the long-term treatment decreased cell proliferation at first, it also caused adaptations potentially related to treatment resistance and tumor aggressiveness after long time of exposition.

CONCLUSIONS: Despite the short-term effects of telomerase inhibition not being due to telomere erosion, they are at least partially related to the enzyme inhibition, which may represent an important strategy to pave the way for tumor growth control, especially through modulation of the non-canonical functions of telomerase. On the other hand, long-term exposure to the inhibitor had the potential to induce cell adaptations with possible negative clinical implications.

Keywords: Glioma, telomerase, TERT, MST-312, long-term treatment

*Corresponding author: Doralina do Amaral Rabello, Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, Faculty of Medicine, University of Brasília, 70910-900 - Brasília, DF - Brazil. Tel.: +55 61 985587405; E-mail: dorarabello@unb.br. ORCID ID: 0000-0002-6272-6558

8.3 Anexo 3 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO

HC B

AQUI TAM

icipeSecretaria de Saúde
GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL**SUS** **Termo de Assentimento (crianças entre 5 e 12 anos)**

Oi, _____.
Precisamos ter uma conversinha com você.

Você participará de uma pesquisa para saber como sua doença se comporta e como ela respondeu ao tratamento. Para isso, precisamos da sua ajuda.

Queremos estudar para melhorar a forma de tratar essa doença e tentar fazer com que cada vez mais crianças fiquem curadas.

Para isso, precisamos pegar algumas informações no seu prontuário, que é onde o médico faz anotações sobre seu tratamento.

8.4 Anexo 4 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO



AQUI TAM

eficipe

Sacramento de Saúde GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL



Termo de assentimento para crianças e adolescentes

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “*Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda (LLA-B)*”. Seus responsáveis permitiram que você participasse.

O nome da pesquisa parece complicado, mas o que queremos saber é se podemos prever como a doença vai responder ao tratamento antes mesmo de começar esse tratamento, e se daria para fazer isso com um exame de sangue.

As crianças/adolescentes que irão participar dessa pesquisa têm de idade entre 0 e 17 anos.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir a qualquer momento.

A pesquisa será realizada aqui no Hospital da Criança de Brasília José Alencar, onde vamos consultar as informações que seu médico escreveu no seu prontuário para sabermos como está seu tratamento, e também vamos analisar um pouco do seu sangue, mas não vamos precisar tirar sangue só para o estudo, usaremos a mesma amostra que o hospital já usa para fazer seus exames.

Você pode me perguntar o que quiser sobre a pesquisa, vamos te contar tudo que queira saber, e caso apareça alguma dúvida depois, ou aconteça algo errado, você pode nos procurar pelo telefone: (61) 3107-8938 do pesquisador Diêgo Madureira de Oliveira, ou pelo e-mail dmadureira@unb.br. Mas há coisas boas que podem acontecer, como descobrirmos um jeito melhor de escolher o tratamento. Estamos estudando para entendermos melhor a doença, mas se descobrirmos qualquer coisa que pode ajudar no seu tratamento, vamos avisar ao seu médico e ao seu responsável.

Com sabemos que é difícil para você vir até o Hospital da Criança de Brasília, nós iremos fazer este estudo somente quando você estiver aqui no hospital para sua consulta, assim seu responsável não terá nenhum gasto a mais para participar deste estudo. Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações sobre você. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa, vamos divulgar os resultados na gerência de pesquisa do HCB e também poderemos publica-los.

Este projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia (CEP/FCE) da FEPECS-SES/DF. Esse comitê é formado por pessoas que acompanham as pesquisas para garantir que está correndo tudo bem. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelos telefones (61)3107-8434 (CEP/FCE), (61)2017 1145 ramal 6878 (CEP/FEPECS) ou e-mail cep.fce@gmail.com (CEP/FCE) / comitedeetica@gmail.com (CEP/FEPECS), horário de atendimento das 14h:00 às 18h:00, de segunda a sexta-feira. O CEP/FCE se localiza na Faculdade de Ceilândia, Sala AT07/66 – Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED) – Universidade de Brasília - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP: 72220-900, e o CEP/FEPECS (Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde) se localiza no Edifício Fepecs, SMHN Quadra 03, conjunto A, Bloco 1.

Eu, _____, aceito participar da pesquisa “*Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda (LLA-B)*”, que tem o objetivo de estudar novos marcadores para tentar prever como a doença vai responder ao tratamento através de exames de laboratório. Entendi os benefícios e as coisas ruins que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste Documento DE ASSENTIMENTO INFORMADO.

Brasília, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do menor (participante do estudo)

Assinatura do pesquisador

Contato dos pesquisadores responsáveis: Diêgo Madureira: (61) 9 8575 6904 ; Tales Henrique (61) 9 9333 2992

8.5 Anexo 5 MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO USADO NO TRABALHO



Secretaria de Saúde GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a autorizar a participação do menor pelo qual é responsável legal no projeto de pesquisa “*Estudo de marcadores moleculares associados ao telômero em pacientes pediátricos com Leucemia Linfóide Aguda (LLA-B)*”, sob a responsabilidade do pesquisador Diêgo Madureira de Oliveira. O projeto trata-se de um estudo que visa à descoberta de características da doença que possam estar associadas à forma como ela responde ao tratamento. Para isso, serão estudadas amostras de células coletadas do sangue dos voluntários, assim como os dados clínicos registrados em prontuário médico.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que nem o nome do paciente nem o seu aparecerão, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-los.

Não serão feitas coletas de sangue específicas para o projeto, usaremos as mesmas amostras coletadas durante o acompanhamento rotineiro do paciente. Se alguma coleta de sangue já foi realizada, poderemos utilizar essa amostra caso o Hospital ainda a tenha. Assim, ao assinar este termo, o(a) Senhor(a) autorizará a utilização de amostra de sangue do menor para realização de testes laboratoriais, que serão feitos no próprio Hospital da Criança e na Universidade de Brasília, além do acesso da equipe de pesquisadores aos dados no prontuário médico.

O paciente também receberá orientações (adequadas à idade) e terá todas as perguntas sobre o projeto respondidas, e só entrará no estudo se assentir, independente da autorização do responsável.

É importante salientar que não se trata de um estudo do caso específico de cada paciente, e sim de um projeto para entender melhor a doença como um todo, porém, o acesso aos resultados obtidos, bem como informações e orientações que possam resultar em reavaliação de conduta médica ou qualquer outro benefício direto, é garantido a todos os participantes.

O(a) Senhor(a) pode se recusar a responder qualquer questão que lhe traga constrangimento, também pode se recusar a permitir que o menor sob sua responsabilidade participe de qualquer procedimento que julgue inconveniente, podendo ainda desistir da participação na pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a) ou para o paciente.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à participação, que será voluntária.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente da participação na pesquisa, você deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados da pesquisa serão divulgados publicamente. A amostra de sangue coletado será utilizada exclusivamente para este estudo. O rastreamento do indivíduo doador do material e das informações não faz parte da metodologia do trabalho.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Diêgo Madureira de Oliveira, na UnB, no telefone (61) 3107-8938, disponível inclusive para ligação a cobrar. Também é possível fazer contato pelo e-mail dmadureira@umb.br.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ceilândia (CEP/FCE) da Universidade de Brasília e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FEPECS-SES/DF. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser esclarecidos pelos telefones (61)3107-8434 (CEP/FCE), (61)2017 1145 ramal 6878 (CEP/FEPECS) ou e-mail cep.fce@gmail.com (CEP/FCE) / comitedeetica@gmail.com (CEP/FEPECS), horário de atendimento das 14h:00 às 18h:00, de segunda a sexta-feira. O CEP/FCE se localiza na Faculdade de Ceilândia, Sala AT07/66 – Prédio da Unidade de Ensino e Docência (UED) – Universidade de Brasília - Centro Metropolitano, conjunto A, lote 01, Brasília - DF. CEP: 72220-900, e o CEP/FEPECS (Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde) se localiza no Edifício Fepecs, SMHN Quadra 03, conjunto A, Bloco 1.

Caso concorde em autorizar a participação, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o Senhor(a).

Contato dos pesquisadores responsáveis: Diêgo Madureira: (61) 9 8575 6904 ; Tales Henrique (61) 9 9333 2992

Nome/Assinatura

Pesquisador Responsável

(Diêgo M. de Oliveira / Tales H. A. da Mota)

Brasília, ___ de _____ de _____.