

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO BIOLOGIA ANIMAL



**Padronização e Implementação do Índice de DNA como ferramenta de diagnóstico molecular para pacientes leucémicos do Brasil - Bahia e Moçambique**

Paulina Jeremias Guambe

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

Dissertação orientada por:  
Doutora Raquel Matavele Chissumba  
Doutora Maria Teresa Rebelo



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação a minha família, especialmente a minha mãe Maria Renade Mucoto (em memória), por todo incentivo em vida para prosseguir com a minha formação acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

Dedicatória: A Deus e a todos os meus familiares e amigos especialmente à minha tia Catarina, e à memória da minha mãe, Maria Mucoto.

A minha maior gratidão aos meus pais Augusto, Rondina e Jeremias, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, são o meu suporte contínuo em todos os momentos da minha vida, por sempre acreditarem em mim, sem eles não teria chegado até aqui.

Ao anjo da guarda e da minha vida- atualmente um verdadeiro anjo a minha mãe, Maria Renade Mucoto (em memória).

A toda minha família: as minhas irmãs, Amélia, Ana e Telma, aos meus primos, Ching, Roberto, Enny-more, à minha avó Lina, aos meus tios Catarina e Horácio juntamente com as suas filhas Cátia e Patrícia pelo carinho, amor e apoio.

Ao Ministério da Defesa Nacional (MDN) especialmente ao Doutor Melo por ter acreditado em mim e que sabia qual seria o resultado, aqui vai a minha gratidão.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Aristides Maltez e todos os seus funcionários, pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho. Em especial ao Dr Geraldo, Dr Jeferson e Dra Katia pelo acolhimento no laboratório e por disponibilizar o uso de todo o equipamento.

Aos meus amigos da Bahia, Lucas, Rafael, Roberta, Giovana (Maria chorona) como a chamo carinhosamente pelo conforto, amor e carinho, a minha maior gratidão, em especial ao Chaislan pela paciência, compreensão, amizade, empenho, confiança e ensinamentos neste período longo, o meu Kanimambo.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Saúde e Treinamento da Polana Caniço (CISPOC) nomeadamente Adérito, Teresa, Edson e Celso Castiano, obrigada por tudo, estiveram do meu lado dando força e apoio no laboratório.

Às minhas orientadoras Doutora Raquel Chissumba, Doutora Eugênia Pina e Doutora Teresa Rebelo por terem me aceitado como vossa aluna, pela oportunidade, disponibilidade e pelos seus ensinamentos que foram indispensáveis para o meu crescimento acadêmico e profissional, o meu muito obrigada por terem apostado em mim neste novo desafio e por ter confiado e acreditado, pois se não fosse a vossa explicação e esclarecimento isto não teria tido o rumo que hoje tomou porque a vossa leveza e praticidade tornaram cada vez mais interessante.

Aos colegas de profissão, Hermínia, Mauro, Marlene, Ilídio aqui vai o meu muito obrigado pela força.

Aos meus compadres Kumanga e Anabela, juntamente com os seus filhos, meus afilhados Salomé e Pedro, obrigada por fazerem parte da minha jornada desde a licenciatura até data hoje, pelo amor, atenção e carinho.

Aos meus amigos Vanessa, Gabriel e Nércia que apesar da distância sempre estiveram ao meu lado, apoiando-me e incentivando, em especial a Vanessa e Gabriel que sempre descarregaram energias positivas em mim dizendo, “você vai longe, muita força amiga, sempre que fracassares pensa em nós”.

A todos os pacientes que consentiram ao uso das suas amostras, o que leva a novos avanços e melhoria no tratamento dos mesmos, pois sem eles a minha pesquisa poderia ter outro rumo.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente me ensinando, mas por terem-me feito aprender.

A Deus por colocar pessoas especiais no meu caminho ao longo da minha vida e durante o mestrado.

Sempre procurei saber quem sou, de onde venho, para onde vou, uma jovem desordeira, uma aventureira, uma teimosa, uma confiante, porque para mim o limite é o céu.

## **EPÍGRAFE**

*“Se alguém procura a saúde, pergunta-lhe primeiro se está disposto a evitar no futuro as causas da doença; em caso contrário, abstém-te de o ajudar”*

Sócrates

## RESUMO

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcpB) corresponde a 85% das leucemias infantis a nível mundial. Nos países da OECD, a taxa média de sobrevivência das crianças de 0-14 anos, entre 2010 a 2014, foi de 86.7% enquanto em países em desenvolvimento essa taxa é inferior a 70%. A sobrevivência infantil com cancro em África chega a 70-80% em 5 anos. A implementação de novas técnicas como índice de DNA (DI) em países em desenvolvimento, como Moçambique, pode melhorar o diagnóstico e acompanhamento das crianças com LLAcpB. Neste estudo, o diagnóstico foi baseado na morfologia de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) e a avaliação do DI foi determinado por citometria de fluxo, permitindo correlacionar a quantidade de DNA presente nas células em fase G0/G1 do ciclo celular com o número esperado de cromossomas. Este trabalho teve como objetivo padronizar e implementar a técnica de DI nos laboratórios do Hospital Aristides Maltez (Bahia) e do Centro de Investigação e Treino em Saúde da Polana Caniço, CISPOC (Moçambique), como ferramenta de diagnóstico molecular para pacientes com LLAcpB. Foram avaliadas amostras de MO e SP, recebidas entre Dezembro de 2022 e 2023 da Bahia e Moçambique. Inicialmente a metodologia foi padronizada na Bahia e posteriormente transferida para Moçambique. Na padronização usou-se anticorpos monoclonais para evitar interferência com a faixa de emissão da fluorescência do iodeto de propídeo. Os resultados indicam que o DI é um bom método para auxiliar na estimativa do prognóstico dos pacientes com neoplasias hematológicas.

**Palavra-chave:** Leucemia aguda; Leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B; Índice de DNA, Imunofenotipagem; Iodeto de propídeo.

## ABSTRACT

B-cell acute lymphoblastic leukemia (Bcp-ALL) accounts for 85% of childhood leukemias worldwide. Between 2010 and 2014, the average survival rate for children aged 0-14 years was 86.7% in OECD countries, compared to less than 70% in developing nations. In Africa, the survival rate for children with cancer is significantly lower than in developed countries, where the 5-year overall survival (OS) reaches 70-80%. The implementation of new techniques, such as the DNA index (DI), in developing countries like Mozambique could help improve the diagnosis and monitoring of children with B-ALL. In the samples analyzed, the diagnosis was based on the morphology of the bone marrow (BM) and peripheral blood (PB). DI evaluation was determined by flow cytometry, which correlates DNA present in cells during the G0/G1 cell cycle phase with the expected chromosome number. The study aimed to standardize and implement the DI technique in the laboratories of Aristides Maltez Hospital (Bahia) and the Polana Caniço Health Research and Training Center (CISPOC) in Mozambique as a molecular diagnostic tool for Bcp-ALL patients. BM and PB samples collected between December 2022 and 2023 from Bahia and Mozambique were analyzed. The methodology was initially standardized in Bahia, and then transferred to Mozambique. Monoclonal antibodies were used in the standardization to avoid interfering with the fluorescence emission range of propidium iodide. Results indicate that DI is an effective method for assessing the prognosis of patients diagnosed with hematological malignancies.

Keywords: Acute leukemia; Acute precursor B-cell lymphoblastic leukemia; DNA index, Immunophenotyping; Propidium iodide.

## ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	ii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>EPÍGRAFE</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS</b> .....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Leucemogênese</b> .....	1
<b>1.2 Histórico</b> .....	4
<b>1.3 Classificação da OMS</b> .....	5
<b>1.4 Epidemiologia das Leucemias Agudas</b> .....	7
<b>1.5 Aspectos Fisiopatológicos</b> .....	9
<b>1.6 Fatores de risco</b> .....	10
<b>1.7 Tratamento</b> .....	10
<b>1.8 Diagnóstico</b> .....	11
<b>1.8.1 Morfologia</b> .....	12
<b>1.8.2 Citogenética</b> .....	12
<b>1.8.3 Imunofenotipagem</b> .....	13
<b>1.8.4 Índice de DNA</b> .....	14
<b>1.9 Avaliação da Ploidia</b> .....	15
<b>1.10 Justificativa</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	16
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	16
<b>3 MATERIAL &amp; MÉTODOS</b> .....	16
<b>3.1 Participantes da Pesquisa</b> .....	16
<b>3.2 Desenho do Estudo</b> .....	17
<b>3.3 Considerações éticas</b> .....	17
<b>3.4 Testes laboratoriais</b> .....	18
<b>3.5 Imunofenotipagem para diagnóstico de leucemia aguda</b> .....	18

<b>3.6</b>	<b>Procedimento</b> .....	19
<b>3.7</b>	<b>Controlo de qualidade</b> .....	20
<b>3.8</b>	<b>Manutenção</b> .....	21
<b>3.9</b>	<b>Análise dos dados</b> .....	21
<b>3.10</b>	<b>Análise estatística</b> .....	21
<b>3.11</b>	<b>Ensaio de padronização</b> .....	21
<b>3.11.1</b>	<b>Comparação do citómetro</b> .....	21
<b>3.11.2</b>	<b>Comparação das soluções de lise</b> .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	22
<b>4.1</b>	<b>Características Clínico-Demográficas dos Pacientes Incluídos no Estudo</b> .....	22
<b>4.2</b>	<b>Padronização no Brasil- Bahia - Moçambique</b> .....	24
<b>4.2.1</b>	<b>Padronização da marcação celular com iodeto propídeo (Bahia)</b> .....	24
<b>4.2.2</b>	<b>Padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal (Bahia)</b> .....	25
<b>4.2.3</b>	<b>Padronização da marcação celular com iodeto de propídeo (Moçambique)</b> .....	26
<b>4.2.4</b>	<b>Padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal (Moçambique)</b> .....	27
<b>4.2.5</b>	<b>Resumo dos procedimentos feitos e parâmetros considerados na Bahia e Moçambique</b> .....	27
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	29
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES</b> .....	30
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>ANEXO A – Parecer Consubstanciado (Brasil)</b> .....	39
	<b>ANEXO B – Termo de Assentimento para Criança e Adolescente</b> .....	49
	<b>ANEXO C – Termo de Assentimento para Criança e Adolescente</b> .....	50
	<b>ANEXO D – Termo de Assentimento para Maiores de 10 anos</b> .....	53
	<b>ANEXO E – Termo de Consentimento Para Maiores Legais</b> .....	56
	<b>ANEXO F – Termo de Consentimento Para Responsáveis por Pacientes Menores de Idade.</b> 60	
	<b>ANEXO G - Consentimento informado para menores de 12 anos (Moçambique)</b> .....	61
	<b>Anexo H- Assentimento informado para menores de 14 anos e maiores de 12 anos</b> .....	69

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.1:** Esquema da Hematopoese

**Figura 1.2:** Fatores genéticos e não genéticos da leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil.

**Figura 1.3:** Análise de ciclo celular

**Figura 3.2:** Análise de ciclo celular de um paciente com leucemia

**Figura 4.1:** Análise representativa da marcação celular com iodeto de propídeo das células de sangue periférico usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD para o paciente 06 e seu controle VI.

**Figura 4.2:** Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método CD45 para o paciente 013.

**Figura 4.3:** Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal e iodeto de propídeo usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método PI para o paciente 002 e seu controle II.

**Figura 4.4:** Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal e iodeto de propídeo usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método PI para o paciente 008 e seu controle VIII.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.1:** Valores de Índice de DNA de citometria de fluxo e números cromossômicos modais.

**Tabelas 3.1:** Painel de anticorpos monoclonais utilizados no Brasil.

**Tabelas 3.2:** Painel de anticorpos monoclonais utilizados no Brasil

**Tabela 3.3:** Painel de anticorpos monoclonais utilizados em Moçambique.

**Tabela 4.1:** Características clínico-demográficas com LLcpB do Brasil.

**Tabela 4.2:** Características clínico-demográficas com LLcpB de Moçambique.

**Tabela 4.3:** Resumo dos procedimentos e parâmetros considerados na Brasil e Moçambique.

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AR: Alto risco  
CC: Citogenética convencional  
CD: *Cluster of differentiation*  
CHAI: Fundação Clinton Health Access Initiative  
CISPOC: Centro de Pesquisa em Saúde e Treinamento da Polana Caniço  
CNBS: Comité Nacional para Saúde  
CFM: Citometria de fluxo multiparamétrica  
DI: Índice de DNA  
FAB: Franco-americano-britânico  
FISH: Fluorescence In Situ Hybridization  
HAM: Hospital Aristides Maltez  
HCM: Hospital Central de Maputo  
HMG: Hospital Martagão Gesteira  
ILSG: *International Lymphoma Study Group*  
IFM : Intensidade de Fluorescência Média  
LB: Linfoma de Burkitt  
LLA: Leucemia linfoblástica aguda  
LLAcpB: Leucemia linfoblástica Aguda de Células Precursoras B  
LLAT: Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T  
LMA: Leucemia mieloide aguda  
MDN: Ministério da Defesa Nacional  
MO: Medula óssea  
NK: *Natural killer*  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
OMS-HAEM5: Tumores Hematolinfóides da Organização Mundial de Saúde  
OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development*  
PBS: Tampão fosfato-salino  
PI: Iodeto de propídeo (do inglês, *Propidium Iodide*)  
SHOP: Serviço de Hemato-oncologia pediátrica do Hospital Central de Maputo  
SNPs: Polimorfismo de nucleótido único  
SG: Sobrevida global  
SP: Sangue periférico  
SSC-A: Dispersão de luz lateral – Área (do inglês, *Side Scatter - Area*)  
SSC-H: Dispersão de luz lateral – Altura (do inglês, *Side Scatter -*  
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Leucemogênese

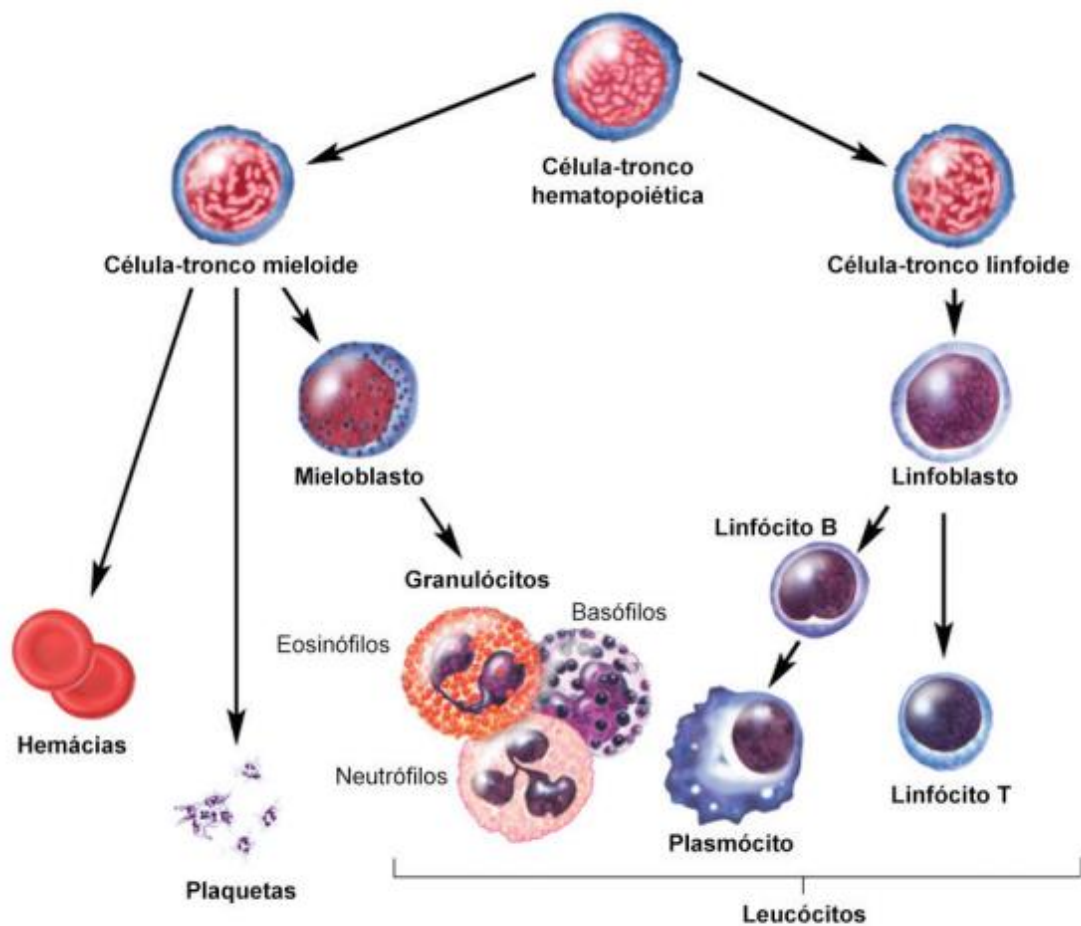
As doenças hematológicas, também conhecidas como neoplasias hematológicas, resultam de alterações genéticas em uma célula hematopoiética que se expande de forma monoclonal (Sant et al., 2010). Essas doenças são caracterizadas por serem clonais, originadas de uma única célula na medula óssea (MO), no timo ou no tecido linfóide periférico, que sofreu uma ou mais mutações genéticas. Essa célula passa por divisões mitóticas contínuas, resultando no desenvolvimento de um clone que prolifera descontroladamente e é resistente à apoptose (Sant et al., 2010). As leucemias são um grupo de doenças malignas hematológicas caracterizadas pela proliferação descontrolada de leucócitos, diferindo na etiologia, patogênese, prognóstico e resposta ao tratamento (Dong et al., 2020; Lightfoot et al., 2016). Os diferentes tipos de leucemia apresentam variações em termos de patogênese, origem, frequência e perspectivas de prognóstico (Dong et al., 2020).

As leucemias são comumente categorizadas conforme a origem das células (linfóide ou mieloide), conforme mostrado na figura 1.1, e o ponto de maturação em que o desenvolvimento é interrompido (agudo ou crônico) (Baeker Bispo et al., 2020). As células linfóides têm sua origem inicial nas células-tronco hematopoiéticas pluripotentes presentes na MO. O desenvolvimento normalmente é adequadamente controlado por meio da transdução de sinal celular, ativação de fatores de transcrição e seleção positiva/negativa (Huang et al., 2020).

A leucemia aguda (LA) é definida pela infiltração de mais de 20% de blastos na MO ou no sangue periférico (SP) e pode também ser diagnosticada pela identificação de alterações genético-moleculares específicas da doença (Onciu, 2009). É o cancro mais comum na infância, afetando cerca de 35 crianças a cada milhão, com idades entre 0 e 14 anos a cada ano (Qiu et al., 2021; Schwab & Harrison, 2018; Teachey & Pui, 2019). É responsável por cerca de 75% dos casos diagnosticados em crianças a nível mundial e adultos jovens, com um pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade (Dong et al., 2020; Tian et al., 2023).

As formas crônicas de leucemia são muito raras em crianças de todas as idades e na grande maioria dos casos envolve os linfócitos B. A sua incidência é maior a partir dos 60 anos e é mais frequente em pessoas do sexo masculino. (Dong et al., 2020; Tracy & Eve, 2017).

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma condição maligna clonal caracterizada pela proliferação anormal de precursores hematopoiéticos na MO e na corrente sanguínea (Qiu et al., 2021; Smaldone et al., 2019). As LLA progredem rapidamente e necessitam de tratamento urgente, pois podem ser fatais. Quando diagnosticadas e tratadas precocemente, têm maior chance de sucesso terapêutico. Por outro lado, as leucemias linfóides crônicas evoluem lentamente e podem não requerer tratamento imediato após o diagnóstico (Whitehead et al., 2016).



**Figura 1.1: Esquema da Hematopoese.** A figura ilustrativa esquematiza a sequência de processos que ocorre durante a hematopoiese. Todas as células hematológicas têm uma origem em comum derivada de uma célula tronco. Após o estímulo apropriado a célula dá origem a duas linhagens hematológicas sendo elas as células linfóides que dão origem a linfócitos B e T, e células mieloides que dão origem a hemácias, plaquetas e granulócitos (neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos).

(<https://www.proenem.com.br/enem/biologia/tecido-sanguineo/>)

Com base no imunofenótipo a LLA pode ser classificada em dois subtipos LLA de células precursoras B (LLcPb) que corresponde 85% das leucemias infantis e LLA de células T (LLA-T) correspondente a 15% dos casos (Duffield et al., 2023; Muller & Inaba, 2023; Smaldone et al., 2019; Teachey & Pui, 2019). É reconhecido que o surgimento da LLAcPb está associado a diversas mutações genéticas, que frequentemente se inicia em progenitores linfóides pouco diferenciados presentes na MO. Esse processo é sucedido por etapas de expansão clonal, diferenciação, proliferação celular desordenada e bloqueio na apoptose, resultando, em última instância, na substituição de células linfóides normais por células malignas (Huang et al., 2020). O *National Cancer Institute* (USA) categoriza os pacientes com LLAcPb em risco padrão ou alto com base em idade e contagem de leucócitos. Pacientes com idade entre 1 e 10 anos ou com contagem de leucócitos  $\leq 50.000$  células/ $\mu\text{L}$  são considerados de baixo risco de recaída. Já aqueles com idade  $\leq 1$  ano ou  $\geq 10$  anos, ou com contagem de leucócitos  $\geq 50.000$  células/ $\mu\text{L}$ , em tratamento são classificados de alto risco (Smith et al., 1996). A LLAcPb é o subtipo comum de leucemia na infância com pico de incidência entre 2 a 5 anos de idade (Pui et al, 2008; Inaba et al., 2013). De modo geral, crianças com este subtipo leucémico têm um prognóstico mais favorável em comparação com a LLA-T, que é vista como um fator clínico prognóstico desfavorável (Armstrong & Look, 2005; Inaba et al., 2013; Othman et al., 2015).

À medida que o conhecimento avançou, as anomalias cromossômicas recorrentes associadas a esta doença foram identificadas, tornando a citogenética uma ferramenta confiável para a estratificação de risco. Essas lesões gênicas interferem principalmente na proliferação celular e na diferenciação (**Pui et al., 2008**) bloqueando fatores de transcrição hematopoiéticos ou ativando oncogenes, o que se torna crucial para a leucemogênese (**Mullighan, 2011**). Nos últimos anos, a taxa de cura das LLAcPb apresentou um aumento significativo. No entanto, mesmo com esse avanço, cerca de 15% dos pacientes com LLAcPb ainda enfrentam recaídas (**Harrison, 2009; Huang et al., 2020; Mullighan et al., 2012**).

Contudo, nas LLAcPb, as anormalidades das células linfóides no estágio precursor B impedem o processo de diferenciação linfóide, resultando em uma proliferação e sobrevivência celular fora do padrão. É reconhecido que o surgimento da LLAcPb está associado a diversas mutações genéticas, que frequentemente se inicia em progenitores linfóides pouco diferenciados presentes na MO. Esse processo é sucedido por etapas de expansão clonal, diferenciação, proliferação celular desordenada e bloqueio na apoptose, resultando, em última instância, na substituição de células linfóides normais por células malignas (**Huang et al., 2020; Cooper, S. L. 2015**).

Atualmente, o tratamento padrão para a LLAcPb é a terapia direcionada ao risco (**Huang et al., 2020**). A idade no momento do diagnóstico é considerada como um importante fator prognóstico, a contagem inicial de leucócitos, as características imunofenotípicas e citogenéticas da população de células imaturas, e a rapidez da resposta ao tratamento inicial no momento do diagnóstico são outros fatores considerados fundamentais para avaliar o nível de risco (baixo ou alto) (**Huang et al., 2020; Inaba et al., 2013; Mansoor et al., 2023**). Apesar dos avanços obtidos nos tratamentos terapêuticos e resultado de sobrevivência nas últimas décadas, a LLA permanece como a principal responsável pelas mortes por cancro em crianças, e continua a representar um desafio significativo (**Huang et al., 2020; Qiu et al., 2021; Smaldone et al., 2019**). A eficácia desse tratamento requer a implementação de um protocolo de múltiplos medicamentos, dividido em três etapas distintas (indução, consolidação e manutenção) (**Huang et al., 2020**). Além da idade, a contagem de leucócitos é outro fator prognóstico, e uma contagem elevada de leucócitos está relacionada a uma resposta menos satisfatória ao tratamento, especialmente em pacientes com LLcPb (**Pui et al., 2008**). Este sistema de avaliação tem pouco valor preditivo em crianças com LLA-T. No entanto, crianças com leucemia tipo T e uma contagem de leucócitos superior a  $400 \times 10^9$  células por litro enfrentam um alto risco de complicações, como hemorragias no sistema nervoso central, problemas pulmonares e neurológicos devido à hiperleucocitose sistêmica. De modo geral, crianças consideradas de baixo risco têm um prognóstico mais favorável do que aquelas classificadas como de alto risco. Portanto, o grupo de risco é utilizado para determinar a intensidade do tratamento (**Inaba et al., 2013**).

Desde os anos 80, a realização da imunofenotipagem no momento do diagnóstico tem sido crucial para determinar a linhagem leucêmica, sendo especialmente essencial na diferenciação entre LLcPb e LLA-T, já que não há distinção morfológica entre elas (**Sobol et al., 1987**). Durante esse período, os marcadores imunofenotípicos associados à linhagem mieloide, como CD13 e CD33, expressos em pacientes com LLA, foram descritos como indicadores de prognóstico adverso, tanto em adultos quanto em crianças (**Sobol et al., 1987**). No entanto, estudos posteriores não demonstraram uma associação entre a presença de marcadores mielóides nas leucemias linfóides e o prognóstico (**Pui & Look, 1990**).

## 1.2 Histórico

Em 1827, foram descritos os primeiros casos de leucemia na literatura médica pelo médico francês Alfred Armand Louis Marie Velpeau. Tendo relatando uma paciente de 63 anos com sintomas como febre, fraqueza, cálculos renais, hepatomegalia e esplenomegalia, além de sangue com características anormais (Huntly & Gilliland, 2005). A causa da doença foi inicialmente atribuída ao aparecimento de "corpúsculos brancos". Quase vinte anos depois, em 1845, o médico inglês John Hughes Bennett fez a primeira descrição da leucemia como um distúrbio sanguíneo. O médico francês Alfred Donné foi quem realmente descreveu a leucemia como uma doença (Huntly & Gilliland, 2005).

Na cidade de Edimburgo, capital da Escócia, Bennett publicou um documento intitulado "*Spleen and Liver Hypertrophy Process*", onde relatou diversos casos de óbitos de pacientes com esplenomegalia e alterações na cor e consistência do sangue. Nessa época, ele usou o termo "leucocitemia" para descrever a patologia, reutilizando-o em 1845 no título de um livro que escreveu, no qual registrou o primeiro caso de cura que publicou naquele ano (Huntly & Gilliland, 2005).

O termo leucemia foi utilizado pela primeira vez em 1856 pelo patologista alemão Rudolf Ludwig Karl Virchow. Pioneiro no uso do microscópio ótico em patologia, Virchow descreveu o excesso de glóbulos brancos nos pacientes com a síndrome clínica relatada por Velpeau e Bennett. Sem saber a causa da elevada presença desses glóbulos brancos no sangue, ele chamou suas observações simplesmente de "leucemia", que em grego significa "glóbulos brancos". Em 1877, Paul Ehrlich desenvolveu uma técnica de coloração que permitiu diferenciar entre leucócitos normais e anormais, um avanço importante para a classificação das leucemias (Huntly & Gilliland, 2005).

A sequência de classificação respeita a convencional subdivisão primária baseada na linhagem celular, com tumores de células progenitoras precedendo as formas malignas maduras (Alaggio et al., 2022; Bennett et al., 1976). Contudo, os progressos na imunologia, biologia molecular e citogenética aprimoraram significativamente o entendimento dos marcadores biológicos que identificam as células leucêmicas (Bennett et al., 1976).

A classificação tradicional das leucemias fundamenta-se na morfologia celular e nas características citoquímicas. Contudo, os progressos nas áreas de imunologia, biologia molecular e citogenética aprimoraram significativamente o entendimento dos marcadores biológicos que diferenciam as leucemias leucêmicas. O desenvolvimento do sistema de classificação FAB em 1976 representou um dos marcos essenciais no processo de categorização da leucemia (Bennett et al., 1976; Tracy & Eve, 2017). Este sistema foi fundamentado na morfologia, complementado pela citoquímica e, até certo ponto, pela imunofenotipagem (Tracy & Eve, 2017). Na última década, a classificação baseada em FAB, foi cada vez mais complementada e substituída pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) (Chiaretti et al., 2014; Lightfoot et al., 2016). A classificação da OMS é baseada na morfologia (citologia ou histologia), mas também utiliza amplamente a imunofenotipagem por citometria de fluxo, citogenética e análise genética molecular (Tracy & Eve, 2017). A classificação dos tumores linfoides segundo a OMS, tem servido como um ponto de referência global para a identificação de neoplasias linfoides desde a sua terceira edição em 2001. Este sistema de classificação da OMS foi baseado na Classificação REAL desenvolvida pelo *International Lymphoma Study Group* (ILSG) no início dos anos 1990 (Alaggio et al., 2022; Arber, 2019; Bloom et al., 2020). As definições estabelecidas nas sucessivas classificações da OMS foram adotadas além de serem incorporadas aos códigos da Classificação Internacional de Doenças (CID), servindo assim como uma referência global para monitoramento epidemiológico em organizações nacionais e internacionais de políticas de saúde (Alaggio et al., 2022).

Apesar da relevância cada vez maior das pesquisas moleculares e genéticas na classificação das leucemias, essas técnicas só podem ser realizadas em laboratórios altamente especializados e exigem conhecimentos técnicos avançados (Vardiman et al., 2009). Portanto, a análise morfológica e fenotípica por meio da citometria de fluxo continua sendo uma ferramenta essencial para um diagnóstico diferencial preciso das leucemias e para acompanhar a resposta ao tratamento, especialmente em regiões com recursos limitados (Peters & Ansari, 2011; Rashed et al., 2018; Vardiman et al., 2009). A citometria de fluxo é uma técnica amplamente empregada para analisar células em suspensão, graças à sua capacidade de realizar análises multiparamétricas (como tamanho, complexidade citoplasmática e composição bioquímica e/ou antigênica) e quantitativas de populações celulares heterogêneas de maneira objetiva, sensível, rápida e precisa (Mittag & Tárnok, 2009; Preffer & Dombkowski, 2009; Smaldone et al., 2019).

Na região da África Subsaariana, as taxas de mortalidade infantil figuram entre as mais elevadas globalmente (Carreira et al., 2014). A dificuldade em estimar a incidência global em África decorre da escassez de estatísticas hospitalares essenciais e da ausência de registos nacionais de cancro na maioria dos países do continente. As taxas de incidência reportadas oscilam entre 5% e 15,5% de todos os casos de tumores malignos (Hadley et al., 2012).

### 1.3 Classificação da OMS

A primeira classificação da OMS para a LLA foi introduzida em 1997, utilizando apenas a morfologia e o perfil citogenético das células neoplásicas como critérios. Ela distinguia três tipos de LLA: LLAcPb, LLA-T e Leucemia de Células Burkitt (Vardiman, 2010). A OMS, desde a década de 90 com atualização em 2008, faz uso de marcadores citogenético-molecular para classificar a LLAcPb. Foram definidos 7 subtipos genéticos: t(9;22)(q34;q11.2) BCR-ABL, rearranjos envolvendo MLL (KMT2A), t(12;21)(p13;q22) ETV-RUNX1, t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH@, t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1, hiperdiploidia (> 46 cromossomas) e hipodiploidia (< 46 cromossomas). Estas mutações têm sido associadas à perda de genes supressores de tumor e também a outras alterações, tanto ao nível do desenvolvimento da linhagem celular dos linfócitos B bem como da ativação aberrante de vias de transdução de sinal (Inaba et al., 2013; Jin et al., 2012; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017).

De acordo com a OMS, as neoplasias hematológicas englobam as leucemias, síndromes mieloproliferativas, síndromes mielodisplásicas, linfomas e discrasias de células plasmáticas. Na classificação da OMS de 2008 e 2016, os linfomas linfoblásticos também estão incluídos na LLA. Esses linfomas compartilham muitas características com a LLA, diferenciando-se principalmente pelo local inicial de apresentação da neoplasia. O termo "linfoma" é utilizado quando a neoplasia está confinada a uma lesão extramedular, com pouco ou nenhum envolvimento da medula óssea e do sangue periférico. Quando há um envolvimento significativo da MO e do sangue, a condição é considerada uma leucemia (Bain, 2017).

A classificação das neoplasias linfoides atualmente reconhecida é a da OMS, revisto pela última vez em 2016. Essa atualização organiza as doenças linfoides malignas em cinco grupos: neoplasias de células B maduras, neoplasias de células T e NK, linfomas de Hodgkin, doenças linfoproliferativas pós-transplante e neoplasias de células histiocíticas e dendríticas (Arber et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017; Vardiman et al., 2009). As neoplasias de células B maduras incluem diversas doenças, como a leucemia linfocítica crônica B/linfoma linfocítico de pequenas células (LLC-B/LLCP), o linfoma esplênico de células B da zona marginal, a leucemia de células cabeludas (LCC), o linfoma linfoplasmocítico, o linfoma folicular, o linfoma de células do manto (LCM), o linfoma de Burkitt, o linfoma difuso de

grandes células B, entre outras, tabela 1 (Swerdlow et al., 2016). Esse sistema é útil não apenas para a classificação, mas também para o diagnóstico e a escolha do protocolo terapêutico a ser seguido (Vardiman, 2010).

Distúrbios na forma de aneuploidia podem ser detetados em ambos grupos de pacientes (Panuciak et al., 2023). Ploidia é um termo utilizado para descrever células que possuem um número total de cromossomos que não é um múltiplo do conjunto normal haploide, indicando um estado com um cariótipo desequilibrado (Panuciak et al., 2023). A ocorrência de aneuploidias, embora esteja associada ao aumento da sobrevivência em certas malignidades hematológicas, está relacionada a um pior prognóstico em outras neoplasias (Brown et al., 2012).

Os tipos mais distintos de variações cromossômicas, como hipodiploidia e hiperdiploidia, são particularmente associados à LLAcPb, enquanto a aneuploidia na LLA-T é menos documentada. A leucemia hiperdiploide é considerado como o melhor prognóstico e a hipodiploide, como prognóstico adverso (Blunck et al., 2019; Chen et al., 2015; Lejman et al., 2022; Panuciak et al., 2023; Pierzyna-Świtłała et al., 2021; Ribera, 2021)

Hiperdiploidia é um termo que se refere a uma alteração genética específica presente na LLAcPb, nesses casos, as células afetadas possuem um número de cromossomas maior que o normal de 46, com uma ou mais cópias adicionais de determinados cromossomas. A hiperdiploidia foi descrita pela primeira vez há mais de 50 anos e, com pesquisas adicionais, foi dividida em dois subgrupos principais, baixa hiperdiploidia e alta hiperdiploidia (Panuciak et al., 2023).

A alta hiperdiploidia é geneticamente caracterizada por uma ploidia extensa, manifestando-se como um aumento não acidental no número de cromossomas, resultando em trissomias e tetrassomias individuais (Panuciak et al., 2023). Essa condição é detetada em aproximadamente 25-30% das crianças com LLAcPb constituindo o maior subgrupo citogenético dessa doença (Panuciak et al., 2023; Woo et al., 2014). Geralmente, afeta crianças pequenas com LLAcPb e é raramente encontrada em bebês, na LLA-T ou na leucemia/linfoma de Burkitt. A idade mediana mais comum de ocorrência é de 4 anos, e estima-se que a condição é rara após os 7 anos (Panuciak et al., 2023). A baixa hiperdiploidia representa cerca de 10-15% dos casos diagnosticados, com uma incidência que aumenta com a idade. Os ganhos cromossômicos podem ocorrer em praticamente qualquer cromossoma. Essa condição está ligada a um tempo de sobrevivência reduzido e, conseqüentemente, a um prognóstico desfavorável, mesmo com tratamento intensivo (Panuciak et al., 2023).

Hipodiploidia refere-se à perda de um ou mais cromossomas e é uma anomalia citogenética pouco comum, presente em cerca de 7% de todos os casos de LLAcPb (Molina et al., 2021; Panuciak et al., 2023). A LLAcPb hipodiploide é dividida em dois grupos: LLA-B baixa hipodiploidia e LLAcPb próximo a haploide. Próximo a haploide é observada em cerca de 0,5% de todos os casos de LLAcPb e ocorre exclusivamente em crianças, e está associado a um prognóstico desfavorável (Duffield et al., 2023; Panuciak et al., 2023).

A única aneuploidia que ocorre com frequência nos casos de LLA-T é próximo a Tetraplóide. No estudo descrito por Ceppi et al., (2022), onde 1,4% dos pacientes foram diagnosticados com LLA-T próximo a Tetraplóide. Próximo a tetraplóide é prevalente entre crianças mais velhas, com uma idade média ao diagnóstico de 8,6 anos. Vários estudos indicaram uma maior prevalência de meninos neste grupo de pacientes com quase tetraploidia (Panuciak et al., 2023).

## 1.4 Epidemiologia das Leucemias Agudas

A LLA é vista principalmente como uma leucemia infantil, com 75% dos casos ocorrendo antes dos 6 anos de idade. No entanto, a taxa de incidência ajustada por idade dessa neoplasia apresenta uma distribuição bimodal, tanto em homens quanto em mulheres, com o primeiro pico entre 0 e 4 anos e um segundo pico por volta dos 75 anos (**Miranda-Filho et al., 2018**).

Considerando diferentes localizações geográficas, a incidência ajustada por idade da LLA nos Estados Unidos é de 1,7 por 100.000 indivíduos por ano, enquanto na Europa esse valor é estimado em 1,3 por 100.000 por ano (**Miranda-Filho et al., 2018; Sant et al., 2010**). Como mencionado anteriormente, a ocorrência dessa neoplasia varia significativamente com a idade. A incidência é mais alta entre os 0 e 14 anos, com 3,59 casos por 100.000 indivíduos, diminuindo para 0,53 por 100.000 em idades mais avançadas. Entre 75 e 99 anos, a taxa de incidência volta a subir, alcançando 1,45 por 100.000 indivíduos (**Sant et al., 2010**).

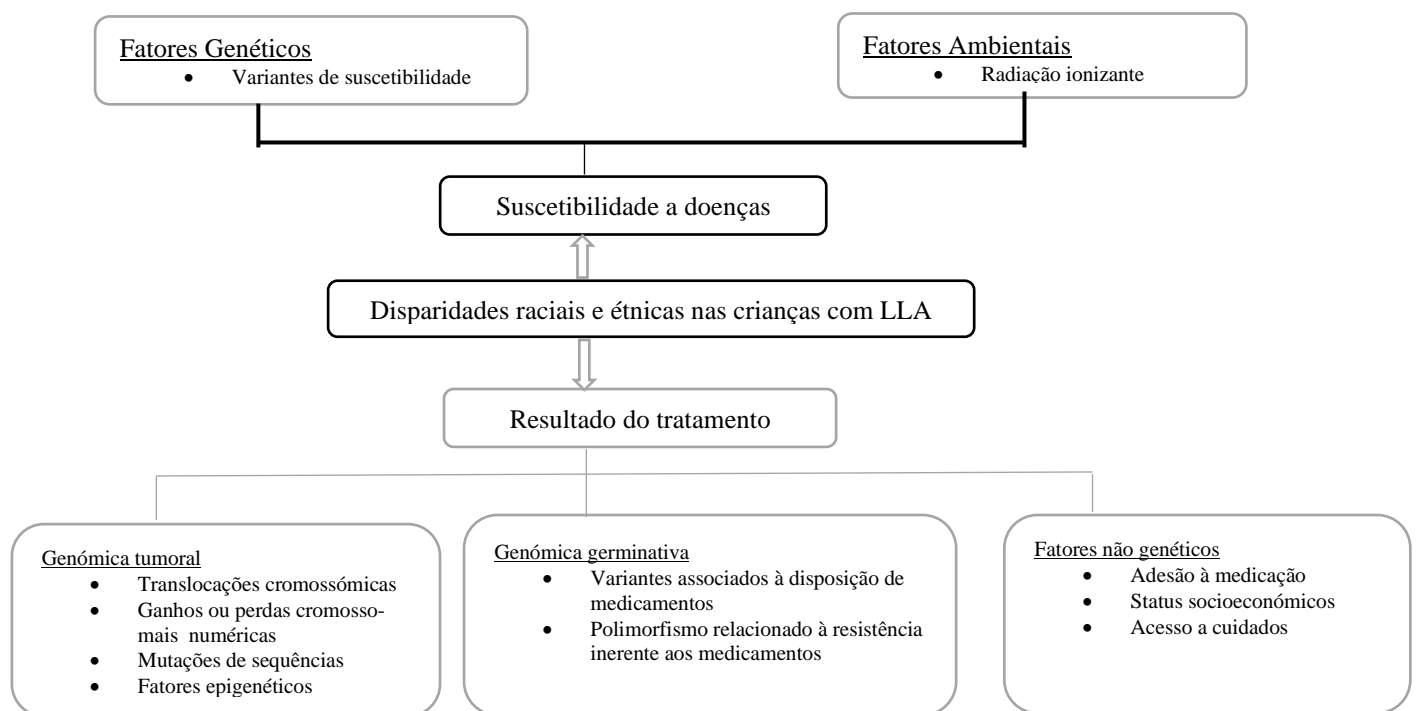
A incidência também varia conforme a população e a localização geográfica, sendo a LLA mais comum em crianças de origem latina/hispânica. Entre os adultos, a LLA é mais prevalente em indivíduos caucasianos comparados com a população negra. Na América do Sul, países como Equador, Costa Rica e Colômbia apresentam o maior número de casos dessa neoplasia (**Lim et al., 2014**). A LLAcPb é a forma mais comum, representando 85% dos casos diagnosticados e ocorrendo igualmente entre os sexos. Em contraste, os 15% restantes, que são classificados como a LLA-T, mostram uma predominância no sexo masculino, com uma incidência cerca de duas vezes maior nos homens (**Dores et al., 2012; Paul et al., 2016**). Além disso, um estudo retrospectivo realizado nos Estados Unidos indicou que jovens diagnosticados com LLAcPb têm maior chance de sobrevivência em comparação com aqueles com LLA-T, enquanto em adultos ocorre o oposto (**Dores et al., 2012**).

Mesmo com os avanços nas pesquisas, é complicado determinar com precisão os eventos que causam o desenvolvimento da LLAcPb em crianças. O que tem sido debatido é que existem fatores conflituantes ou isolados que podem aumentar o risco dessa malignidade, como a história reprodutiva da mãe, uso de álcool ou tabaco pelos pais, exposição a pesticidas ou solventes, uso de estrogênios, entre outros (**Oliveira et al., 2009; Pui et al., 2008**). Há uma leve predominância de casos em homens em todas as faixas etárias, com uma incidência significativamente maior entre crianças brancas (**Onciu, 2009**). A LLA geralmente se apresenta como uma doença primária, com raros casos ocorrendo como neoplasias secundárias (**Onciu, 2009**). Diversos fatores genéticos e ambientais têm sido associados à LLA. Além disso, a exposição a radiações ionizantes, pesticidas e solventes durante a gestação tem sido ligada a um maior risco de leucemia infantil (**Onciu, 2009**). Genes de fusão específicos de leucemia ou imunoglobulina (Ig) e rearranjos genéticos clonais de Ig foram identificados em cartões de sangue de neonatos (Guthrie) de pacientes que posteriormente desenvolveram LLA (**Onciu, 2009**).

Há uma tendência de que países mais industrializados, com populações de maior poder aquisitivo, apresentem taxas mais altas de LLA. Variações intermediárias são observadas em alguns países do leste da Europa, enquanto Israel, China e Índia apresentam baixa incidência (**Gurney et al., 1996; Pui & Crist, 1992**). Alguns estudos indicam um aumento na taxa de incidência de leucemias agudas ao longo do tempo (**Gurney et al., 1996**). No Reino Unido, Kroll e colegas encontraram um aumento no número de casos de LLA-comum, mas não em outros subtipos de LA (**Kroll et al., 2006**).

Nos países nórdicos, a incidência de LLA permaneceu estável nos últimos 20 anos, sem diferença nos subtipos (**Hjalgrim et al., 2003**). Esses dados são difíceis de interpretar, pois podem refletir não um aumento real no número de casos, mas uma melhoria no diagnóstico ou na notificação dos casos. A

distribuição geográfica da carga da leucemia é influenciada pelo nível de desenvolvimento dos países, apresentando incidência ajustada por idade e mortalidade mais elevadas em nações mais desenvolvidas (Baeker Bispo et al., 2020). A incidência geral de leucemias e seus subtipos difere entre indivíduos de diversas faixas etárias, gêneros e etnias (Dong et al., 2020; Lightfoot et al., 2016; Rose-Inman & Kuehl, 2017). Essas disparidades estão principalmente ligadas aos diferentes níveis de exposição a fatores ambientais e genéticos de risco. Em decorrência das iniciativas anteriores para enfrentar a leucemia, a epidemiologia desta doença pode evoluir com o tempo e apresentar variações entre nações (Dong et al., 2020), como mostrado na Figura 1.2. A taxa mais alta de casos de LLA em crianças é observada tanto em homens como em mulheres, entre 1 e 4 anos de idade, apresentando uma queda significativa durante a infância (5-14 anos) e na adolescência até a fase adulta jovem (15-39 anos). A incidência atinge o ponto mais baixo entre os 25 e 45 anos, e aos 65 anos verifica-se um aumento da taxa de incidência no sexo masculino relativamente ao sexo feminino (Lejman et al., 2022; Miranda-Filho et al., 2018). As LLA-T têm maior propensão a se infiltrar em diversos órgãos, especialmente no sistema nervoso central e no mediastino (Karrman, 2016), e demonstram menor sensibilidade às terapias quimioterápicas convencionais. Além disso, há uma probabilidade maior de desenvolver resistência aos medicamentos em comparação com as LLAcPb, o que aumenta o risco de recorrência da doença e, conseqüentemente, de mortalidade (Coustan-Smith et al., 2009; Teachey & Pui, 2019).



**Figura 1.2: Fatores genéticos e não genéticos da leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil.** Fatores genéticos e não genéticos que influenciam as disparidades raciais e étnicas na leucemia linfoblástica aguda (LLA) infantil, adaptado de (Lim et al., 2014).

Também se discute que alguns indivíduos que adquirem um clone pré-leucêmico no útero podem ter tido pouca ou nenhuma exposição a infecções comuns no início da vida. Assim, o isolamento em ambientes extremamente higiênicos predispõe o sistema imunológico desses indivíduos a respostas anômalas ou patológicas após uma exposição subsequente ou tardia a infecções comuns, em uma idade que coincide com o aumento da proliferação de células linfoides ( Greaves, 2006; Muschen, 2015; Pui, 2008).

A LLAcPb inicia-se em uma única célula, seguida pela expansão clonal de células pré-malignas que podem desenvolver características mais agressivas. Devido à natureza oculta da doença em estágios iniciais e à complexidade do desenvolvimento leucémico pré-natal, identificar e caracterizar a célula de origem da LLAcPb continua sendo um desafio (**Rüchel et al., 2022**). A LLAcPb na infância resulta de uma interação complexa entre a genética herdada e as alterações somáticas adquiridas (**Grevas, 2018**). A constituição genética dos pacientes inclui mutações em genes que predis põem ao cancro, polimorfismos de nucleótido único (SNPs) e síndromes de predisposição ao cancro que aumentam a suscetibilidade à leucemia (**Hauer et al., 2021**). Além da genética herdada, aberrações cromossômicas pré-natais, como aneuploidia e translocações intercromossômicas originam células pré-leucêmicas (**Iacobucci & Mullighan, 2017**). Outros eventos oncogênicos nesses clones celulares, geralmente silenciosos clinicamente, são provavelmente desencadeados por fatores ambientais na primeira infância e são necessários para o desenvolvimento da leucemia (**Grevas, 2018**).

Segundo o *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN), a leucemia ocupou a 15ª posição entre os tipos de cancro mais diagnosticados e a 11ª principal causa de mortalidade por cancro em todo o mundo em 2018, resultando em 437.033 casos incidentes e 309.006 mortes atribuídas ao cancro. A carga global da doença leucêmica é mais significativa entre os homens do que entre as mulheres. Em 2018, a taxa de incidência padronizada por idade para homens foi de 6,1 por 100.000, em comparação com 4,3 por 100.000 para mulheres (**Baeker Bispo et al., 2020**).

Em 2018, calcula-se que tenham ocorrido aproximadamente 437,0 mil novos diagnósticos e 309,0 mil óbitos devido à leucemia em nível global (**Dong et al., 2020**). A taxa de sobrevivência global em cinco anos apresentou variação, desde 5% (anterior a 2001, na Costa do Marfim) até 34% no Egito e alcançando até 70% na África do Sul. Em diversos relatórios, a taxa de sobrevivência dos pacientes não é mencionada, mas evidencia-se ser notavelmente baixa em muitos países da África Subsariana, como Sudão e Nigéria (**Hadley et al., 2012**).

A estimativa da incidência de cancro em Moçambique para o ano de 2012 foi realizada pela organização GLOBOCAN, empregando dados regionais e informações de países próximos, conforme categorias de diagnóstico estabelecidas na 10ª edição da Classificação Internacional de Doenças para neoplasias (**Carreira et al., 2014**). No entanto, a GloboCan projetou para 2018 a ocorrência de 461 novos casos de leucemia pediátrica em Moçambique, com maior abrangência de casos em Maputo. Assim, muitos casos podem ter sido subdiagnosticados (**Tracy & Eve, 2017**). À medida que o conhecimento sobre essas anormalidades cromossômicas se consolida, elas são gradualmente incorporadas como importantes marcadores citogenéticos-moleculares no diagnóstico da doença. Esses marcadores são utilizados para definir o subtipo, estratificar o risco e prognosticar, direcionando os pacientes para o tratamento adequado da doença.

## 1.5 Aspetos Fisiopatológicos

A leucemia manifesta-se por meio de uma falha no processo de amadurecimento das células, resultando num desequilíbrio entre a sua taxa de divisão e a maturação (**Bain, 2017; Brown et al., 2012**). Consequentemente, as células de um clone leucémico continuam a reproduzir-se sem se desenvolver em células maduras e, por fim, morrem. Isso leva a um contínuo aumento do clone leucémico e à predominância de células imaturas (**Bain, 2017; Brown et al., 2012**). Em contrapartida, as leucemias crônicas são marcadas por uma proliferação mais lenta das células, que mantêm a capacidade de se transformar em células maduras, são menos agressivas, mais desafiadoras de tratar e, mesmo na ausência de tratamento,

podem apresentar um curso clínico prolongado (**Brown et al., 2012; Enawgaw et al., 2021; Lightfoot et al., 2016**).

A principal categorização da leucemia envolve a distinção entre os tipos linfóides, que apresentam maior incidência em crianças e adolescentes, e mielóides, que são mais comuns em adultos e contribuem com menos de 20% de todas as leucemias em crianças (**Salles Filho & Campos, 2022; Smaldone et al., 2019; Wiemels, 2012**).

## 1.6 Fatores de risco

Infeções comuns têm o potencial de modificar os genes relacionados à proliferação celular e aos padrões de metilação do DNA, contribuindo assim para uma evolução atípica da leucemia linfoblástica aguda (LLA) (**Timms et al., 2016**). Os compostos químicos mais frequentemente ligados à leucemia infantil são os hidrocarbonetos e os pesticidas. Pesquisas examinaram a relação entre a leucemia na infância e a exposição, tanto direta quanto indireta, a essas substâncias (**Freedman et al., 2001; Shu et al., 1999**). Hidrocarbonetos são compostos orgânicos formados por átomos de carbono e hidrogênio. Podem ser encontrados em casa especializadas em tintas e em indústrias de solventes. O benzeno, amplamente utilizado por pintores e presente em plásticos, é o composto mais conhecido. Diversos estudos têm mostrado uma associação estatisticamente significativa entre o benzeno e a leucemia (**Freedman et al., 2001**). No fígado ou pulmão, ocorre a metabolização do benzeno para óxido de benzeno e hidroquinona, seguido pela conversão subsequente em benzoquinona na medula óssea. É nesse local que, normalmente, ocorrem citotoxicidade e danos ao DNA (**Xie et al., 2005**). Aumenta a probabilidade de desenvolver LLA quando há danos prolongados ao DNA na MO (**Mansell et al., 2019**). De acordo com uma pesquisa recente, a redução do risco de LLA em descendentes pode ser alcançada ao evitar exposições ao benzeno tanto no ambiente de trabalho quanto no ambiente geral durante a gravidez (**Zhou et al., 2014**).

## 1.7 Tratamento

Um elemento chave para o êxito no tratamento da leucemia é identificá-la precocemente, classificar seus tipos e subtipos, o que permite a aplicação de abordagens terapêuticas específicas para cada caso, proporcionando assim uma elevada taxa de sobrevivência e minimizar os efeitos colaterais a longo prazo (**Blunck et al., 2019; Brown et al., 2012; Inaba et al., 2013**).

A acumulação de leucócitos anormais resulta em insuficiência da MO, envolvimento do sangue periférico e infiltração de órgãos do corpo (**Dong et al., 2020**). Crianças cuja contagem de glóbulos brancos é inferior a  $5 \times 10^9$  células por litro são classificadas como de baixo risco, enquanto aquelas com contagens iguais ou superiores a  $5 \times 10^9$  células por litro são consideradas de alto risco (**Pui, 2008**). O conceito de grupo de risco é empregado para determinar a intensidade do tratamento (**Inaba et al., 2013**). Uma análise minuciosa do risco de recorrência de um paciente assegura que apenas aqueles com alto risco recebam tratamento intensivo, poupando assim os de baixo risco dos efeitos colaterais tóxicos da quimioterapia (**Pui, 2008**). No entanto, as dosagens e a programação da quimioterapia combinada foram otimizadas com base em vários aspectos, potencializando as características biológicas das células leucêmicas (**Inaba et al., 2013**).

O imunofenótipo descreve as células leucémicas com base nas proteínas expressas e na semelhança delas com as células que se desenvolveriam eventualmente em linfócitos B ou linfócitos T ( **Cooper, S. L. 2015**). Atualmente, o tratamento padrão para a leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcpB) em crianças envolve uma abordagem terapêutica direcionada ao risco ( **Huang et al., 2020; Cooper, S. L. 2015**).

O protocolo terapêutico convencional compreende um curso de quimioterapia com duração de 2 a 3 anos. Para muitos pacientes, a remissão completa é alcançada ao término da fase de indução ( **Huang et al., 2020**). O início da quimioterapia é marcado pela fase de indução da remissão, que se estende por um período de 4 a 6 semanas ( **Cooper, S. L. 2015**).

Na fase de consolidação, o objetivo é eliminar a doença residual submicroscópica que persiste mesmo após alcançar a remissão completa. Essa etapa, que dura cerca de 6 a 9 meses, apresenta variações na duração e intensidade conforme os diferentes protocolos, sendo que pacientes com maior risco de doença recebem regimes de consolidação mais prolongados e intensivos. Nesta fase o objetivo é evitar o desenvolvimento adicional de células leucémicas, diminuir a carga tumoral remanescente e prevenir a resistência a medicamentos em outras células leucémicas ( **Cooper, S. L. 2015**).

A etapa de manutenção representa a fase final e mais extensa do tratamento para a leucemia linfoblástica aguda (LLA) em crianças ( **Cooper, S. L. 2015**). Com um regime consideravelmente menos rigoroso em comparação com a quimioterapia anterior, a fase de manutenção prolongada tem mostrado reduzir o risco de recidiva após a remissão. Essa fase geralmente se estende por pelo menos 2 anos (podendo ser estendida para 3 anos em alguns protocolos para meninos) ( **Huang et al., 2020; Cooper, S. L. 2015**).

O tratamento focalizado no sistema nervoso central (SNC). Essa estratégia engloba o tratamento de pacientes que apresentam manifestações clínicas do SNC no momento do diagnóstico, bem como a profilaxia para aqueles com evidências subclínicas da doença ( **Cooper, S.L. 2015**).

À medida que avançamos nas melhorias médicas, identificamos um número crescente de elementos de risco associados à LLAcpB. Reduzir esses fatores de risco, portanto, poderia contribuir para a diminuição da prevalência dessa condição ( **Huang et al., 2020**).

Embora a classificação da leucemia ser essencial para definir o tratamento apropriado, até o final de 2019, em Moçambique, o diagnóstico era realizado somente com base na análise de lâminas de amostras de sangue periférico e aspirados de MO ( **Tasian et al., 2015**). Em Moçambique, o Serviço de Oncologia do Hospital de Referência para o tratamento da leucemia estimou uma taxa de mortalidade de 76% e uma taxa de sobrevivência cumulativa de 24% ( **Douamba et al., 2018**).

## **1.8 Diagnóstico**

Como mencionado anteriormente, o diagnóstico de LLA exige a presença de pelo menos 20% de linfoblastos neoplásicos na medula óssea. No entanto, para confirmar o diagnóstico e realizar a estratificação de risco, é necessário realizar uma avaliação adicional. Isso inclui uma série de estudos, como análises morfológicas, citoquímicas, genéticas e de imunofenotipagem, conforme detalhado na mais recente classificação da OMS (2016) ( **Chiaretti et al., 2014; Hoelzer et al., 2016; Paul et al., 2016; Terwilliger & Abdul-Hay, 2017**).

O diagnóstico das leucemias agudas é fundamentado nos resultados das análises morfológicas da MO, juntamente com reações citoquímicas, perfil imunofenotípico e citogenético das células leucêmicas. Essa classificação é crucial para a decisão terapêutica, o prognóstico e a padronização dos estudos científicos sobre a etiopatogênese (Arber et al., 2016). O diagnóstico precoce da leucemia e a subsequente classificação dos diferentes tipos e subtipos desempenham um papel fundamental no êxito do tratamento da doença, permitindo a aplicação de abordagens terapêuticas direcionadas a cada forma específica de leucemia. A idade no momento do diagnóstico exerce uma influência prognóstica significativa, a contagem inicial de leucócitos, as características imunofenotípicas e citogenéticas da população de células imaturas, e a rapidez da resposta ao tratamento inicial no momento do diagnóstico são outros fatores considerados fundamentais para avaliar o nível de risco (baixo, padrão ou alto) (Blunck et al., 2019; Brown et al., 2012; Douamba et al., 2018; Huang et al., 2020; Inaba et al., 2013; Mansoor et al., 2023). Avaliar o nível de risco (baixo, padrão ou alto) em crianças com leucemia envolve considerar a idade da criança, a contagem total de leucócitos, a identificação da linhagem celular responsável pela transformação leucêmica e o grau de maturidade dessas células (Blunck et al., 2019; Brown et al., 2012; Douamba et al., 2018; Inaba et al., 2013). A acumulação de leucócitos anormais resulta em insuficiência da MO, envolvimento do sangue periférico e infiltração de órgãos do corpo (Dong et al., 2020).

Em termos gerais, crianças identificadas como de risco baixo tendem a ter perspectivas mais favoráveis em comparação com aquelas classificadas como de alto risco. Consequentemente, a categoria de risco é empregada para determinar a magnitude do tratamento a ser administrado (Inaba et al., 2013). Crianças entre 1 e 9 anos apresentam uma recuperação mais positiva do que aquelas com menos de 1 ano ou adolescentes (Pui, 2008).

### 1.8.1 Morfologia

A morfologia dos linfoblastos neoplásicos pode variar. A maioria deles é de tamanho pequeno a médio, com núcleo de formato redondo a oval e citoplasma reduzido. A cromatina é condensada e os nucléolos são indistintos ou ausentes, correspondendo à categoria L1 da classificação FAB. Em outros casos, os linfoblastos são maiores e apresentam cromatina mais heterogênea, sendo classificados como L2 na mesma classificação. Esse sistema, no entanto, caiu em desuso e é utilizado apenas para fins descritivos (Chiaretti et al., 2014; Larson et al., 2008). A principal limitação da análise morfológica é a incapacidade de determinar se o caso é de LLA-B ou LLA-T. Além disso, esses critérios nem sempre são suficientes para diferenciar linfoblastos B neoplásicos de linfoblastos B normais (Chiaretti et al., 2014).

### 1.8.2 Citogenética

Os estudos citogenético-moleculares, especialmente com o sequenciamento de genoma de alto rendimento, tornaram-se cada vez mais complexos e abrangentes em todas as patologias oncológicas, incluindo as leucemias (Burns et al., 2021). Nas LA a citogenética desempenha um papel crucial no diagnóstico e na definição da conduta terapêutica, ajudando na identificação de anomalias cromossômicas específicas dos subgrupos da doença, anomalias secundárias e células normais (Murray et al., 2002). Nos últimos 40 anos, a citogenética demonstrou ser uma valiosa ferramenta na exploração da base genética da LLA, enquanto também desempenha um papel fundamental na disponibilização de informa-

ções diagnósticas e prognósticas. Diversas alterações cromossômicas conhecidas são regularmente integradas em estudos clínicos e empregadas na avaliação do risco para a escolha do tratamento, contribuindo consideravelmente para os resultados mais favoráveis atualmente observados na LLA infantil (**Schwab & Harrison, 2018**). Apesar da relevância cada vez maior das pesquisas moleculares e genéticas na classificação das leucemias, essas técnicas só podem ser realizadas em laboratórios altamente especializados e exigem conhecimentos técnicos avançados. Portanto, a análise morfológica e fenotípica por meio da citometria de fluxo continua sendo uma ferramenta essencial para um diagnóstico diferencial preciso das leucemias e para acompanhar a resposta ao tratamento, especialmente em regiões com recursos limitados (**Peters & Ansari, 2011; Rashed et al., 2018; Vardiman et al., 2009**).

A incidência de casos sem alterações citogenéticas detetáveis varia bastante, em parte devido à dificuldade de avaliar a morfologia dos cromossomos nas metáfases dos blastos leucêmicos. É comum que a citogenética convencional não identifique anomalias cromossômicas em aproximadamente 10% a 15% dos pacientes com LLA. Mais de 30% dos pacientes com LLA-T apresentam um cariótipo normal (**Zen et al., 2004**). Para que um cariótipo seja considerado normal, é necessário analisar pelo menos 20 metáfases sem encontrar alterações. Em muitos casos classificados como normais, a qualidade das metáfases pode ser insuficiente para detectar pequenos rearranjos cromossômicos ou alterações genéticas submicroscópicas, ou os clones podem ser mitoticamente inativos. Muitas vezes, para melhorar a qualidade da análise, são necessárias técnicas moleculares, como a *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH). A translocação t(12;21)(p13;q22) é um exemplo de alteração que não pode ser identificada pela citogenética convencional (CC) (**Zen et al., 2004**).

A análise citogenética das células leucêmicas por meio do bandeamento cromossômico é crucial para o diagnóstico e prognóstico da LLA. No entanto, essa técnica ainda enfrenta várias limitações na prática clínica. Isso se deve à dificuldade em obter metáfases de alta qualidade na citogenética convencional e ao fato de que algumas alterações crípticas não são identificadas por esse método (**Pui, 2008**). Dessa forma, a citogenética molecular tem sido utilizada com crescente frequência, especialmente as técnicas de reação por transcriptase reversa (RT-PCR) e de hibridização por FISH, nos casos mais comuns de LLA. As translocações cromossômicas que ativam genes específicos são características da LLA e identificam subtipos da doença, sendo encontradas em 75% dos casos. Geralmente, essas translocações ativam genes de fatores de transcrição, que podem controlar a diferenciação celular e frequentemente codificam proteínas envolvidas em cascatas transcricionais. Atualmente, a análise citogenética é considerada uma ferramenta extremamente importante para a determinação do prognóstico nas leucemias (**Popescu & Zimonjic, 1997**).

### 1.8.3 Imunofenotipagem

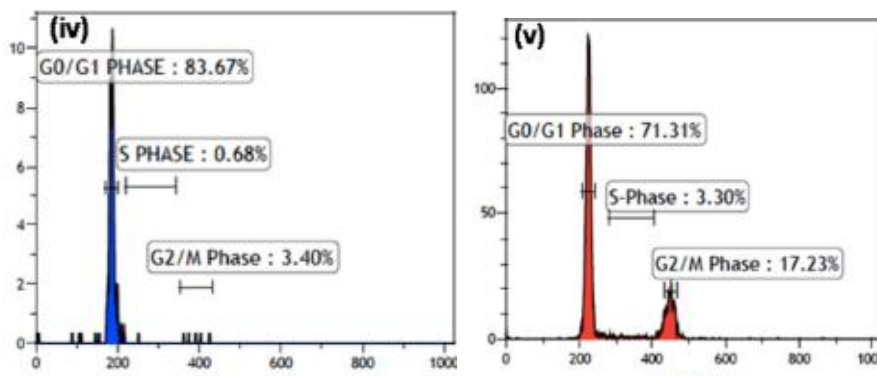
O estudo do imunofenótipo é considerado o método principal para o diagnóstico e a subclassificação da LLA (**Chiaretti et al., 2014; Hoelzer et al., 2016**). Esta avaliação permite determinar a linhagem celular envolvida no processo neoplásico, tornando-se essencial para confirmar um diagnóstico que tenha sido baseado apenas em critérios morfológicos (**Chiaretti et al., 2014**). Para realizar esses estudos, são coletados aspirados de MO e amostras de SP, cujos materiais celulares são submetidos à imunofenotipagem. A CF, que utiliza marcadores citoplasmáticos e de superfície celular, é a técnica mais comumente utilizada. Quando há poucas células disponíveis para análise, considera-se a utilização da imunocitoquímica (**Bain, 2017**). Esse tipo de análise utiliza anticorpos marcados para reconhecer os epítomos dos antígenos celulares. Para a linhagem B, são utilizados anticorpos específicos para determinados marcadores expressos pelos linfócitos B, como CD19 e CD22. O CD79a também é empregado, embora não

seja totalmente específico, pois pode ser expresso em alguns casos de LLA-T. Outros marcadores, como CD20 e CD24, também são considerados na análise, mas nem sempre produzem resultados positivos (Bain, 2017; Coustan-Smith et al., 2009).

Desde os anos 80, a realização da imunofenotipagem no momento do diagnóstico tem sido crucial para determinar a linhagem leucêmica, sendo especialmente essencial na diferenciação entre LLcpB e LLA-T, já que não há distinção morfológica entre elas. A expressão de marcadores imunofenotípicos associados à linhagem mieloide em pacientes com LLA, como o marcador CD13 e CD33, foram identificados como indicadores de prognóstico desfavorável, tanto em adultos quanto em pacientes pediátricos (Sobol et al., 1987). A LLAcPb geralmente apresenta resultados favoráveis em crianças, registrando taxas de cura próximas a 90% quando tratada com protocolos modernos adaptados ao risco (Schwab & Harrison, 2018). Resposta precoce a corticoterapia (prednisolone) e o *status* de remissão após indução e consolidação da indução, baseada na Doença Residual Mensurável (DRM) são os fatores prognósticos com maior aceitação (Burns et al., 2021; Lato et al., 2021; Tembhare et al., 2020). Diversos autores propuseram uma classificação imunológica das LLAs baseada na expressão de antígenos específicos. Inicialmente, essas leucemias podem ser classificadas como de linhagem T ou B, conforme as características imunofenotípicas dos linfoblastos. Com isso, é possível detetar com precisão tanto a linhagem celular quanto o nível de diferenciação do processo leucêmico.

#### 1.8.4 Índice de DNA

O Índice de DNA é um método amplamente reconhecido para identificar a alta hiperdiploidia (Yu et al., 2020). Através do Índice de DNA (DI), avaliado por citometria de fluxo, faz-se uma correlação da quantidade de DNA presente nas células em fase G0/G1 do ciclo celular, com o número de cromossomas presentes nestas células (Figura 1.3). A técnica de DI ainda enfrenta várias limitações na prática clínica. Isso se deve à dificuldade em obter metáfases de alta qualidade na citogenética convencional e ao fato de que algumas alterações crípticas não são identificadas por esse método (Pui, 2008). As translocações cromossômicas que ativam genes específicos são características da LLA e identificam subtipos da doença, sendo encontradas em 75% dos casos. Geralmente, essas translocações ativam genes de fatores de transcrição, que podem controlar a diferenciação celular e frequentemente codificam proteínas envolvidas em cascatas transcricionais (Popescu & Zimonjic, 1997). Esta técnica torna-se uma alternativa à citogenética, como ferramenta para avaliação da ploidia em diferentes doenças, sendo utilizada em especial nas LLAcPb (Gupta et al., 2019).



**Figura 1.3: Análise de ciclo celular.** Análise de ciclo celular com representação em histogramas da quantidade de DNA de linfócitos (IV) e blastos (V) de paciente diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcpB) (Gupta et al., 2019).

## 1.9 Avaliação da Ploidia

A análise da ploidia por citometria de fluxo (CF) é um método simples e rápido para estudar o conteúdo de DNA das células e estimar a proporção de células nas diferentes fases do ciclo celular (Gupta et al., 2019; Pierzyna-Świtła et al., 2021). Utilizando a FC, é possível identificar objetivamente os clones aneuploides através da determinação do DI e da análise quantitativa das fases individuais do ciclo celular (Pierzyna-Świtła et al., 2021). Até agora, ficou evidenciado que as mudanças cromossômicas desempenham uma função crucial na origem, progressão, tratamento e previsão do desfecho da leucemia infantil (Grevas, 2018). Dentro das descobertas cromossômicas, destaca-se o DI, que indica a quantidade de material genético nas células leucémicas, é a razão entre o pico G0/G1 de uma população de teste e o pico G0/G1 de uma população diploide conhecida e tem sido reconhecido como um elemento prognóstico significativo na avaliação do risco (Krueger & Wilson, 2011; Qiu et al., 2021).

Uma das modificações genéticas mais comuns encontradas nas LLAcpB em crianças é a aneuploidia (condição em que a célula ou organismo possui um número anormal de cromossomas), geralmente identificada através de técnicas de cariótipo ou DI (Groeneveld-Krentz et al., 2019). O iodeto de propídeo (PI) é um corante que se liga à estrutura helicoidal do DNA (Gupta et al., 2019). A intensidade da fluorescência resultante da ligação do fluorocromo ao DNA é proporcional à quantidade de material genético presente no núcleo celular. Esta técnica não apenas revela como as populações celulares estão distribuídas nas diversas fases do ciclo celular, mas também facilita a detecção de mudanças clonais (aneuploidias) no conteúdo de DNA das células (Palmeira & Martins, 2007); e permite correlacionar o conteúdo de DNA com a expressão de antígenos celulares, que podem ser obscurecidos pela presença de células não tumorais em grande quantidade. Para a avaliação de risco das LLAcpB são utilizados os grupos que se encontra na tabela 1.1 onde a hipodiploidia está associada a mau prognóstico enquanto as células hiperdiploides que apresentam  $DI \geq 1,16$ , demonstram relação com melhor prognóstico (Gupta et al., 2019; Pierzyna-Świtła et al., 2021; Swerts et al., 2007). O *status* da ploidia foi avaliado usando a tabela de (Gupta et al., 2019) e DI, conforme relatado anteriormente.

**Tabela 1.1: Valores de Índice de DNA por citometria de fluxo e números cromossômicos modais.** Índice de DNA de citometria de fluxo e números cromossômicos modais correspondentes usados como referência no estudo (Gupta et al., 2019).

Grupo de Ploidia	Valores do Índice de DNA (Citometria do Fluxo)	Número modal de cromossomas	Prognóstico
Próximo a haplóide	0.55 a 0,69	24-29	Mau prognóstico
Baixa-hipodiplóide	0.70 a 0.88	31-39	Mau prognóstico
Alta- hipodiplóide	0.89 a 0.95	40-45	Bom prognóstico
Diplóide	0.96 a 1.05	46	Normal
Baixa- hiperdiploide	1.06 a 1.15	47-50	Mau prognóstico
Alta- hiperdiploide	1.16 a 1.39	51-65	Bom prognóstico
Próximo a Triplóide	1.40 a 1.79	66-80	Mau prognóstico
Próximo a Tetraplóide	1.80 a 2.28	81-102	Mau prognóstico

## 1.10 Justificativa

Em países desenvolvidos a cura para o cancro é agora uma realidade, com taxas de sobrevivência atingindo cerca de 80%, sendo que mais de 80% das crianças em África ainda perdem suas vidas devido à falta de acesso a tratamentos adequados (Hadley et al., 2012). Na região da África Subsaariana, as taxas de mortalidade infantil figuram entre as mais elevadas globalmente (Carreira et al., 2014).

Em Moçambique, a leucemia é a principal causa de hospitalização nos serviços de oncologia pediátrica do Hospital Central de Maputo, onde tem registado elevadas taxas de mortalidade principalmente em crianças dos 0-15 anos (Tracy & Eve, 2017).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento significativo do diagnóstico de leucemias agudas pediátricas em Moçambique através da implementação do diagnóstico por imunofenotipagem pelo Instituto Nacional de Saúde. Contudo, o diagnóstico está limitado a capital do país. Para as províncias mais distantes, enfrentam-se várias limitações devido a logística para o transporte de amostras e pacientes para a capital, para a realização do diagnóstico e tratamento.

Assim, há uma necessidade urgente da implementação de novas técnicas que sejam efetivas para o diagnóstico das leucemias em pacientes acometidos de modo a definir os subtipos moleculares, que serão essenciais para a melhor classificação de risco e tratamento mais adequado, e a técnica do índice de DNA é uma ferramenta muito útil.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

- Padronizar e implementar a técnica de índice de DNA (DI), como ferramenta do diagnóstico em crianças de 0-14 anos com LLAcPb do Brasil/ Bahia, e em Moçambique.

### 2.2 Objetivos específicos

- Determinar as características clínico demográfico dos pacientes.
- Identificar o tipo de leucemia por imunofenotipagem.
- Comparar os resultados da imunofenotipagem de acordo com o tipo de citómetro, solução de lise, uso de iodeto de propídeo e uso de marcador clonal no Brasil e Moçambique.

## 3 MATERIAL & MÉTODOS

### 3.1 Participantes da Pesquisa

Fez-se uma amostragem por conveniência, onde foram analisados 18 casos de pacientes suspeitos referenciados, 8 amostras controlos, para o hospital Aristides Maltez- Bahia, 10 casos de pacientes suspeitos referenciados e 5 amostras controlos para o Hospital Central de Maputo- Moçambique.

Das amostras analisadas utilizou-se SP e MO, em tubos de etilenodiaminotetracético (EDTA), de indivíduos com suspeita de leucemia aguda e 13 amostras de pacientes que não foram diagnosticados com neoplasias, usadas como controlo na Bahia e Moçambique, seguindo a rotina estabelecida nos serviços de pediatria.

Os pacientes selecionados foram diagnosticados através das diretrizes da Organização Mundial da Saúde (Arber et al., 2016). O critério de diagnóstico foi baseado na apresentação clínica, hemograma completo, esfregaços morfológicos e imunofenotipagem de MO e/ou SP. É considerada leucemia aguda a presença de 20% ou mais de blastos na medula óssea ou no sangue periférico, avaliados através de esfregaços morfológicos. Dos participantes deste estudo foram obtidos dados demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, naturalidade, tipo de amostra utilizada no diagnóstico, percentual de blastos leucêmicos, leucometria (contagem de leucócitos, células sanguíneas brancas).

As amostras do Brasil foram transportadas no gelo e as amostras de Moçambique foram transportadas a temperatura ambiente até o laboratório para serem processadas dentro de seis horas após a colheita. No laboratório as amostras foram manuseadas seguindo os procedimentos operacionais padronizados em vigor.

### **3.2 Desenho do Estudo**

Trata-se de um estudo laboratorial e observacional transversal, onde foi determinado o índice de DNA em 18 pacientes pediátricos com LLAcPb analisados nos laboratórios dos hospitais públicos de referência na cidade de Salvador, Bahia, Brasil, e 10 no hospital central de Maputo em Moçambique.

O rastreio dos participantes, foi feito em todos os pacientes que entraram nos serviços de hemato-Oncologia do Hospital central de Maputo com suspeita de leucemia. Foram critérios de inclusão e exclusão para esta componente do estudo os seguintes:

#### **3.2.1 Critérios de Inclusão**

- Pacientes de 0-14 anos de idade oriundos dos hospitais Martagão Gesteira, Aristides Maltez e Hospital Central de Maputo;
- Pacientes com diagnóstico primário confirmado de LLA-cpB;
- Ter assinado o termo de assentimento ou consentimento informado.
- 

#### **3.2.2 Critérios para exclusão para a avaliação**

- Pacientes cujos responsáveis, ou eles próprios, não concordem em assinar os termos de consentimento/assentimento livre e esclarecido;
- Amostras que apresentavam viabilidade abaixo de 75%, e/ou com qualidade de material insuficiente para os testes propostos.

### **3.3 Considerações éticas**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Gonçalo Moniz/Fiocruz Bahia, sob o número CAAE 39054320.7.1001.0040 do Brasil, ver (anexo A) e em Moçambique pelo Comitê Nacional para Saúde (CNBS) com o número 140/CNBS/23, ver (anexo B). O trabalho foi conduzido de acordo com os princípios éticos estabelecidos por diretrizes internacionais, como a Declaração de Helsinquia, as Boas Práticas Clínicas (ICH GCP) E6 (R2), e os princípios das Convenções de Bioética de

Oviedo, além de outras normas aplicadas internacionalmente, da União Europeia e das leis e regulamentos nacionais relativos à condução de estudos e coleta de dados. Como alguns membros da equipe tinham contato diário com os potenciais participantes do estudo, o recrutamento foi realizado apenas por aqueles que estavam diretamente envolvidos na prestação de cuidados a esses participantes.

A confidencialidade foi assegurada em todos os procedimentos do estudo. Para proteger a privacidade dos pacientes, foi utilizado um sistema de códigos para identificá-los. Os prontuários clínicos dos participantes foram armazenados em locais com acesso restrito, disponíveis apenas ao pessoal diretamente envolvido no estudo. Os pacientes foram incluídos no projeto após assinatura do termo de consentimento pelos seus responsáveis legais. As crianças com suspeita de leucemia e seus responsáveis foram informados pelo investigador principal ou uma pessoa devidamente qualificada sobre o estudo, agendamento de visitas e requisitos de amostragem, benefícios esperados e riscos potenciais associados aos procedimentos de protocolo, e foram convidados a serem incluídos no estudo. Perguntas médicas gerais sobre a elegibilidade para inclusão foram feitas pela equipe médica antes do procedimento de consentimento informado. Depois de totalmente informado e concordado, os responsáveis assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para que o paciente participasse do estudo. A linguagem utilizada foi o menos técnica possível e os responsáveis e pacientes não foram indevidamente influenciados para participarem do estudo (ver anexos A a H).

### 3.4 Testes laboratoriais

A colheita das amostras no Brasil foi feita no hospital Martagão Gesteira (HMG), Aristides Maltez (HAM) e processadas no laboratório do Hospital Aristides Maltez (Brasil). Em Moçambique, as amostras foram colhidas no hospital Central de Maputo (HCM) e processadas no laboratório do Centro de Pesquisa em Saúde e Treinamento da Polana Caniço (CISPOC).

### 3.5 Imunofenotipagem para diagnóstico de leucemia aguda

As análises dos pacientes foram feitas segundo os painéis mostrados nas Tabelas 3.1 (anticorpos utilizados no Laboratório do Hospital Aristides Maltez- Bahia) e 3.2 (anticorpos utilizados no Laboratório do Centro de Pesquisa em Saúde e Treinamento da Polana Caniço- Moçambique). A razão da escolha destes anticorpos é por cobrirem toda a linhagem das leucemias em estudo. A aquisição de dados foi feita usando o citómetro de fluxo BD FACS CANTO II (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) em Moçambique e citómetro de fluxo FACS Calibur, DX FLEX B5R3V5 Beckman Coulter e FACS Fortessa na Bahia com as definições do *EuroFlow*, seguindo as diretrizes da BD Sciences *Application Guide for Acute Leukemias*, em até 2 horas após a colheita.

**Tabela 3.1: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados no Brasil- Bahia.** Pannel de anticorpos monoclonais utilizados na realização de diagnóstico das Leucemias Agudas- Brasil, anticorpos, tubos e volume estabelecido na titulação. Adaptado de Euroflow, Hospital Aristides Maltez (Pedral Sampaio).

ANTICORPOS	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AF700	AF750	PacB	KO
TUBO 1	CD18	CD73+CD66	CD19	CD24	CD10	CD304	CD34	CD38	CD20	CD45
TUBO 2	CD20	CD10	CD19	CD24	CD10	CD13+CD33	CD34	CD38	CD22	CD45
VOLUME (µl)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

**Tabela 3.2: Paineis de anticorpos monoclonais utilizados em Moçambique.** Paineis de anticorpos monoclonais utilizados na realização de diagnóstico das Leucemias Agudas (Moçambique). Adaptado de Euroflow, Centro de Pesquisa em Saúde e Treinamento da Polana Caniço.

TUBO	PacB	PaCo	FITC	PE	PerCP-CY5.5	Pe-CY7	APC	APC-H7
1	CD20	CD45	CD58	NG2	CD34	CD19	CD10	CD38
2	CD9	CD45	CD73+CD304	CD66	CD34	CD19	CD123	CD81
<b>VOLUME (µl)</b>	2	2	2	2	2	2	2	2

Abreviaturas: PacB - Pacific Blue; PaCo -Pacific Orange; FITC - Fluorescein Isothiocyanate; PE - Phycoerythrin; PerCP - Peridinin-Chlorophyl-Protein; CY - Cyanin; APC - Allophycocyanin.

### 3.6 Procedimento

O protocolo utilizado nesta tese foi adaptado do protocolo da Euroflow, Hospital Aristidez Maltez (Pedral Sampaio). Brevemente, seguindo o protocolo, utilizou-se uma amostra de sangue de um controlo não oncológico e uma amostra de sangue ou de medula óssea do paciente a ser analisado. Fez-se a contagem da celularidade das amostras no contador celular em câmara Neubauer. De seguida, o volume correspondente a  $2 \times 10^5$  células de cada amostra foi colocado em tubos próprios para análise no citómetro (tubos devidamente identificados como controlo e com identificação do paciente). Dois ml de solução de lise FACS BD (BD) foram adicionados a cada tubo e incubados durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e 2 mL de PBS 1X adicionados, seguidos de centrifugação a 1500 rpm durante 5 minutos e desprezando o sobrenadante. Por fim, adicionou-se 200 µl de RNase e 200 µl de PI, e incubou-se as amostras por 15 minutos (min) à temperatura ambiente e protegido da luz. As amostras podem ser armazenadas no frigorífico e a análise no citómetro pode ser feita no máximo até duas horas após a preparação.

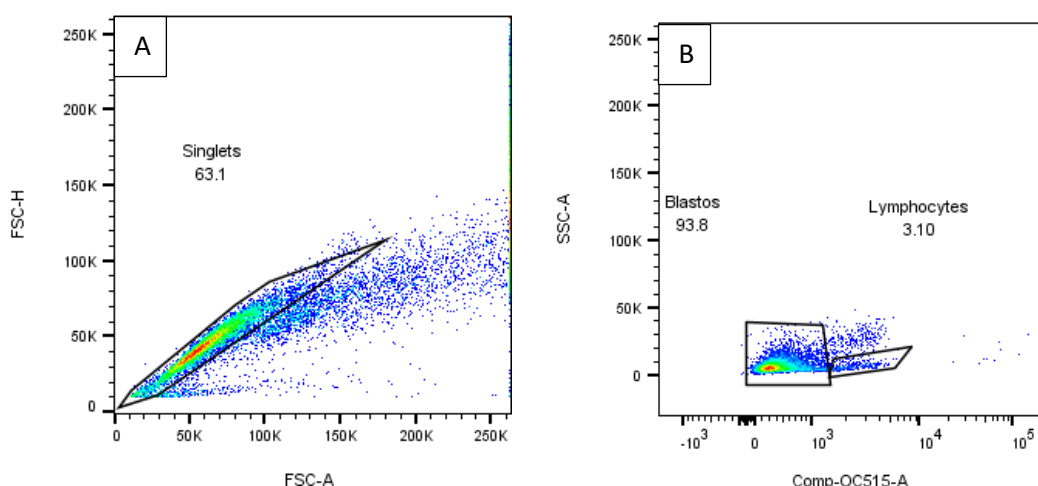
Para os tubos com o marcador CD45 seguiu-se o protocolo de marcação de antígenos de membrana onde colocou-se o volume correspondente do marcador no devido tubo. De seguida o volume correspondente de cada amostra  $2 \times 10^5$  células é colocado em tubos próprios para análise no citómetro (tubos devidamente identificados como controlo e com identificação do paciente), incubamos no escuro durante 15 min, 200µl de solução de lise FACS BD foram adicionados em cada tubo e voltamos a guardar no escuro durante 15 min. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm, durante 5 min e o sobrenadante desprezado. Foram adicionados 200µl de PBS 1X, 200 µl de RNase e 200 µl PI e guardado no escuro durante 15 min. A leitura foi feita o mais rápido possível, no máximo até duas horas após a preparação. Pelo menos 30.000 eventos por tubo foram adquiridos. As análises foram realizadas usando o software Infinicyt™ 1.8 (Cytognos, 10 Salamanca, Espanha) ou o FlowJo, versão 10 (FlowJo Lcc; Ashland, OR, USA).

A população de linfócitos foi definida pelos parâmetros de tamanho e granulosidade, no gráfico FSC (*Forward Scatter*) versus SSC (*Side Scatter*). As populações de blastos leucémicos, hematogónias (células precursoras na linhagem linfoide B, linfócitos maduros e plasmócitos foram identificados com base na expressão da molécula CD45 versus características de granulosidade interna (CD45 X SSC). O índice de DNA foi calculado pela fórmula 3.1 (**Figura 3.1**).

$$\frac{\text{mediana de } \frac{G_0}{G_1} \text{ paciente}}{\text{mediana de } \frac{G_0}{G_1} \text{ doador}}$$

**Fórmula 3.1:** Fórmula para calcular o Índice de DNA.

Em seguida, foi determinado o índice de DNA (DI) das amostras, a percentagem das células na fase G0/G1, a mediana de fluorescência para PI e o coeficiente de variação (CV). A presença de pico G0/G1 foi interpretada como evidência de aneuploidia, e o índice de DNA foi calculado para o pico aneuploide. Houve medição do DI de acordo com as técnicas padrão baseadas nas diretrizes de Gupta et al.(2019). Para padronização do histograma, selecionou-se as células de interesse da MO (linfócitos) no gráfico *Foward Scatter* - log (FSC-A) linear versus *Side Scatter* - Área (SSC-A) linear, **figura 3.2**. Selecionou-se também um dot plot (gráfico de pontos, onde cada ponto é dado o nome de evento). Foi usado uma aquisição de 30.000 a 50.000 eventos em uma taxa baixa de aproximadamente 200 eventos/s.



**Figura 3.2: Análise de ciclo celular de um paciente com leucemia.** Análise de ciclo celular com representação em histogramas da quantidade de DNA. Exclusão dos doubles (A) e seleção de linfócitos normais e blastos leucêmicos (B) de paciente diagnosticado com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcPB).

### 3.7 Controle de qualidade

Todas as técnicas e documentos empregados seguiram diretrizes estabelecidas em protocolos e procedimentos operacionais padronizados (POPs), com testes e validações constantes. Esses documentos foram armazenados nos arquivos do estudo e organizados por tipo. A seleção dos exames para diagnóstico de leucemias agudas foi orientada pelos padrões internacionais recomendados pela OMS, assim como do Índice de DNA que foi padronizado neste trabalho.

Para garantir a qualidade dos testes e resultados, todos os procedimentos laboratoriais realizados no estudo foram acompanhados por controles comerciais da FACS BD. Antes de processar qualquer amostra, calibradores e controles comerciais, todos os analisadores foram devidamente mantidos de acordo com o protocolo do fabricante e a política interna do laboratório.

### **3.8 Manutenção**

Os equipamentos foram submetidos a manutenção diária, semanal e mensal, o que englobava atividades como limpeza, realização de controlo de qualidade e troca de reagentes e instrumentos, conforme necessário.

### **3.9 Análise dos dados**

O plano de análise para o estudo incluiu a produção de estatísticas sumárias (ex. média e desvio-padrão) para os principais indicadores do estudo, dispostos em tabelas e/ou gráficos. Os dados foram analisados usando o pacote de *software* GraphPad Prism version 9. As amostras dos pacientes incluídos no estudo, com diagnóstico de leucemia linfoblástica de células precursoras B (LLA-cpB), avaliados ao diagnóstico foram analisadas individualmente quanto à presença ou ausência da expressão antigénica de cada marcador utilizado na citometria de fluxo. Inicialmente, foi realizada a avaliação exploratória e descritiva dos dados, procurando identificar diferenças em subgrupos de pacientes de acordo com informações como idade, sexo, leucometria e faixa etária.

### **3.10 Análise estatística**

O plano de análise para o estudo incluiu a avaliação descritiva dos dados, procurando identificar diferenças em subgrupos de pacientes de acordo com informações como idade, sexo, leucometria e faixa etária.

### **3.11 Ensaios de padronização**

#### **3.11.1 Comparação do citómetro**

A padronização inicial foi realizada no Brasil. Nos primeiros ensaios foi utilizado o citómetro FACS Calibur, que é um instrumento mais antigo. Os dados não eram homogêneos, com valores e coeficiente de variação (CV) muito altos, o que significa que houve uma variação maior das células adquiridas. Indicando desta forma, a instabilidade do aparelho utilizado. Também foi observado um grande percentual de *debris* celulares e de células mortas, dificultando a comparação de controlo e paciente, daí concluímos que a amostra analisada precisava ser fresca (no máximo 6 horas após a coleta). Nos ensaios seguintes foram testados outros dois citómetros, o FACS Fortessa (BD Biosciences) e DX Flex (Beckman Coulter).

#### **3.11.2 Comparação das soluções de lise**

Primeiramente testou-se a solução de cloreto de amónio ao nosso estudo, visto que, a lise com solução de amónio era preparada na hora e no laboratório e que o mesmo dispunha de reagentes suficientes para o teste, o que poderíamos poupar tempo e custos na compra dos reagentes. Verificou-se que a solução de amónio não era adequada aos nossos experimentos pois nas amostras de pacientes havia grande perda de viabilidade das células, não sendo possível a análise da marcação por PI. Sendo assim foi verificado que a lise das hemácias com solução de cloreto de amónio mostrou-se inadequada, tendo-se optado pelo uso da solução de lise FACS BD e conseguimos identificar as células de interesse. Dessa forma, definiu-se que a solução de lise FACS BD era ideal para o nosso experimento pois mostrou bons resultados. Após a experiência desta técnica no Brasil fez-se a transferência da mesma para Moçambique.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Características Clínico-Demográficas dos Pacientes Incluídos no Estudo

Neste estudo foi feita uma análise prospectiva de casos LLAcPB no centro de referência de oncologia pediátrica na Bahia, onde as informações clínico-demográficas e laboratoriais de 18 crianças com LLAcPB estão apresentadas na tabela 4.1. A idade média do grupo foi de 5,4 anos (variando entre 10 meses e 9 anos); 17 pacientes tinham mais de 1 ano, 9 do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Em 18 amostras colhidas no Brasil, foi realizada análise de índice de DNA, onde 6 pacientes apresentaram alta hiperdiploidia, 4 baixa-hiperdiploidia e 3 diploidia (normal). Nas primeiras 5 amostras feitas na Bahia não conseguimos obter o DI assim como o tipo de ploidia, conforme mostra a tabela 4.1, isto deve-se ao protocolo de lise de hemácias com cloreto de amônio usada primeiramente. Após a padronização no Brasil transferiu-se a técnica para Moçambique onde tivemos 10 pacientes com a idade média de 6 anos (variando entre 1 ano e 14 anos); 9 pacientes tinham mais de 1 ano de idade, 6 do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Em 10 amostras colhidas em Moçambique, realizou-se a análise de DI, onde 6 pacientes apresentaram alta hiperdiploidia, 2 baixa-hiperdiploidia e 2 diploidia (normal), tabela 4.2.

Na padronização da marcação com iodeto de propídeo (Bahia), através de tamanho (FSC-A) e granulidade (SSC-A) fizemos a seleção das células de interesse, onde em A- linfócitos normais e D-blastos leucêmicos, em B e D com FSC-A e FSC-H (altura) separamos os singlets (células individuais) e retiramos os doublets e por fim fez-se os histogramas C e F (histogramas representando a IFM do PI), para a verificação do PI nas células, conforme mostra a figura 4.1. Nos histogramas é onde conseguimos ver o pico G0/G1 de uma população de teste e o pico G0/G1 de uma população diploide conhecida para o cálculo do DI. Na padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal com FSC-A e SSC-A em A pegou-se a região dos blastos, com FSC-A e FSC-H separou-se os singlets. Com o marcador CD45 que reconhece os epítodos dos antígenos celulares conseguimos separar melhor os blastos e linfócitos em C. Em D- pico dos blastos e E- pico dos linfócitos, histogramas representando a população específica em relação à quantidade de DNA, figura 4.2. Com os valores das medianas conseguimos calcular o DI pela fórmula da figura 3.1 adquirindo um DI de 1,2 correspondente a alta-hiperdiploidia.

Após a transferência da técnica para Moçambique fez-se também a padronização com PI onde conseguimos fazer a seleção das amostras de interesse nos dotplots em A e D, a separação dos singlets em B e E e os histogramas representando a IFM do PI, figura 4.3. Com a padronização com o anticorpo monoclonal, selecionamos as células de interesse que são os blastos em A, retirou-se os doublets em B, com o marcador separamos os blastos e os linfócitos em C, em D e E histogramas dos blastos e linfócitos, figura 4.4. Através dos valores das medianas calculamos o DI, onde o DI foi de 1,4 que corresponde a alta-hiperdiploidia.

**Tabela 4.1: Características clínico-demográficas com LLcpB do Brasil.** Características clínico-demográficas e laboratoriais dos pacientes com LLcpB (Brasil- Bahia).

ID	Sexo	Idade (anos)	Amostra	Blastos (%)	Leucometria ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Tipo de leucemia	Índice de DNA	Tipo de ploidia
1	F	4	SP	9,15%	32,020	LLAcpB	-	-
2	F	5	MO	62%	15,960	LLAcpB	-	-
3	F	5	MO	5,66%	26,450	LLAcpB	-	-
4	M	5	MO	84%	18,100	LLAcpB	-	-
5	F	7	SP	46%	31,440	LLAcpB	-	-
6	M	10m	MO	70%	84,740	LLAcpB	1,07	Diploidia (Normal)
7	M	1A,8m	MO	64%	13,789	LLAcpB	1,26	Alta-hiperdiploidia
8	M	3	MO	48%	23,660	LLAcpB	1,02	Diploidia (Normal)
9	M	3	MO	60%	49,410	LLAcpB	1,14	Baixa-hiperdiploidia
10	F	3A,1m	SP	39,7%	8,017	LLAcpB	1,04	Baixa-hiperdiploidia
11	F	4	MO	48%	23,660	LLAcpB	1,07	Diploidia (Normal)
12	F	4	MO	65%	12,420	LLAcpB	1,47	Alta-hiperdiploidia
13	M	5	MO	60%	14,300	LLAcpB	1,18	Alta-Hiperdiploidia
14	F	3	MO	76%	56,760	LLAcpB	1,17	Alta- Hiperdiploidia
15	M	7	MO	48%	98,600	LLAcpB	1,14	Baixa-hiperdiploidia
16	F	7A,4m	MO	21,9%	15,367	LLAcpB	1,52	Alta-hiperdiploidia
17	M	9	MO	53%	66,910	LLAcpB	1,29	Alta-hiperdiploidia
18	M	6	MO	60%	49,410	LLAcpB	1,11	Baixa- Hiperdiploidia

F: Feminino; M: Masculino; MO: Médula óssea; SP: Sangue periférico; LLA-B: leucemia linfoblástica de células precursoras;

**Tabela 4.2: Características clínico-demográficas com LLcpB de Moçambique.** Características clínico-demográficas e laboratoriais dos pacientes com LLcpB (Moçambique- Maputo)

ID	Sexo	Idade (anos)	Amostra	Blastos (%)	Leucometria ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Tipo de leucemia	Índice de DNA	Tipo de ploidia
1	M	5	SP	60%	14,300	LLAcpB	1,48	Alta-hiperdiploidia
2	F	14	SP	65%	57,000	LLAcpB	1,19	Alta-hiperdiploidia
3	F	2	SP	80%	16,540	LLAcpB	1,57	Alta-hiperdiploidia
4	M	8	MO	75%	65,430	LLAcpB	1,28	Alta-hiperdiploidia
5	M	1	SP	91%	13,690	LLAcpB	1,06	Diploidia (Normal)
6	F	10	MO	56%	23,500	LLAcpB	1,13	Baixa-hiperdiploidia
7	F	6	MO	48%	45,890	LLAcpB	1,12	Baixa-hiperdiploidia
8	M	4	SP	78%	23,460	LLAcpB	1,16	Alta-hiperdiploidia
9	M	3	SP	90%	67,680	LLAcpB	1,39	Alta-hiperdiploidia
10	M	7	SP	60%	48,500	LLAcpB	1,03	Diploidia (Normal)

M: Masculino; MO: Médula óssea; SP: Sangue periférico; LLA-B: leucemia linfoblástica de células precursoras;

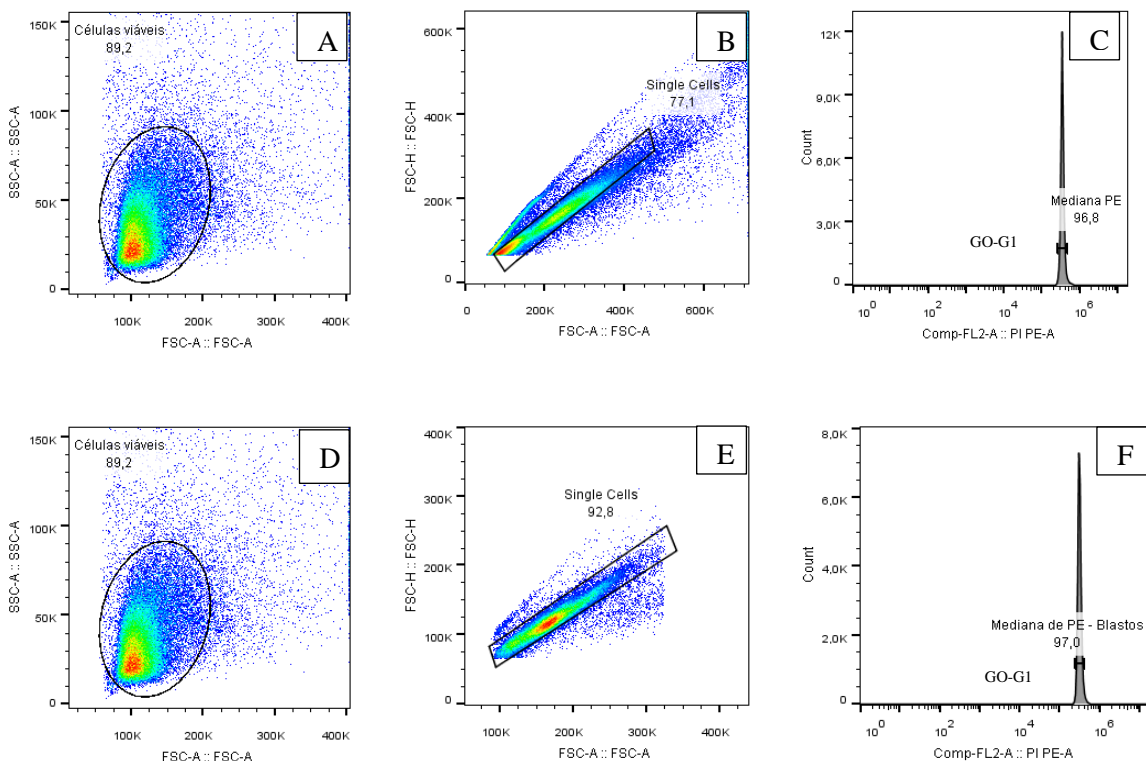
## 4.2 Padronização no Brasil- Bahia - Moçambique

### 4.2.1 Padronização da marcação celular com iodeto propídeo (Bahia)

Na primeira etapa deste estudo da padronização e implementação do DI, padronizou-se a intensidade de fluorescência média do fluorocromo PI em leucócitos de amostras de SP sem neoplasias hematológicas e blastos de amostras de SP com neoplasias hematológicas pelo citómetro FACS Fortessa. Como o DI é uma mensuração relativa, para todos os exames foi necessário a utilização de um controlo interno, o qual consistiu de uma amostra de SP (sem neoplasia hematológica) proveniente de um doador saudável do mesmo sexo do paciente leucêmico devido a diferença nas quantidades de DNA entre os cromossomas X e Y.

O uso da amostra controlo saudável misturada com a amostra do paciente leucêmico foi essencial para comparar a distribuição das células saudáveis com as células patológicas. Esse método foi adotado para avaliar se as células patológicas possuem conteúdo de DNA euploide (2n) ou aneuploide (diferente de 2n), especialmente em casos de amostras de pacientes leucêmico que não apresentam nenhuma população de células com conteúdo de DNA dentro dos padrões normais.

Para a padronização do histograma, à medida que era feita a aquisição, foram selecionadas as células de interesse do SP (linfócitos e blastos) no gráfico de dispersão de luz Foward Scatter - Area (FSC - A) linear versus Side Scatter - Area (SSC-A) linear (Figura 4.1 - Bahia e 4.3- Moçambique, Painel A e D – células marcadas). O detector FSC avalia o tamanho, enquanto, o SSC, detecta a granulicidade celular. O histograma com a FSC - A versus altura (FSC-H) (Figura 4.1 - Bahia e 4.3- Moçambique, Painel B e E), para retirar debris (restos celulares) e dublets. O último histograma emite luz no comprimento de onda de aproximadamente 570 nm, mesmo canal que detecta o fluorocromo PE. Assim, foi estabelecido um dot plot com os dados de PI (PE – Área) linear versus SSC – Area (área) linear (Figura 4.1 - Bahia e 4.3 - Moçambique, Painel C e F); histograma para visualizar a IFM do corante PI, o qual é detectado pelo detector FL2 (fluorescência 2);

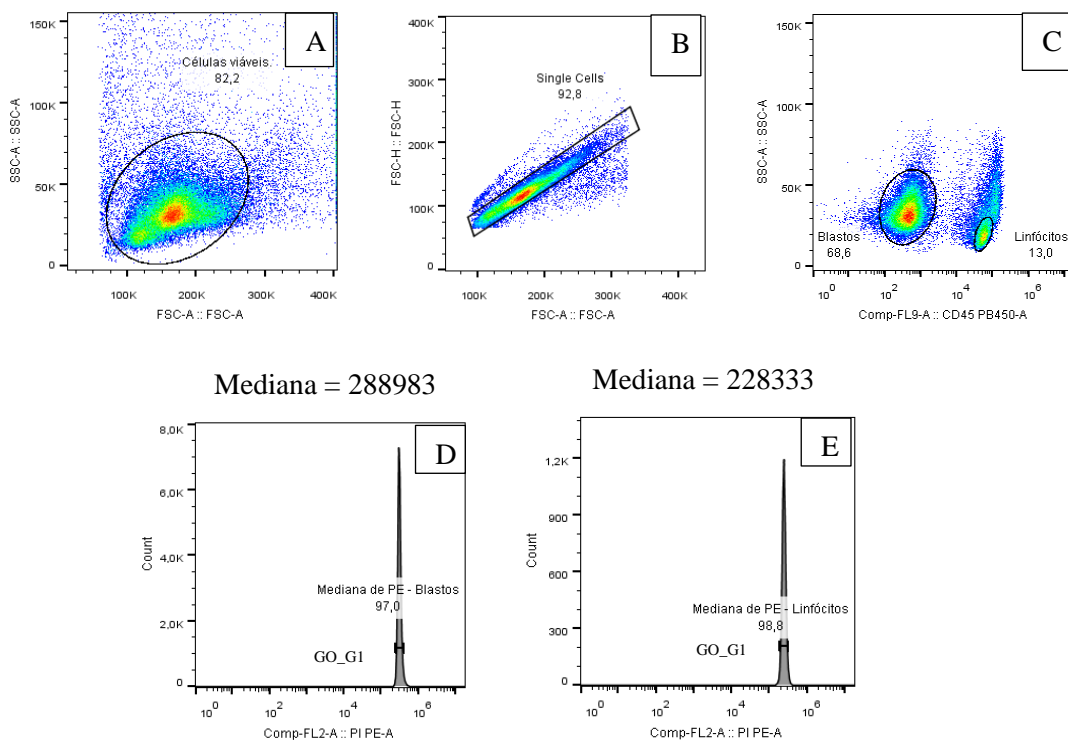


**Figura 4.1: Análise representativa da marcação celular com iodeto de propídeo das células de sangue periférico usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD para o paciente 06 e seu controle VI.** Uso do citômetro FACS Fortessa (BD Biosciences). Amostra controle não leucêmico em A, B e C e amostra leucêmica em D, E e F. Em A e D *dot plots* FSC-H x SSC-H, com a seleção de linfócitos normais e blastos leucêmicos, respectivamente, para ajuste das voltagens dos detectores Paciente FSC e SSC. Em B e E *dot plot* representando a intensidade de marcação (IFM) dos linfócitos pelo PI; Em C e F, histogramas leucêmico representando a IFM do PI em relação à quantidade de células; FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo; IFM: Intensidade de Fluorescência Média.

#### 4.2.2 Padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal (Bahia)

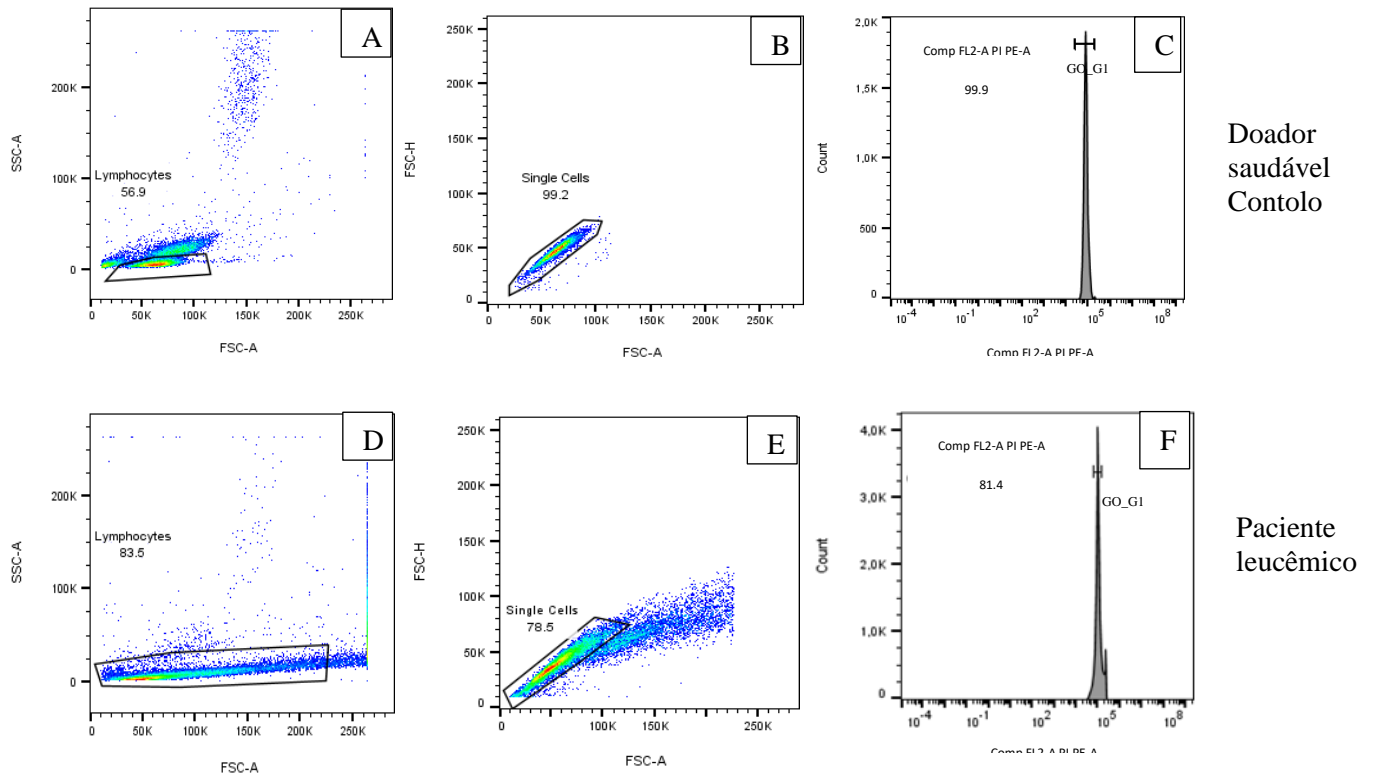
Na padronização da análise do índice DNA, foi realizado o teste para marcação dos leucócitos de SP de indivíduos sem neoplasias hematológicas com anticorpo monoclonal. O marcador foi escolhido por estar presente em maior proporção nas células linfóides do SP.

Para esta análise, foram plotados, além dos dot plots presentes na figura 4.1- Padronização da marcação celular com iodeto de propídeo (detalhados novamente na Figura 4.2 - Bahia e 4.4 - Moçambique, Painéis A, B, D e E), mais um dot plot com a plotagem do marcador CD45 versus a granulosidade das células (CD45 FL9-A versus SSC-A linear), painel C. Este dot plot tem a função de mostrar uma população celular específica com relação à quantidade de DNA. Como a amostra tem células aneuploides entre as células diploides, aparecem dois grupos de células com diferente IFM do PI. O anticorpo utilizado para calcular o DI é direcionado contra marcador característico da doença. Para calcular o DI, ou seja, a quantidade de material genético que as células patológicas tinham em comparação com as células do paciente controle, foi feita a razão entre o pico da mediana G0/G1 de uma população leucêmica e o pico da mediana G0/G1 de uma população diploide padrão. O tubo que tinha apenas as células do paciente controle e o anticorpo monoclonal dirigido contra o marcador presente nas células patológicas tinha a função de conhecer o perfil de marcação do anticorpo em células saudáveis.



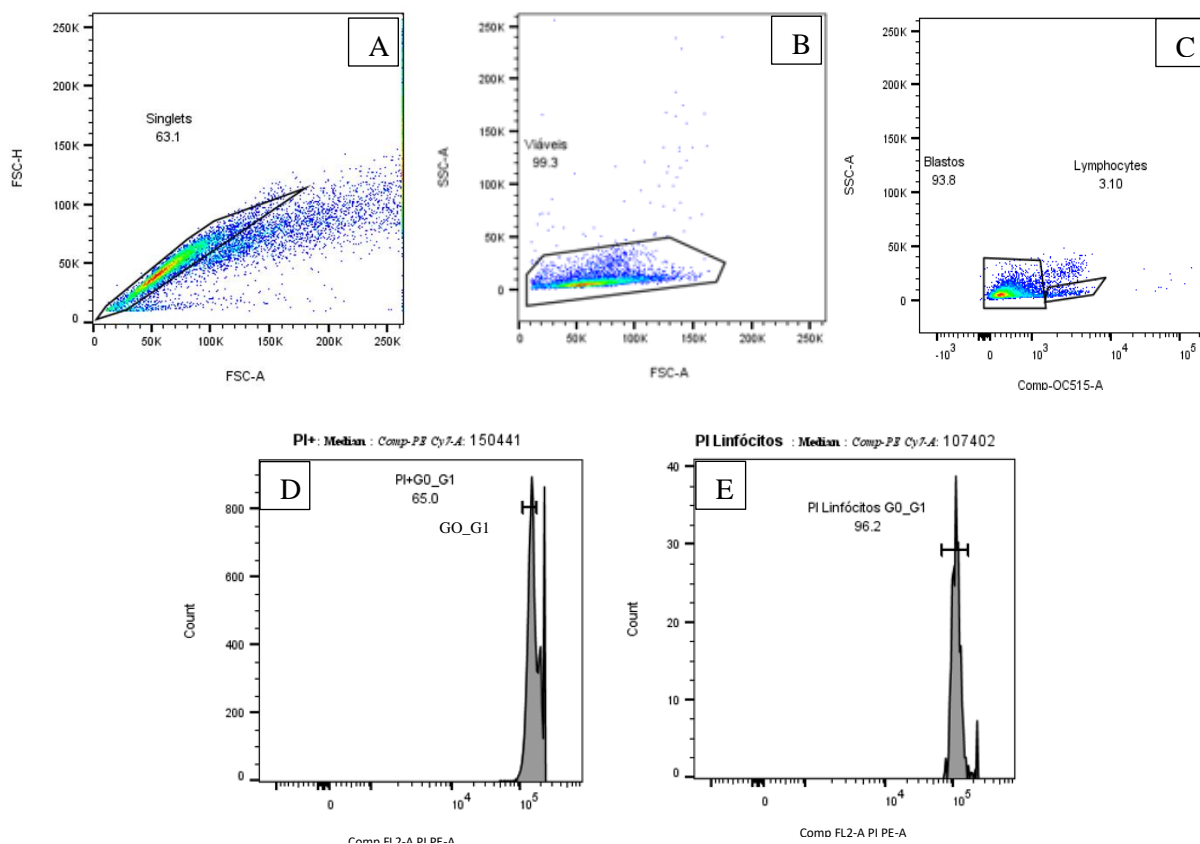
**Figura 4.2: Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método CD45 para o paciente 013.** Uso do citômetro FACS Canto II. Em A *dot plots* FSC-A x SSC-A seleção das células viáveis. Em B *dot plots* FSC-H x FSC-A exclusão de doublets. Em C com o marcador CD45, seleção de linfócitos normais a direita e blastos leucêmicos a esquerda. Em D histograma com o pico dos blastos e E histograma com o pico dos linfócitos. A média geométrica (GM) do pico G0/G1 (blastos) é dividida pela GM do pico G0/G1 (linfócitos) para calcular o índice de DNA (DI). CD45: anticorpo monoclonal; FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo.

### 4.2.3 Padronização da marcação celular com iodeto de propídeo (Moçambique)



**Figura 4.3: Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal e iodeto de propídeo usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método PI para o paciente 002 e seu controlo II.** Uso do citômetro FACS Canto II. Amostra controlo não leucêmico em A, B e C e amostra leucêmico em D, E e F. Em A e D *dot plots* FSC-H x SSC-H, com a seleção de linfócitos normais e blastos leucêmicos, respectivamente, os quais apresentam baixa granulosidade (SSC) e tamanho (FSC). Em B e E *dot plots* FL2-W x FL2-A (marcação para PI), utilizados para exclusão de doublets. Em C e F, histogramas mostrando a marcação para PI em FL2-A, em relação à quantidade de células. FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo

#### 4.2.4 Padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal (Moçambique)



**Figura 4.4:** Análise representativa da marcação celular com anticorpo monoclonal e iodeto de propídeo usando a lise das hemácias com solução da lise FACS BD, pelo método PI para o paciente 008 e seu controlo VIII. Uso do citómetro FACS Canto II. Em A *dot plots* FSC-A x SSC-A seleção das células viáveis. Em B *dot plots* FSC-H x FSC-A exclusão de doublets. Em C com o marcador CD45, seleção de linfócitos normais e blastos leucémicos. Em D e E, histogramas mostrando a marcação para PI em FL2-A, em relação à quantidade de células. Em D histograma com o pico dos blastos e em E histograma com o pico dos linfócitos. A média geométrica (GM) do pico G0/G1 (blastos) é dividida pela GM do pico G0/G1 (linfócitos) para calcular o índice de DNA (DI). CD45: anticorpo monoclonal; FSC: Dispersão de luz frontal; SSC: Dispersão de luz lateral; PI: iodeto de propídeo.

#### 4.2.5 Resumo dos procedimentos feitos e parâmetros considerados na Bahia e Moçambique

No estudo da padronização e implementação do DI foram utilizados dois protocolos: protocolo da padronização da marcação celular com iodeto de propídeo e protocolo da padronização da marcação celular com anticorpo monoclonal. Observa-se que no protocolo da padronização da marcação celular com iodeto de propídeo onde utilizou-se o citómetro da FACS Calibur e a lise de cloreto de amónio na Bahia, o teste não funcionou corretamente nas primeiras amostras, como referido anteriormente. Os citómetros, os tipos de lise, os métodos utilizados, o número de amostras na Bahia assim como em Moçambique na padronização e implementação do DI, estão apresentados na tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Tipos de citômetros, tipos de lise e métodos utilizados na padronização e implementação do DI na Bahia e em Moçambique.

País	Tipo de citômetro	Tipo de lise	Métodos usados	Número de amostras	Teste funcionou?
Brasil (Bahia)	FACS Calibur	Cloreto de amônio	Iodeto de propídeo	5	Não
	DX Flex	FACS BD	Iodeto de propídeo Marcador CD45	7	Sim
	FACS Fortessa			6	Sim
Moçambique	FACS Canto II	FACS BD	Iodeto de propídeo Marcador CD45	10	Sim

## 5 DISCUSSÃO

A hiperdiploidia é a anormalidade citogenética mais comum em crianças com LLAcPb. Diversos estudos confirmam que perfis imunofenotípicos específicos, assim como anomalias citogenéticas e moleculares, estão relacionados ao prognóstico (**Pierzyna-Świtłała et al., 2021**). O índice de DNA (DI) tem sido conhecido como fator prognóstico em crianças com leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcPb) e pacientes com  $DI \geq 1,16$  tiveram bom prognóstico em comparação aos pacientes com  $DI \leq 1,16$ . De acordo com a nossa análise as amostras colhidas a mais de 24 horas tiveram um impacto negativo na qualidade das análises, enquanto as amostras frescas colhidas dentro de 6 horas tiveram um resultado positivo, onde estes resultados positivos foram basicamente consistentes com aqueles relatados na literatura consultada. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo deste tipo realizado em Moçambique. O DI é um bom método para o diagnóstico das leucemias, pois verifica-se que trata-se de um método eficiente, rápido, menos dispendioso e de fácil manuseamento. O DI de 1,16 é considerado como ponto de corte significativo para discriminar o grupo de menor risco, como mostrado em diferentes trabalhos (**Gupta et al., 2019; Pierzyna-Świtłała et al., 2021; Swerts et al., 2007**).

Para distinguir o sinal emitido pelos *doublets* (células aderidas) de células na fase G1 do sinal emitido pelas células na fase G2/M – que possuem uma maior quantidade de DNA e, conseqüentemente, uma maior intensidade de fluorescência média (IFM) –, foi utilizada a diferença na altura do sinal emitido pelo laser FL2. Os *doublets* aumentam o sinal na largura do FL2 (FL2 Width) devido ao maior diâmetro, enquanto o sinal da área do FL2 (FL2 Área) é igual tanto para células únicas na fase G2/M quanto para dupletos na fase G1 (**Krueger & Wilson, 2011; Nunez, 2001**). Além disso, as amostras devem ser adquiridas no citômetro a uma velocidade baixa – menos de 1000 células por segundo – para garantir uma boa discriminação entre células singlets (individuais) e doublets (**Nunez, 2001**). Outro fator considerado na padronização da metodologia foi a utilização de PI com RNase, para evitar que o fluorocromo se ligasse a qualquer RNA de fita dupla e assim prevenir falsas interpretações do conteúdo de DNA (**Nunez, 2001**).

A leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcPb) é o cancro mais prevalente em crianças. Apesar das melhores taxas de cura nos últimos anos, a doença ainda apresentará recaídas em alguns pacientes (**Huang et al., 2020**). Na comparação dos citômetros achamos que o FACS Calibur não é adequado para análise do índice de DNA, pois este aparelho não apresentou resultados fidedignos talvez por já não estar funcionando corretamente, provavelmente pelo tempo de uso, tendo-se optado pelo uso de citômetros recentes como o FACS CANTO II (Becton Dickinson), FACS Fortessa (BD Biosciences) e DXFLEx B5R3V5 Beckman Coulter, pois estes apresentaram bons resultados. A solução da lise FACS BD mostrou melhores resultados do que a solução da lise de cloreto de amônio, mantendo as células íntegras ao fixá-

las. Com a passagem da amostra pelos lasers, é necessário ajustar a posição das células dentro de um *dot plot* porque a fixação ou permeabilização realizada com o triton pode alterar o tamanho celular assim como a disposição das células. Essa fixação ou permeabilização das células permite a penetração do PI no citoplasma, que é uma ação que anteriormente era impossível à adição do triton devido à presença da membrana plasmática íntegra. O PI, que possui baixa fluorescência em solução aquosa, apresenta uma forte fluorescência ao ligar-se ao DNA, razão da interação hidrofóbica. Com relação aos resultados obtidos nas análises das amostras de pacientes da Bahia pela técnica de DI, das 18 amostras apenas 13 apresentaram DI assim como o tipo de ploidia e 5 não apresentaram estas características. Em Moçambique todos os pacientes apresentaram DI e o tipo de ploidia. Das amostras que apresentaram alta-hiperdiploidia significa que há presença de células B patológicas.

Tanto o uso do método usando CD45 assim como o método usando PI ambos levaram-nos a obter a ploidia assim como o DI. O uso do método CD45 é vantajoso pois não precisa de uma amostra controle de paciente saudável, a mesma amostra de paciente leucémico para ser usada como controle diferentemente do método com o uso do PI que requer a amostra controle de paciente saudável. Os resultados da lise das hemácias da solução FACS BD estão de acordo com Gupta et al. (2019), ver tabela 1.1. Com os resultados encontrados podemos sugerir que o índice de DNA é eficaz para ser usada na avaliação da alteração molecular mais frequente em LLAcPb pediátrica, ajudando a classificar e estratificar melhor os pacientes, de forma que sejam tratados da maneira mais adequada ao perfil molecular do seu tipo leucémico. No entanto, é crucial notar que a avaliação do prognóstico é multifacetada, sendo abrangidos fatores intrínsecos individuais e resultados de testes laboratoriais, como citogenética e biologia molecular. Esta técnica mostrou resultados promissores pelo que a sua transferência do Brasil para Moçambique pode ser realizada e esperamos implementá-la rapidamente.

O estudo teve algumas limitações, como a falta de contacto direto com os pacientes para a colheita das amostras, pois esta é feita apenas pelas médicas. Apesar das limitações, trata-se de um estudo relevante, pois a análise da ploidia de índice de DNA por citometria de fluxo é uma técnica simples e altamente proficiente na estratificação de risco no momento do diagnóstico. Adicionalmente, o DI oferece uma alternativa ao cariótipo convencional para detetar subgrupos de bom e mau prognóstico entre os casos de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B (LLAcPb). Assim, este estudo irá ajudar a adquirir resultados rápidos, ajudar na estratificação do risco que o paciente possui e a entender melhor o tipo de leucemia, dando melhor direcionamento do tratamento adequado ao paciente.

## 6 CONCLUSÃO

A partir deste estudo, foram evidenciadas as seguintes conclusões:

- Com relação à padronização e implementação da metodologia, foi estabelecida a utilização de anticorpo mononuclear conjugado ao fluorocromo FITC para não ocorrer a interferência com a faixa de emissão do PI;
- Com relação aos resultados obtidos nas análises de amostras de pacientes na Bahia e em Moçambique pela técnica de DI foram encontradas 23 aneuploidias nos pacientes com LLAcPb e 5 não apresentavam essas características.
- De todos os resultados do conteúdo de DNA por citometria de fluxo que puderam ser avaliados, das 18 amostras da Bahia e 10 amostras de Moçambique, apenas 23 apresentaram aneuploidia pelos métodos de PI e CD45, o que indica que os resultados foram de acordo com aqueles relatados na literatura consultada.

Em conclusão, a ploidia do DNA baseada em citometria de fluxo tem forte correlação com perfis citogenéticos e produz informações complementares que podem ser utilizadas pelos laboratórios de citogenética quando necessário. Portanto, além do diagnóstico precoce e da classificação adequada do subtipo de leucemia, é razoável estudar outros fatores que podem influenciar a resposta ao tratamento e explorar outras abordagens para o manejo de casos no cenário moçambicano para melhorar a taxa de sobrevivência. Um sistema imunológico eficiente aumenta as hipóteses de recuperação permanente de uma doença neoplásica (**Van Dongen et al., 2012**). Contudo, é importante destacar que, a técnica de DI é complexa, e envolve desde questões intrínsecas de cada paciente até a resultados de exames laboratoriais como a citogenética e a biologia molecular.

## 7 RECOMENDAÇÕES

Considerando-se o fato de que a padronização e implementação do DI é importante para melhorar a estimativa do prognóstico dos pacientes incluídos neste estudo, sugere-se:

- O uso de citômetros modernos como a FACS Fortessa, FACS CANTO II, DXFLex entre outros, pois estes mostram bons resultados comparativamente com os citômetros antigos como a FACS Calibur.
- A amostra de controlo para o método com iodeto de propídeo deve ser fresca e colhida no mesmo dia, e a amostra do paciente leucémico deve ser processada em 24h no máximo após a sua colheita.
- Deve usar-se a lise FACS BD pois mostrou bons resultados comparativamente a lise de cloreto de amónio.
- O método CD45 é o mais flexível pois não precisa de amostra de controlo de paciente saudável comparativamente com o método de PI.
- Para as amostras colhidas em laboratórios distantes do processamento, o hemograma deve ser realizado no laboratório de colheita e as amostras devem ser transportadas em gelo para o laboratório de processamento.
- As amostras colhidas próximo do laboratório de processamento podem ser transportadas a TA.

De acordo com dados da literatura, e resultados observados neste trabalho, a molécula CD45 pode ser considerada um potencial marcador para o prognóstico de pacientes pediátricos com LLA-cpB, esta pode estar relacionada à maturação das células B, que favorece uma otimização nas tomadas de decisões de tratamento para pacientes diagnosticados com LLA-cpB.

## 8 REFERÊNCIAS

- Alaggio, R., Amador, C., Anagnostopoulos, I., Attygalle, A. D., Barreto, I., Araujo, D. O., Ferry, J., Gratzinger, D., Guitart, J., Gujral, S., Harris, M., Geyer, J., Harrison, C. J., Hartmann, S., Hochhaus, A., Khoury, J., Leoncini, L., Leung, N., Rajkumar, S. V., ... Vergier, B. (2022). *The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms*. June. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01620-2>
- Arber, D. A. (2019). The 2016 WHO classification of acute myeloid leukemia: What the practicing clinician needs to know. *Seminars in Hematology*, 56(2), 90–95. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2018.08.002>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Armstrong, S. A., & Look, A. T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23(26), 6306–6315. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.047>
- Baeker Bispo, J. A., Pinheiro, P. S., & Kobetz, E. K. (2020). Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 10(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034819>
- Bain, B. J. (2017). *LEUKAEMIA DIAGNOSIS* (L. A John Wiley & Sons (ed.); 4th ed.).
- Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. -T, Flandrin, G., Galton, D. A. G., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology*, 33(4), 451–458. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x>
- Bloom, M., Maciaszek, J. L., Clark, M. E., Pui, C. H., & Nichols, K. E. (2020). Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Review of Hematology*, 13(1), 55–70. <https://doi.org/10.1080/17474086.2020.1685866>
- Blunck, C. B., Terra-Granado, E., Noronha, E. P., Wajnberg, G., Passetti, F., Pombo-de-Oliveira, M. S., & Emerenciano, M. (2019). CD9 predicts ETV6-RUNX1 in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, 41(3), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.11.007>
- Brian J P Huntly, D. G. G. (2005). Cancer biology: summing up cancer stem cells. *Nature*, 435(7046), 1169–70,2005. <https://doi.org/DOI: 10.1038/4351169a>
- Brown, C. M. S., Larsen, S. R., Iland, H. J., Joshua, D. E., & Gibson, J. (2012). Leukaemias into the 21st century: Part 1: The acute leukaemias. *Internal Medicine Journal*, 42(11), 1179–1186. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02938.x>
- Burns, M. A., Place, A. E., Stevenson, K. E., Gutiérrez, A., Forrest, S., Pikman, Y., Vrooman, L. M., Harris, M. H., Hunt, S. K., O'Brien, J. E., Asselin, B. L., Athale, U. H., Clavell, L. A., Cole, P. D., Gennarini, L. M., Kahn, J. M., Kelly, K. M., Laverdiere, C., Leclerc, J. M., ... Silverman, L. B. (2021). Identification of prognostic factors in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: Results from DFCI ALL Consortium Protocols 05-001 and 11-001. *Pediatric Blood and Cancer*, 68(1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/pbc.28719>
- Carreira, H., Lorenzoni, C., Carrilho, C., Ferro, J., Sultane, T., Garcia, C., Amod, F., Augusto, O., Silva-Matos, C., Vecchia, C. La, & Lunet, N. (2014). Spectrum of pediatric cancers in mozambique: An analysis of hospital and population-based data. *Pediatric Hematology and Oncology*, 31(6), 498–508. <https://doi.org/10.3109/08880018.2014.909547>

- Charles G. Mullighan, M. (2011). Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Neurol*, 2013 October; 49(4): 243–254, 49(4), 24:489-503. <https://doi.org/10.1016/j.beha.2011.09.004>.
- Chen, C., Bartenhagen, C., Gombert, M., Okpanyi, V., Binder, V., Röttgers, S., Bradtke, J., Teigler-Schlegel, A., Harbott, J., Ginzl, S., Thiele, R., Husemann, P., Krell, P. F. I., Borkhardt, A., Dugas, M., Hu, J., & Fischer, U. (2015). Next-generation-sequencing of recurrent childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia reveals mutations typically associated with high risk patients. *Leukemia Research*, 39(9), 990–1001. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2015.06.005>
- Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 6(1). <https://doi.org/10.4084/mjhid.2014.073>
- Ching-Hon Pui, Leslie L Robison, A. T. L. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Methods in Molecular Biology*, 730, 403. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-074-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-074-4_8)
- Coustan-Smith, E., Mullighan, C. G., Onciu, M., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Pei, D., Cheng, C., Su, X., Rubnitz, J. E., Basso, G., Biondi, A., Pui, C.-H., Downing, J. R., & Campana, D. (2009). Early T-Cell Precursor Leukemia: A Subtype of Very High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia Identified in Two Independent Cohorts. *Lancet The*, 10(2), 147–156. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70314-0.EARLY](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70314-0.EARLY)
- Cooper, S.L. Md. P. (2015). Parental occupational exposure to benzene and the risk of childhood and adolescent acute lymphoblastic leukaemia: a population-based study. *Occupational and Environmental Medicine*, 76(8), 527–529. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pcl.2014.09.006>.
- Dong, Y., Shi, O., Zeng, Q., Lu, X., Wang, W., Li, Y., Wang, Q., Wang, Q., & Wang, Q. (2020). Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Experimental Hematology and Oncology*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00170-6>
- Dores, G. M., Devesa, S. S., Curtis, R. E., Linet, M. S., & Morton, L. M. (2012). Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood*, 119(1), 34–43. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-347872>
- Douamba, S., Diallo, F., Nagalo, K., Tamini, L., Dao, L., Kouéta, F., & Yé, D. (2018). Acute lymphoblastic leukemia among children in Ouagadougou (Burkina Faso): The results of treatment according to the protocol of the Franco-African pediatric oncology group 2005. *Pan African Medical Journal*, 29, 1–5. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.29.44.11902>
- Duffield, A. S., Mullighan, C. G., & Borowitz, M. J. (2023). International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Archiv*, 482(1), 11–26. <https://doi.org/10.1007/s00428-022-03448-8>
- Enawgaw, B., Aynalem, M., Melku, M., Asrie, F., Abebe, M., Yalew, A., Bekele, T., Mesfin, N., Ayalew, M., & Shiferaw, E. (2021). Hematological malignancies in the Northwest Ethiopia. *PLoS ONE*, 16(12 December), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260639>
- Freedman, D. M., Stewart, P., Kleinerman, R. A., Wacholder, S., Hatch, E. E., Tarone, R. E., Robison, L. L., & Linet, M. S. (2001). *Household Solvent Exposures and Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*. 91(4).
- Greaves, M. (2006). Infection, immune responses and the aetiology of childhood leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 6(3), 193–203. <https://doi.org/10.1038/nrc1816>
- Grevas, M. (2018). A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Europe PMC Funders Group Author Manuscript*, 18(8), 471–484. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0015-6.A>

- Groeneveld-Krentz, S., Schroeder, M. P., Reiter, M., Pogodzinski, M. J., Pimentel-Gutiérrez, H. J., Vagkopoulou, R., Hof, J., Chen-Santel, C., Nebral, K., Bradtke, J., Türkmen, S., Baldus, C. D., Gattenlöhner, S., Haas, O. A., von Stackelberg, A., Karawajew, L., Eckert, C., & Kirschner-Schwabe, R. (2019). Aneuploidy in children with relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: clinical importance of detecting a hypodiploid origin of relapse. *British Journal of Haematology*, *185*(2), 266–283. <https://doi.org/10.1111/bjh.15770>
- Gupta, N., Parihar, M., Banerjee, S., Brahma, S., Pawar, R., Rath, A., Shewale, S., Singh, M., Sasikumaran Nair Remani, A., Krishnan, S., Bhattacharyya, A., Das, A., Kumar, J., Bhave, S., Radhakrishnan, V., Nair, R., Chandy, M., Mishra, D., & Arora, N. (2019). FxCycle™ Based Ploidy Correlates with Cytogenetic Ploidy in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia and Is Able to Detect the Aneuploid Minimal Residual Disease Clone. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, *96*(5), 359–367. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21765>
- Gurney, J. G., Davis, S., Severson, R. K., Fang, J. Y., Ross, J. A., & Robison, L. L. (1996). Trends in cancer incidence among children in the U.S. *Cancer*, *78*(3), 532–541. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19960801\)78:3<532::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19960801)78:3<532::AID-CNCR22>3.0.CO;2-Z)
- Hadley, L. G. P., Rouma, B. S., & Saad-Eldin, Y. (2012). Challenge of pediatric oncology in Africa. *Seminars in Pediatric Surgery*, *21*(2), 136–141. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2012.01.006>
- Harrison, C. J. (2009). Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *144*(2), 147–156. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07417.x>
- Hauer, J., Fischer, U., & Borkhardt, A. (2021). Toward prevention of childhood ALL by early-life immune training. *Blood*, *138*(16), 1412–1428. <https://doi.org/10.1182/blood.2020009895>
- Hjalgrim, L. L., Rostgaard, K., Schmiegelow, K., Söderhäll, S., Kolmannskog, S., Vettenranta, K., Kristinsson, J., Clausen, N., Melbye, M., Hjalgrim, H., & Gustafsson, G. (2003). Age- and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in the Nordic countries. *Journal of the National Cancer Institute*, *95*(20), 1539–1544. <https://doi.org/10.1093/jnci/djg064>
- Hoelzer, D., Bassan, R., Dombret, H., Fielding, A., Ribera, J. M., & Buske, C. (2016). Acute lymphoblastic leukaemia in adult patients: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, *27*(February), v69–v82. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdw025>
- Huang, F. L., Liao, E. C., Li, C. L., Yen, C. Y., & Yu, S. J. (2020). Pathogenesis of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: Molecular pathways and disease treatments (Review). *Oncology Letters*, *20*(1), 448–454. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11583>
- Iacobucci, I., & Mullighan, C. G. (2017). Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(9), 975–983. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.70.7836>
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, *381*(9881), 1943–1955. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62187-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62187-4)
- Jin, B., Sun, T., Yu, X. H., Yang, Y. X., & Yeo, A. E. T. (2012). The effects of TLR activation on T-cell development and differentiation. *Clinical and Developmental Immunology*, *2012*(Figure 1). <https://doi.org/10.1155/2012/836485>
- Karrman, K. and B. J. (2016). Pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia*, 89–116. [https://doi.org/10.1007/978-981-15-0548-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-981-15-0548-5_7)
- Kroll, M. E., Draper, G. J., Stiller, C. A., & Murphy, M. F. G. (2006). Childhood leukemia incidence in Britain, 1974-2000: Time trends and possible relation to influenza epidemics. *Journal of the National Cancer Institute*, *98*(6), 417–420. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj095>
- Krueger, S. A., & Wilson, G. D. (2011). Flow cytometric DNA analysis of human cancers and cell lines. *Methods in Molecular Biology*, *731*, 359–370. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-80-5_29)

- Larson, R.A., & Anastasi, J. (2008). Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification. *In Acute Leukemias: Hematologic Malignancies*. Estey, E.H., Faderi, S.H., & Kantarjian, H.M. (Eds), Springer, Berlin, Heidelberg, 109-118.
- Lato, M. W., Przysucha, A., Grosman, S., Zawitkowska, J., & Lejman, M. (2021). The new therapeutic strategies in pediatric t-cell acute lymphoblastic leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/ijms22094502>
- Lejman, M., Chałupnik, A., Chilimoniuk, Z., & Dobosz, M. (2022). Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052755>
- Lightfoot, T., Smith, A., & Roman, E. (2016). Leukemia. *International Encyclopedia of Public Health*, 4, 410–418. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803678-5.00253-8>
- Lim, J. Y. S., Bhatia, S., Robison, L. L., & Yang, J. J. (2014). Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 120(7), 955–962. <https://doi.org/10.1002/cncr.28531>
- Mansell, E., Zareian, N., Malouf, C., Kapeni, C., Brown, N., Badie, C., Baird, D., Lane, J., Ottersbach, K., Blair, A., & Case, C. P. (2019). DNA damage signalling from the placenta to foetal blood as a potential mechanism for childhood leukaemia initiation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39552-0>
- Mansoor, N., Imran, S., Maqsood, S., Pasha, S., & Jabbar, N. (2023). Infantile B-lymphoblastic leukemia: a case series and review of the literature. *Journal of International Medical Research*, 51(4). <https://doi.org/10.1177/03000605231167789>
- Miranda-Filho, A., Piñeros, M., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Monnereau, A., & Bray, F. (2018). Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *The Lancet Haematology*, 5(1), e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30232-6](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30232-6)
- Mittag, A., & Tárnok, A. (2009). Basics of standardization and calibration in cytometry - A review. *Journal of Biophotonics*, 2(8–9), 470–481. <https://doi.org/10.1002/jbio.200910033>
- Molina, O., Bataller, A., Thampi, N., Ribera, J., Granada, I., Velasco, P., Fuster, L., & Men, P. (2022). *Lymphoblastic Leukemia : When Less Is Too Much*. 1–21.
- Muller, B. J., & Inaba, H. (2023). Chimeric antigen receptor T-cells in B-acute lymphoblastic leukemia: history, current situation, and future. *Translational Pediatrics*, 12(10), 1900–1907. <https://doi.org/10.21037/tp-23-366>
- Mullighan, C. G., Morita, K., Suzuki, K., Maeda, S., Matsuo, A., Mitsuda, Y., Tokushige, C., Kashiwazaki, G., Taniguchi, J., Maeda, R., Noura, M., Hirata, M., Kataoka, T., Yano, A., Yamada, Y., Kiyose, H., Tokumasu, M., Matsuo, H., Tanaka, S., ... Kamikubo, Y. (2012). Genetic regulation of the RUNX transcription factor family has antitumor effects. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7), 3407–3415. <https://doi.org/10.1172/JCI61203.ETV6-RUNX1>
- Murray, L., McCarron, P., Bailie, K., Middleton, R., Smith, G. D., Dempsey, S., McCarthy, A., & Gavin, A. (2002). Association of early life factors and acute lymphoblastic leukaemia in childhood: Historical cohort study. *British Journal of Cancer*, 86(3), 356–361. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600012>
- Muschen, M. G. and M. (2015). Infection and the perils of B cell activation. *Physiology & Behavior*, 176(1), 100–106. <https://doi.org/10.1177/0022146515594631>.Marriage
- Nunez, R. (2001). DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 67–70. <https://doi.org/10.21775/cimb.003.067>
- Onciu, M. (2009). Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*,

- 23(4), 655–674. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2009.04.009>
- Othman, M. A. K., Melo, J. B., Carreira, I. M., Rincic, M., Glaser, A., Grygalewicz, B., Gruhn, B., Wilhelm, K., Rittscher, K., Meyer, B., Silva, M. L. M., De Jesus Marques Salles, T., & Liehr, T. (2015). High rates of submicroscopic aberrations in karyotypically normal acute lymphoblastic leukemia. *Molecular Cytogenetics*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13039-015-0153-4>
- Palmeira, C., & Martins, G. (2007). *Avaliação do Conteúdo de DNA por citometria de fluxo em Linfomas não Hodgkin de células B : situação actual e perspectivas futuras*.
- Panuciak, K., Nowicka, E., Mastalerczyk, A., Zawitkowska, J., Niedźwiecki, M., & Lejman, M. (2023). Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/ijms24108764>
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J. (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clinic Proceedings*, 91(11), 1645–1666. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>
- Peters, J. M., & Ansari, M. Q. (2011). Multiparameter flow cytometry in the diagnosis and management of acute leukemia. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 135(1), 44–54. <https://doi.org/10.5858/2010-0387-rar.1>
- Pierzyna-Światała, M., Sędek, Ł., Kulis, J., Mazur, B., Muszyńska-Roslan, K., Kołtan, A., Woszczyk, M., Niedźwiecki, M., Mizia-Malarz, A., Karolczyk, G., Lejman, M., Trelińska, J., Badowska, W., Derwich, K., Ociepa, T., Malinowska, I., Kazanowska, B., Kowalczyk, J., & SzczePański, T. (2021). Multicolor flow cytometry immunophenotyping and characterization of aneuploidy in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Central European Journal of Immunology*, 46(3), 365–374. <https://doi.org/10.5114/ceji.2021.109794>
- Pombo de Oliveira, M. S., Koifman, S., Vasconcelos, G. M., Emerenciano, M., & de Oliveira Novaes, C. (2009). Development and perspective of current Brazilian studies on the epidemiology of childhood leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 42(2), 121–125. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2008.10.012>
- Popescu, N. C., & Zimonjic, D. B. (1997). Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 93(1), 10–21. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(96\)00262-2](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(96)00262-2)
- Preffer, F., & Dombkowski, D. (2009). Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: Applications in stem cell research. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 76(5), 295–314. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20480>
- Pui, Ching Hon, Behm, F. G., Singh, B., Schell, M. J., Williams, D. L., Rivera, G. K., Kalwinsky, D. K., Sandlund, J. T., Crist, W. M., & Raimondi, S. C. (1990). Heterogeneity of presenting features and their relation to treatment outcome in 120 children with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 75(1), 174–179. <https://doi.org/10.1182/blood.v75.1.174.bloodjournal751174>
- Pui, Ching Hon, & Crist, W. M. (1992). Cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia correlates with clinical features and treatment outcome. *Leukemia and Lymphoma*, 7(4), 259–274. <https://doi.org/10.3109/10428199209049777>
- Qiu, K. yin, Liao, X. yu, He, Z. wen, Wu, R. hao, Li, Y., Xu, L. hong, Zhou, D. hua, & Fang, J. pei. (2021). DNA index as prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia in the COG-TARGET database. *BMC Cancer*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08545-6>
- Rachieru-Sourisseau, P., Baranger, L., Dastugue, N., Robert, A., Geneviève, F., Kuhlein, E., & Chassevent, A. (2010). DNA Index in childhood acute lymphoblastic leukaemia: A karyotypic method to validate the flow cytometric measurement. *International Journal of Laboratory Hematology*, 32(3), 288–298. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553X.2009.01189.x>
- Rashed, A., Tarafder, S., Sattar, H., & Hossain, S. (2018). Flow Cytometric Immunophenotyping of

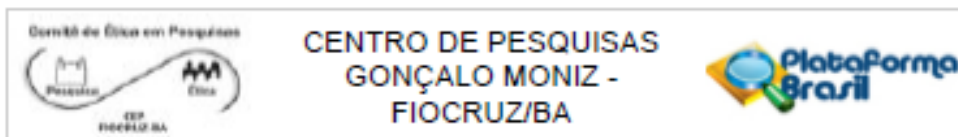
- Acute Leukaemia in Adult and Its Comparison with Cytomorphology. *Original Research Article*, 157(January 2018). <https://doi.org/10.21276/ijmrp.2018.4.5.037>
- Ribera, J. M. (2021). Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. Still a pending matter. *Haematologica*, 106(6), 1514–1516. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.270645>
- Richard A. Larson, J. A. (2008). *Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification* Richard A. Larson, J. A. (2008). *Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Presentation, Diagnosis, and Classification*.
- Rose-Inman, H., & Kuehl, D. (2017). Acute Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 31(6), 1011–1028. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.08.006>
- Rüchel, N., Jepsen, V. H., Hein, D., Fischer, U., Borkhardt, A., & Gössling, K. L. (2022). In Utero Development and Immunosurveillance of B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, 23(4), 543–561. <https://doi.org/10.1007/s11864-022-00963-3>
- Salles Filho, A. S., & Campos, H. O. (2022). Efeitos colaterais associados ao tratamento da Leucemia Promielocítica Aguda: revisão sistemática. *Research, Society and Development*, 11(3), e45711326914. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i3.26914>
- Sant, M., Allemani, C., Tereanu, C., De Angelis, R., Capocaccia, R., Visser, O., Marcos-Gragera, R., Maynadié, M., Simonetti, A., Lutz, J. M., Berrino, F., Hackl, M., Holub, J., Maynadie, M., Holleccek, B., Tryggvadottir, L., Comber, H., Bellù, F., Giacomin, A., ... Steward, J. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: Results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116(19), 3724–3734. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-282632>
- Schwab, C., & Harrison, C. J. (2018). Advances in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia genomics. *HemaSphere*, 2(4). <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000053>
- Shu, X. O., Stewart, P., Wen, W. Q., Han, D., Potter, J. D., Buckley, J. D., Heineman, E., & Robison, L. L. (1999). Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 8(9), 783–791.
- Smaldone, G., Beneduce, G., Incoronato, M., Pane, K., Franzese, M., Coppola, L., Cordella, A., Parasole, R., Ripaldi, M., Nassa, G., Soricelli, A., Vitagliano, L., Mirabelli, P., & Salvatore, M. (2019). KCTD15 is overexpressed in human childhood B-cell acute lymphoid leukemia. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56701-7>
- Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A. J., Crist, W., Gaynon, P., Gelber, R., Heerema, N., Korn, E. L., Link, M., Murphy, S., Pui, C. H., Pullen, J., Reaman, G., Sallan, S. E., Sather, H., Shuster, J., Simon, R., Trigg, M., ... Ungerleider, R. (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 14(1), 18–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.1.18>
- Sobol, R. E., Mick, R., Royston, I., Davey, F. R., Ellison, R. R., Newman, R., Cuttner, J., Griffin, J. D., Collins, H., Nelson, D. A., & Bloomfield, C. D. (1987). Clinical Importance of Myeloid Antigen Expression in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, 316(18), 1111–1117. <https://doi.org/10.1056/nejm198704303161802>
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Lee Harris, N., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G. A., Zelenetz, A. D., & Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375–2390. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>
- Swerts, K., Van Roy, N., Benoit, Y., Laureys, G., & Philippé, J. (2007). DRAQ5: Improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. *Clinica Chimica Acta*, 379(1–2), 154–157.

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.12.008>

- Tasian, S. K., Loh, M. L., & Hunger, S. P. (2015). Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer*, *121*(20), 3577–3590. <https://doi.org/10.1002/cncr.29573>
- Teachey, D. T., & Pui, C. H. (2019). Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*, *20*(3), e142–e154. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30031-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30031-2)
- Tembhare, P. R., Narula, G., Khanka, T., Ghogale, S., Chatterjee, G., Patkar, N. V., Prasad, M., Badrinath, Y., Deshpande, N., Gudapati, P., Verma, S., Sanyal, M., Kunjachan, F., Mangang, G., Gujral, S., Banavali, S., & Subramanian, P. G. (2020). Post-induction Measurable Residual Disease Using Multicolor Flow Cytometry Is Strongly Predictive of Inferior Clinical Outcome in the Real-Life Management of Childhood T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Study of 256 Patients. *Frontiers in Oncology*, *10*(April), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00577>
- Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal*, *7*(6). <https://doi.org/10.1038/BCJ.2017.53>
- Tian, Z., Shi, C., Yang, G., Allen, J. K., Shi, Q., Al-Shami, A., Olson, J. W., Smith, M. G., Chang, Q., Kaur, J., You, J., Lofton, T. E., Gonzalez, M. A., Zhang, Q., Zha, D. X., Tasian, S. K., Jain, N., Konopleva, M. Y., Heffernan, T., & Mollidrem, J. J. (2023). Preclinical development of 1B7/CD3, a novel anti-TSLPR bispecific antibody that targets CRLF2-rearranged Ph-like B-ALL. *Leukemia*, August. <https://doi.org/10.1038/s41375-023-02010-y>
- Timms, J. A., Relton, C. L., Rankin, J., Strathdee, G., & McKay, J. A. (2016). DNA methylation as a potential mediator of environmental risks in the development of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Epigenomics*, *8*(4), 519–536. <https://doi.org/10.2217/epi-2015-0011>
- Tracy, L.A.S., and R. Eve. (2017). *Leukaemia*, in *International Encyclopedia of Public Health* (Elsevier (ed.)).
- Van Dongen, J. J. M., Lhermitte, L., Böttcher, S., Almeida, J., Van Der Velden, V. H. J., Flores-Montero, J., Rawstron, A., Asnafi, V., Lécresse, Q., Lucio, P., Mejstrikova, E., Szczepaski, T., Kalina, T., De Tute, R., Brüggemann, M., Sedek, L., Cullen, M., Langerak, A. W., Mendonça, A., ... Orfao, A. (2012). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, *26*(9), 1908–1975. <https://doi.org/10.1038/leu.2012.120>
- Vardiman, J. W. (2010). The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: An overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*, *184*(1–2), 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.10.009>
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellström-Lindberg, E., Tefferi, A., & Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*, *114*(5), 937–951. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-209262>
- Whitehead, T. P., Metayer, C., Wiemels, J. L., Singer, A. W., & Miller, M. D. (2016). Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, *46*(10), 317–352. <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2016.08.004>
- Wiemels, J. (2012). Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chemico-Biological Interactions*, *196*(3), 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.01.007>
- Woo, J. S., Alberti, M. O., & Tirado, C. A. (2014). Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Experimental Hematology and Oncology*, *3*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-3-16>

- Xie, Z., Zhang, Y., Guliaev, A. B., Shen, H., Hang, B., Singer, B., & Wang, Z. (2005). The p-benzoquinone DNA adducts derived from benzene are highly mutagenic. *DNA Repair*, *4*(12), 1399–1409. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.08.012>
- Yu, C. H., Lin, T. K., Jou, S. T., Lin, C. Y., Lin, K. H., Lu, M. Y., Chen, S. H., Cheng, C. N., Wu, K. H., Wang, S. C., Chang, H. H., Li, M. J., Ni, Y. L., Su, Y. N., Lin, D. T., Chen, H. Y., Harrison, C. J., Hung, C. C., Lin, S. W., & Yang, Y. L. (2020). MLPA and DNA index improve the molecular diagnosis of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68311-9>
- Zen, P. R. G., Lima, M. C., Coser, V. M., Silla, L., Daudt, L., Fernandes, M. S., Neumann, J., Mattevi, M. S., Ortigara, R., & Paskulin, G. A. (2004). Prevalence of TEL/AML1 fusion gene in Brazilian pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *151*(1), 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2003.09.003>
- Zhou, Y., Zhang, S., Li, Z., Zhu, J., Bi, Y., Bai, Y. E., & Wang, H. (2014). Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: A meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110466>

## ANEXO A – Parecer Consubstanciado (Brasil)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia

**Pesquisador:** Eugênia Terra Granado Pina

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 39054320.7.1001.0040

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - CPqGM/ FIOCRUZ/ BA

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.307.865

#### Apresentação do Projeto:

Informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retradas do arquivo PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1896941\_E1.pdf.

Emenda submetida em 15/02/2022.

#### Introdução

Leucemias agudas (LA) são neoplasias primárias de medula óssea, elas podem ser divididas em leucemia linfoblástica aguda (LLA), a qual pode ser originada a partir de precursores de células B (LLA-B) ou de células T (LLA-T)(1) e em leucemia mieloide aguda (LMA), a qual resulta da expansão clonal de blastos mielóides, e pode ser classificada em oito diferentes subtipos (2). A LLA apresenta sobrevivência global em 5 anos de 90% em crianças, e apenas 25% em pacientes acima de 50 anos. Além disso, pacientes refratários ao tratamento ou em recada apresentam resultados ainda muito ruins (3). Na LMA a idade média ao diagnóstico é 65 anos, respondendo a aproximadamente 20% dos casos em crianças, apresentando ainda hoje uma sobrevivência de 70% em crianças e 30% em adultos acima de 65 anos (4,5). Esses números alarmantes em LMA, em conjunto com o quadro descrito para LLA deixam claro a importância de se entender a patogênese das diferentes formas de Leucemia Aguda, de modo a possibilitar sua prevenção e/ou desenvolvimento de novas opções de tratamento. De acordo com o preconizado pela Organização

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1º Pavimento), sala 2CEP2  
Bairro: Candeal CEP: 40.208-710  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3178-2285 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br

Continuação do Parecer: 5.307.005

Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico das LA é baseado em aspectos morfológicos, imunofenotípicos e citogenético-moleculares (1). Para a estratificação de grupos de risco são utilizadas informações como idade ao diagnóstico, leucometria e presença de alterações citogenético-moleculares. Estas últimas permitem a identificação de grupos com prognóstico mais favorável (ex. ETV6-RUNX1, CBFβ-MYH11), ou desfavorável (ex. BCR-ABL1, IAMP21 e rearranjos do gene KMT2A). Inúmeros estudos buscam novos marcadores que possam contribuir para uma melhor estratificação de risco terapêutico e aperfeiçoamento do tratamento. A hematopoiese é regulada por Interações de adesão entre as células hematopoiéticas e o microambiente medular, assim como fatores de crescimento e citocinas produzidas por diferentes tipos celulares na medula óssea. Os componentes do microambiente medular tumoral participam de forma direta e indireta nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e escape da resposta imunológica (6), sendo estabelecidas relações com influência recíproca entre as células tumorais e os componentes do estroma medular (7,8). Dessa forma, muitos fatores são importantes em todo o processo de leucemogênese, neste projeto iremos focar em moléculas e processos que alteram o microambiente medular levando ao escape da resposta imunológica e favorecendo a migração tanto no interior da medula óssea quanto na saída de células leucêmicas para outros órgãos, favorecendo fenótipos mais agressivos e eventos de recaída. Além de entender melhor a doença e buscar melhores formas de classificação de prognóstico e novas alternativas de terapia. (Maiores informações podem ser encontradas no Projeto de Pesquisa em anexo)

**Hipótese:**

Nas leucemias agudas ocorre um desequilíbrio do microambiente medular, gerado pelas próprias células blásticas, e pela inflamação presente no ambiente tumoral. Tal desequilíbrio leva a um aumento de expressão de moléculas de checkpoint imunológico em células que compõe o microambiente e nas próprias células leucêmicas. Também ocorre um aumento na produção de moléculas de adesão/migração no microambiente tumoral, como moléculas de matriz extracelular, quimiocinas, semaforinas, assim como aumento de moléculas de adesão/migração na superfície de células do estroma, células do sistema imune e blastos leucêmicos. Tais alterações individualmente ou em conjunto favoreceriam a sobrevivência, o escape da resposta imune, e a distribuição de células blásticas, em especial células tronco leucêmicas em nichos medulares imunoprivilegiados. Além de favorecer a migração de células leucêmicas mais diferenciadas para órgãos alvo de leucemia extra-medular.

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala 4 CEP:			
Bairro: Candeal		CEP: 40.298-710	
UF: BA	Município: SALVADOR		
Telefone: (71)3178-2285	Fax: (71)3178-2285	E-mail: cep.igm@fiocruz.br	

Continuação do Parecer: 5.307.005

**Metodologia Proposta:**

- Pacientes e amostras: amostras prospectivas de medula óssea (MO) e/ou sangue periférico (SP) de pacientes de 0 a 21 anos com leucemia aguda ao diagnóstico, amostras para avaliação de doença residual mínima (DRM), e amostras de recaída e remissão. Controles: amostras prospectivas de MO/SP de pacientes que não forem diagnosticados com neoplasias. O transporte do material será realizado por profissional treinado, seguindo as regras de transporte, utilizando caixa de transporte adequada para proteção individual. Todas as informações pessoais serão mantidas em sigilo e utilizadas apenas pelos investigadores envolvidos no estudo.- Considerações Éticas: Este projeto será realizado dentro dos preceitos éticos nacionais, respeitando as resoluções da CONEP e demais legislações vigentes. Amostras de pacientes serão recebidas e avaliadas apenas após aprovação do projeto no CEP.- Processamento e congelamento de células: realizado em fluxo laminar em condições estéreis, seguras para o manipulador e para amostra. O plasma será retirado para congelamento a -80°C e posterior avaliação de citocinas. O restante do material será submetido a gradiente de densidade para isolamento de células mononucleadas, seguindo-se a contagem celular. Será retirada quantidade de células suficiente para realização dos testes de RT-PCR, FISH, ensaios funcionais ou de expressão molecular. O restante do material será congelado em SFB/DMSO 10%, e armazenado em freezer -80°C. Imunofenotipagem: Células mononucleadas de MO e/ou SP poderão ser utilizadas no mesmo dia da coleta ou após descongelamento, sendo utilizadas apenas amostras que tenham acima de 75% de viabilidade. Serão marcadas 2x10<sup>6</sup> células por tubo, com anticorpos monoclonais para as moléculas de superfície como:PD-1, TIM3, LAG3, OX40, CD200R, CD3, CD4, CD8, CD45, CCR7, CD57, CD31, CD45R0, CD45RA, CD28, CD27, CD9, CXCR4, VLA-4, VLA-5, PSGL-1, CD43, CD44 e neuropilina-1. Controles negativos: células não marcadas. Serão adquiridos 1.000.000 de eventos no citômetro de fluxo FACS LSRFortessa. - RT-PCR quantitativo (RTqPCR): serão avaliados os rearranjos gênicos recorrentes em pacientes pediátricos com LA, entre os quais KMT2A-r, ETV6-RUNX1, E2A-PBX1, BCR-ABL1, STIL-TAL1, rearranjo no gene TLX3, RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, PML-RARA. - Hibridização Fluorescente In situ (FISH): será realizada com sondas comerciais, como a sonda MLL (KMT2A) breakapart (Cytocell), que será usada para a determinação de rearranjos envolvendo o gene KMT2A, e a sonda TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) Translocation, Dual Fusion (Cytocell), que será empregada na avaliação da presença da fusão ETV6-RUNX1. -Ensaio de migração celular: serão utilizadas câmaras de Transwell com poros de 5m. Como estímulos migratórios serão utilizadas moléculas de ECM ou moléculas solúveis como quimioquinas. Para os ensaios de migração transendotelial células HUVEC serão cultivadas nas

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala „CEP“			
Bairro: Candeal	CEP: 40.296-710		
UF: BA	Município: SALVADOR		
Telefone: (71)3176-2285	Fax: (71)3176-2285	E-mail: cep.igm@fiocruz.br	



**CENTRO DE PESQUISAS  
GONÇALO MONIZ -  
FIOCRUZ/BA**



Continuação do Parecer: 5.307.065

membranas dos Insertos anteriormente aos ensaios. Para avaliar o papel de algumas moléculas, as células poderão ser previamente tratadas com anticorpos neutralizantes ou inibidores moleculares. - Ensaios de proliferação celular: células mononucleadas de MO/SP serão marcadas com CFSE e cultivadas na presença ou ausência de moléculas inibitórias como descrito para o Ensaio de migração celular. Ensaios de citometria de fluxo serão realizados para avaliar proliferação nas populações blásticas expressando ou não os marcadores em estudo. Ensaios de viabilidade celular: células mononucleadas serão incubadas por 48 horas na presença ou ausência de moléculas inibitórias. Após esse período, serão marcadas com anticorpos para moléculas de membrana, com anexina V-FITC e 7AAD. Logo em seguida serão avaliadas por citometria de fluxo. Maiores detalhes e informações complementares podem ser encontrados no Projeto de Pesquisa em anexo.

**Critério de Inclusão:**

Pacientes de 0 a 21 anos oriundos dos hospitais Martagão Gesteira, Aristides Maltez, Estadual da Criança (Feira de Santana) e Santa Casa de Misericórdia de Itabuna, com entrada nos hospitais no período de janeiro de 2011 a junho de 2026. Serão analisados prontuários e/ou amostras de pacientes diagnosticados com LA, além de amostras de pacientes que não apresentarem neoplasias, as quais serão utilizadas como controles.

**Critério de Exclusão:**

Não serão avaliados pacientes cujos responsáveis, ou eles próprios, não concordem em assinar os termos de consentimento/assentimento livre e esclarecido. Não serão utilizadas amostras que apresentem viabilidade abaixo de 75%, e/ou com quantidade de material insuficiente para os testes propostos.

**Objetivo da Pesquisa:**

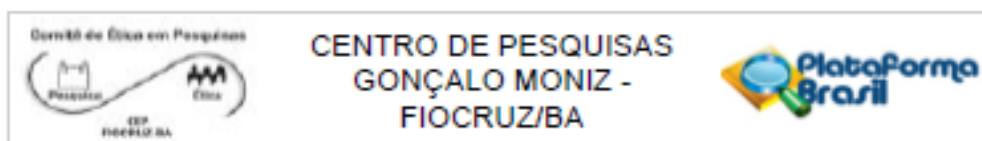
**Objetivo Primário:**

Avaliar alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e no microambiente medular tumoral, relacionadas ao diagnóstico e prognóstico de Leucemias Agudas da Infância.

**Objetivo Secundário:**

1. Avaliar o impacto da expressão de moléculas relacionadas ao controle da resposta imunológica (checkpoints imunológicos) no diagnóstico, na resposta a terapias e no prognóstico de pacientes leucêmicos;

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1º Pavimento), sala 2CEP2  
Bairro: Candeal CEP: 40.208-710  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3178-2285 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br



Continuação do Parecer: 5.307.665

2. Avaliar o impacto da expressão em blastos leucêmicos de moléculas relacionadas à adesão e migração celular no diagnóstico, resposta a terapias e prognóstico de pacientes leucêmicos;
3. Estudar o papel funcional de moléculas de migração na patogênese da LA;
4. Avaliar a correlação entre alterações citogenético-moleculares e marcadores imunofenotípicos com fatores de prognóstico e resposta terapêutica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A quebra de sigilo, e possíveis perdas de dados, ainda que involuntárias e não intencionais, são um risco desta pesquisa. As amostras serão coletadas nos hospitais colaboradores, enviadas para diagnóstico no Laboratório de Imunofenotipagem do Hospital Aristides Maitez e após conclusão do laudo, o material excedente será encaminhado para o projeto. Em relação à segurança, os dados laboratoriais e amostras coletadas serão armazenados na FIOCRUZ-BA, com acesso restrito apenas aos membros da equipe da pesquisa.

**Benefícios:**

Este estudo não beneficiará diretamente os participantes da pesquisa, mas poderá contribuir com o conhecimento científico sobre importantes moléculas no contexto da leucemia aguda, as quais poderão ser utilizadas com marcadores de prognóstico ou como alvos de novas terapias. Outra importante contribuição é a identificação de perfis específicos da população brasileira, em especial a população baiana, que será investigada neste trabalho.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Emenda ao projeto original:**

1. alteração de cronograma: período entre Janeiro de 2011 e Junho de 2026. Os prontuários dos pacientes serão avaliados nas análises retrospectivas;
2. Inclusão de mais 1300 pacientes (retrospectivas- análise de prontuários). "Serão coletadas informações nos prontuários dos pacientes quanto à caracterização imunofenotípica, presença de alterações citogenético-moleculares recorrentes, informações clínico-laboratoriais, demográficas e resposta terapêutica, de acordo com Formulário cadastro Banco de Dados, anexado no site da Plataforma Brasil. Após o parecer favorável do CEP, liberando o início da coleta de dados nas instituições da pesquisa, este parecer será enviado para cada uma das 4 instituições, que irão liberar o acesso aos membros da equipe, e coleta de dados nos prontuários".

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala 4CEP2  
Bairro: Candeal CEP: 40.298-710  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3178-2285 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br

**3. Aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)/Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE):**

"A equipe fará contato com os pacientes em tratamento e seus responsáveis pessoalmente ou por telefone a fim de pedir a assinatura do TALE/TCLE para o consentimento da utilização de amostras, de informações dos pacientes presentes nos prontuários e preenchimento do banco de dados. Todas as informações serão dadas ao paciente e seus responsáveis, em consultório previamente destinado a esta ação, de forma privativa e eles terão o tempo que necessitarem para compreensão e retirada de dúvidas sobre o projeto, antes da assinatura do TALE/TCLE. A assinatura constará nas duas vias dos TCLE/TALE e a rubrica ao final de cada página. Os pacientes que já tiverem concluído o tratamento serão contatados através do número de telefone registrado nos prontuários, sendo realizadas ao menos três tentativas em momentos diferentes. Será solicitado ao CEP a liberação de assinatura de TCLE/TALE nos casos de pacientes fora de tratamento em que a equipe não consiga efetivar o contato. Também iremos solicitar a liberação de assinatura de TCLE/TALE nos casos de pacientes falecidos durante ou após o tratamento, para evitar que as famílias revivam a dor da perda. Em todos esses casos será mantido o sigilo das informações, não havendo benefícios nem malefícios para os pacientes ou seus familiares. Salientamos que será incluído um N elevado de pacientes, com participantes de todo o estado da Bahia, atendidos em 4 instituições diferentes. Além disso, as leucemias agudas são divididas em subtipos (LMA, LLA-B e LLA-T) e estes são ainda subclassificações e avaliados quanto a diferentes características, durante as análises estatísticas. Dessa forma, a perda de muitos pacientes pela insucesso na obtenção dos termos poderia implicar na inviabilidade do estudo, devido ao N amostral".

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Vide campo "Condições ou Pendências e Lista de Inadequações".

**Condições ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada.

Foram apontadas pendências. Entramos em contato por e-mail com a pesquisadora e encaminhamos as pendências que foram respondidas.

<b>Endereço:</b> Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1º Pavimento), sala 2CEP2			
<b>Bairro:</b> Candeal	<b>Município:</b> SALVADOR	<b>CEP:</b> 40.206-710	
<b>UF:</b> BA			
<b>Telefone:</b> (71)3176-2285	<b>Fax:</b> (71)3176-2285	<b>E-mail:</b> cep.igm@fiocruz.br	

Continuação do Parecer: 5.307.005

Apresentar relatório do projeto através de notificação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O prazo para a execução desse projeto é 30/06/2026 conforme cronograma especificado nas informações básicas do projeto na plataforma.

Em cumprimento da Res. 466/2012 e Norma Complementar vigente, enviar relatórios parciais a cada seis meses e relatório final em até um mês após o término da vigência do projeto conforme cronograma aprovado neste protocolo.

Relatório parcial: 07/06/2022, 07/12/2022, 07/06/2023, 07/12/2023, 07/06/2024, 07/12/2024, 07/06/2025, 07/12/2025.

Relatório final: 30/07/2026.

Caso haja inclusão de outra fonte de financiamento após esta aprovação, informar ao CEP como emenda ao protocolo incluindo o Termo de Outorga ou documento equivalente e realizando as alterações pertinentes na Folha de Rosto para indicar modificação do patrocinador principal.

The present study has been approved by the Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ (JORG0002090/OMB No. 0990-0279 valid until 03/29/2021). The protocol and procedures presented in the project are in full accordance with the Brazilian legislation regarding the ethical standards in conducting research involving human beings (Res. CNS 466/2012).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	CartaRespostaCEP_EMENDA.pdf	23/03/2022 14:46:39	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EmendaProjetoEUGENIA_TERRA_GRA NADO_respostaCEP.pdf	23/03/2022 14:46:15	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TAmalor_dez_anos23_03_2022.pdf	23/03/2022 14:41:48	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala 4CEP2  
 Bairro: Candeal CEP: 40.298-710  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3178-2285 Fax: (71)3178-2285 E-mail: cep.lgm@fiocruz.br

Continuação do Parecer: 5.307.005

Justificativa de Ausência	TAmalor_dez_anos23_03_2022.pdf	23/03/2022 14:41:48	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmalores_de_idade23_03_2022.pdf	23/03/2022 14:41:34	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Responsaveislegais_23_03_2022.pdf	23/03/2022 14:37:05	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TA_menor_dez_23_03_2022.pdf	23/03/2022 14:36:44	Carlos Gustavo Regis da Silva	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMações_BÁSICAS_1896941_E1.pdf	15/02/2022 15:57:02		Aceito
Outros	Carta EMENDA_ProjetoEUGENIA_TERRA GRANADO.pdf	15/02/2022 13:59:08	Eugénia Terra Granado Pina	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoEUGENIA_TERRA GRANADO_EMENDA.pdf	15/02/2022 11:22:09	Eugénia Terra Granado Pina	Aceito
Outros	31_05_2021CARTA_RESPOSTA_AO_SEGUNDO_PARECER_CONSUBSTANCIADO.pdf	31/05/2021 11:03:16	Eugénia Terra Granado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEresponsaveisLegais31_05_2021.pdf	31/05/2021 11:01:07	Eugénia Terra Granado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmaloresidade31_05_2021.pdf	31/05/2021 11:00:18	Eugénia Terra Granado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TA_malor_dez_anos31_05_2021.pdf	31/05/2021 10:58:56	Eugénia Terra Granado	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TA_menor_dez_31_05_2021.pdf	31/05/2021 10:57:53	Eugénia Terra Granado	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP.pdf	08/03/2021 17:27:21	Eugénia Terra Granado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_DraTeresa.pdf	08/03/2021 17:13:34	Eugénia Terra Granado	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaAnuencia_DraSocorro.pdf	08/03/2021 17:08:40	Eugénia Terra Granado	Aceito
Outros	Carta_anuencia_Hosp_Aristides_Malt	16/02/2021	Eugénia Terra	Aceito

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala „CEP“  
 Bairro: Candeal CEP: 40.296-710  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3176-2285 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br

Continuação do Parecer: 5.307.065

Outros	ez.jpeg	16/08/59	Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	CartaAnuenciadraAnaMaria.pdf	16/02/2021 16:07:18	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Jullana.pdf	07/10/2020 18:45:30	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Geraldo.pdf	07/10/2020 18:45:16	Eugênia Terra Granado	Acelto
Outros	CartaAnuenciaLabimunoAristidesMaltez.pdf	06/10/2020 11:15:05	Eugênia Terra Granado	Acelto
Outros	CartaAnuenciaMartagaoGesteira.pdf	06/10/2020 11:13:03	Eugênia Terra Granado	Acelto
Folha de Rosto	FolhaDeRostoPlataformaBrasil.pdf	25/09/2020 16:21:57	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartasdeanuencia_Mauricio.pdf	22/09/2020 21:56:45	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Jaime.pdf	22/09/2020 21:50:31	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Elda.pdf	22/09/2020 21:50:11	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Bruno.pdf	22/09/2020 21:49:43	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Pesquisadores	Cartadeanuencia_Marilda.pdf	22/09/2020 21:48:10	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	CI_019_2020_PatrocinioEugenia.pdf	22/09/2020 21:47:04	Eugênia Terra Granado	Acelto
Outros	Formulario_cadastro_BANCO_DE_DAD OS.pdf	18/09/2020 18:41:11	Eugênia Terra Granado	Acelto
Outros	DeclaracaoAnuenciaHEC.pdf	18/09/2020 17:51:33	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BiorepositórioMarcadores_em_LA.pdf	18/09/2020 17:00:44	Eugênia Terra Granado	Acelto
Declaração de concordância	Declaracao_anuencia_SantaCasaltabun a.pdf	17/09/2020 16:43:03	Eugênia Terra Granado	Acelto

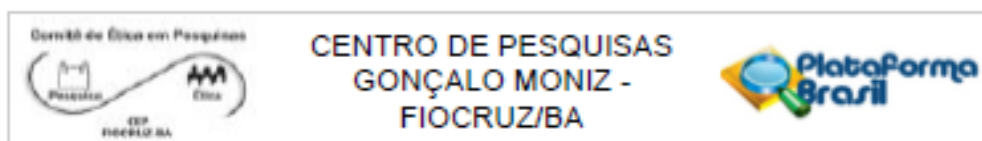
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1o Pavimento), sala 2CEP2  
 Bairro: Candeal CEP: 40.296-710  
 UF: BA Município: SALVADOR  
 Telefone: (71)3176-2285 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br



Continuação do Parecer: 5.307.605

SALVADOR, 23 de Março de 2022

---

Assinado por:  
Carlos Gustavo Regis da Silva  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Waldemar Falcão, 121 Edifício Garagem (1º Pavimento), sala 2CEP2  
Bairro: Candeal CEP: 40.298-710  
UF: BA Município: SALVADOR  
Telefone: (71)3176-2285 Fax: (71)3176-2285 E-mail: cep.igm@fiocruz.br

## ANEXO B – Termo de Assentimento para Criança e Adolescente



REPÚBLICA DE MOÇAMBIQUE  
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
COMITÉ NACIONAL DE BIOÉTICA PARA A SAÚDE  
IRB0002657

Exma. Senhora  
Dra. Raquel Chissumba  
INS

Ref:140/CNBS/23

Data 29 de Março de 2023

**Assunto:** Aprovação do Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) referente ao Protocolo de estudo intitulado: “*Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique*”

O Comité Nacional de Bioética para Saúde (CNBS) analisou as correcções efectuadas no Protocolo de estudo intitulado: “*Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique*” Registado no CNBS com o número 65/CNBS/2022, conforme os requisitos da Declaração de Helsinquia.

Não havendo nenhum inconveniente de ordem ética que impeça a realização do estudo, o CNBS dá a devida aprovação aos seguintes documentos:

- Protocolo de estudo, *versão 2.1 de 15 de Março de 2023;*
- *Folha de Informação ao Participante e Consentimento Informado, versão 1.0 de 14 de Março de 2022;*
- *Folha de Informação ao Participante e Assentimento Informado, versão 1.0 de 14 de Março de 2022;*
- Instrumentos de recolha de dados, *versão 1.0 de 14 de Março de 2022.*

Todavia, o CNBS informa que:

- 1- Qualquer alteração a ser introduzida no Protocolo, incluindo os seus anexos deve ser submetida ao CNBS para aprovação.
- 2- A presente aprovação não substitui a autorização administrativa.
- 3- Não houve declaração de conflitos de interesse por nenhum dos membros do CNBS.
- 4- A aprovação terá a validade de um ano, terminando esta a 29 de Março de 2024. Os investigadores deverão submeter o pedido de renovação da aprovação um mês antes de terminar o prazo.
- 5- Recomenda-se aos investigadores que mantenham o CNBS informado do decurso do estudo.
- 6- A lista actualizada dos membros do CNBS se encontra disponível na secretaria do Comité.

Sem mais do momento, queiram aceitar as nossas mais cordiais saudações.



Profª Doutora Esperança Seveno Comiche

Endereço:  
Ministério da Saúde - 2º andar dto  
Av. Eduardo Mondlane / Salvador Allende  
Maputo - Moçambique

C.Postal: 264  
Telefone: +258 82 406 6350  
E-mail: cnbsmocambique@gmail.com

## ANEXO C – Termo de Assentimento para Criança e Adolescente



### Termo de Assentimento

(Pacientes com idade menor ou igual a 10 anos completos)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa: **Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia**. Seus pais ou responsáveis permitiram que você participasse, entretanto, você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir. Pediremos que o seu responsável leia junto com você este documento que estamos apresentando. Deverá ser assinado por você e pelo pesquisador responsável ou membro da equipe, no final do documento e rubricado em todas as páginas, em duas vias; uma ficará com você e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável pelo estudo.

O estudo será feito com o mesmo sangue que será coletado para descobrir qual o tipo de sua leucemia (Diagnóstico), não havendo necessidade de você doar mais para esta pesquisa. Com um pouco do seu sangue, caso você concorde, vamos estudar defeitos que podem ter acontecido nas suas células e que as tornaram doentes. Estudaremos se o tipo de defeito encontrado está ligado à forma como você irá responder ao tratamento. Se houverem sobras das suas amostras, elas serão devidamente guardadas, com a possibilidade de serem utilizadas em estudos no futuro, caso você autorize. Também pedimos para usar algumas informações sobre você e sua doença, como sua data de nascimento, sexo, dados clínicos e resultados de exames de laboratório. Se você entrar para essa pesquisa quando já tiver terminado seu tratamento, seu sangue não será usado para esse estudo, somente iremos utilizar informações sobre você e sua doença.

Os riscos da sua participação neste projeto de pesquisa são mínimos, pois utilizaremos apenas uma pequena quantidade do material biológico que será coletado para realizar o seu diagnóstico. A descoberta do seu nome por outras pessoas que não estão envolvidas neste estudo é considerada um risco, entretanto, este risco será pequeno, pois o seu nome não será divulgado em nenhuma situação. Para manter seu nome em segredo, a equipe da pesquisadora responsável irá guardar uma cópia deste documento assinado em total segredo, e dará um número para identificar o seu sangue, assim, ele será usado de forma que o seu nome não apareça em nenhuma situação, assim como seus dados pessoais. Você ou seus responsáveis não receberão nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa. Mas se ocorrer algum problema devido à sua participação na pesquisa, você receberá cuidado médico gratuito imediato e integral, até a sua recuperação. Você e seus responsáveis não terão nenhuma despesa com essa pesquisa, caso ocorra algum custo adicional, você receberá o valor gasto de volta. E em caso de algum prejuízo, você tem direito a buscar indenização nos termos da lei. Este estudo contribuirá para que possamos entender melhor a sua doença e de outras crianças.

Caso queira tirar dúvidas, você pode conversar com o seu médico, que irá responder suas perguntas. Você também pode procurar a pesquisadora responsável por esse estudo, Dra. Eugênia Terra Granado Pina, nos telefones (21) 97907-6333 ou (71) 3176-2226, ou pedir a seu médico que entre em contato conosco.

Um resumo do desenho do estudo, para que você possa compreender melhor está no final deste documento.

Pesquisadora Responsável:

Nome: Dra. Eugênia Terra Granado Pina

E-mail: eugranado@yahoo.com.br

Telefons: (71) 3176-2226 no horário comercial (8h às 17h)

Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz (IGM/Fiocruz)

Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador – BA

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do responsável

Você também pode entrar em contato, ou pedir ao seu responsável para fazer isso, com o Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz (CEP Fiocruz), através dos seguintes contatos:

Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz

e-mail: [cep.igm@fiocruz.br](mailto:cep.igm@fiocruz.br)

Telefone: (71) 3176-2285, no horário comercial (8h às 17h)

Endereço: Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador-BA

Se você e seu responsável deixarem, a sobra de seu material biológico poderá ser guardada e usada em outras pesquisas, mas vamos perguntar novamente se você autoriza.

Autorizo que o material biológico que sobrar desta pesquisa seja mantido na Fiocruz, sabendo que o uso em estudos no futuro terão meu novo consentimento.

Eu não autorizo, o material biológico que sobrar desta pesquisa deverá ser descartado.

Assentimento:

Eu ouvi e entendi este termo de assentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Nome do participante do estudo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante do estudo

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

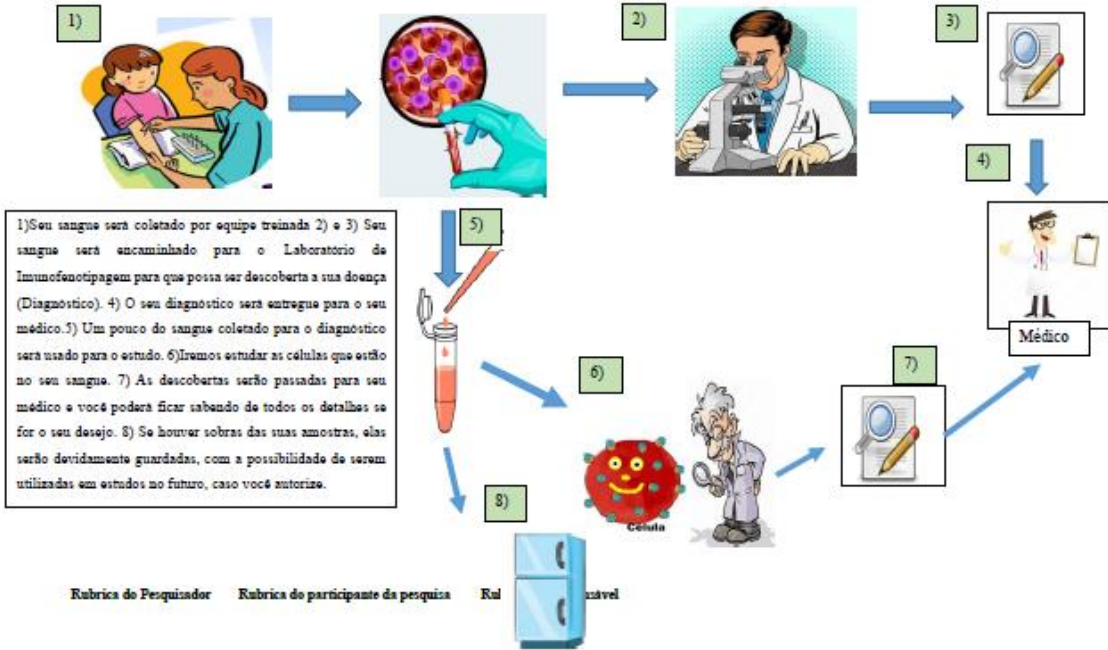
\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do responsável



## ANEXO D – Termo de Assentimento para Maiores de 10 anos



### **TERMO DE ASSENTIMENTO**

(Pacientes com idade maior que 10 anos e menor de 18 anos)

**Título do Projeto:** Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia

#### **Informação ao participante da pesquisa:**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa: **Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia**. Somente após conversar com seu responsável legal, ler, entender tudo que está escrito neste documento e não ter mais nenhuma dúvida, é que você poderá assinar se estiver de acordo em participar desta pesquisa. Você poderá levar uma via deste termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) para casa e discutir com seus familiares e/ou amigos se vocês desejarem, por um tempo suficiente para sua compreensão, conforme item IV.1.c da Resolução 466/2012 do CNS. Para que você possa decidir se deseja participar ou não, precisa conhecer um pouco mais sobre benefícios, riscos/incômodos, consequências da sua participação, entre outras informações que estão neste documento.

#### **O que é, e para que fazer esta pesquisa?**

Queremos estudar defeitos que podem ter acontecido nas células do seu sangue ou medula óssea (amostras biológicas) que as tornaram doentes. Dentro e fora das suas células existem moléculas chamadas de proteínas, que são importantes para as células do corpo funcionarem corretamente. Neste estudo iremos avaliar se existem defeitos na quantidade ou função dessas proteínas que podem estar levando ao adoecimento das células e interferindo na forma como você irá responder ao tratamento. Se você concordar em participar deste estudo, faremos exames de laboratório em uma parte das suas amostras biológicas que forem coletadas para descobrir se você tem leucemia ou coletadas durante seu tratamento, ou seja, amostras biológicas utilizadas para o seu diagnóstico e acompanhamento. Não vamos coletar amostras biológicas somente para esta pesquisa. Além disso, se você concordar, iremos coletar e anotar em um formulário da pesquisa, algumas informações sobre você e sua doença, como sua data de nascimento, sexo, dados clínicos e resultados de exames de laboratório. Caso você entre para esse estudo após haver terminado seu tratamento, suas amostras de sangue ou medula óssea não serão obtidas nem utilizadas para esse estudo, somente iremos utilizar informações sobre você e sua doença, coletadas em seu prontuário médico.

#### **Quais serão os benefícios que eu posso ter com minha participação nesta pesquisa?**

Você ou seus responsáveis não serão beneficiados diretamente pela sua participação nessa pesquisa, nem receberão nenhum pagamento financeiro. No entanto, sua participação é muito importante, porque poderá contribuir para um melhor diagnóstico e compreensão da leucemia aguda, e para o desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, irá contribuir para identificar características específicas da população brasileira, que será investigada neste trabalho.

#### **Corro algum risco ou incômodo com minha participação nesta pesquisa?**

Os riscos da sua participação neste projeto de pesquisa são mínimos, pois utilizaremos apenas uma pequena quantidade do material biológico que será coletado para realizar o seu diagnóstico. A retirada do seu sangue ou medula óssea, necessária para descobrirmos a sua doença, pode causar incômodo, um pequeno sangramento ou algumas manchas roxas que podem aparecer no local, mas que desaparecem com o tempo, conforme explicado pelo seu médico responsável. Se ocorrer algum tipo

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do responsável

dano direto ou indireto, devido à sua participação na pesquisa, será dada assistência médica gratuita imediata e integral, até sua plena recuperação. Você e seus responsáveis não terão nenhuma despesa com essa pesquisa, caso haja algum custo adicional, vocês receberão o valor gasto de volta. No caso de algum prejuízo, vocês têm direito a buscar indenização nos termos da lei.

Em relação à segurança das suas informações, o seu nome não será divulgado em nenhuma situação. Para manter este segredo, a equipe da pesquisadora responsável irá guardar uma via deste documento assinado em sigilo absoluto, e dará um número para identificar o seu material, assim, ele será usado de forma que o seu nome não apareça em nenhuma situação, assim como seus dados pessoais.

**Posso não aceitar, ou mesmo desistir da minha participação neste estudo?**

A sua participação neste projeto de pesquisa é voluntária, você não sofrerá nenhuma penalidade caso não autorize a utilização das suas amostras biológicas neste projeto de pesquisa. O seu tratamento e acompanhamento médico serão os mesmos, independentes de sua decisão de autorizar ou não a utilização de suas amostras. Você pode desistir da sua participação nesta pesquisa a qualquer momento. Para isto, comunique o seu desejo ao seu responsável legal, pois ele (a) tem todas as informações necessárias para fazê-lo.

**Quem eu posso procurar para conversar sobre esta pesquisa?**

Você tem a liberdade de conversar com os pesquisadores envolvidos neste estudo toda vez que precisar. O médico responsável por explicar esse documento e o projeto de pesquisa, também se coloca à disposição para responder suas perguntas. Se você tiver qualquer dúvida sobre sua participação, suas amostras, ou sobre seus direitos como participante na pesquisa, você e seu responsável legal podem procurar a pesquisadora responsável por este projeto, que estará disponível através dos seguintes contatos:

Pesquisadora Responsável:  
Nome: Dra. Eugênia Terra Granado  
E-mail: [eugranado@yahoo.com.br](mailto:eugranado@yahoo.com.br)  
Telefone: (71) 3176-2226 no horário comercial (8h às 17h)  
Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz (IGM/Fiocruz)  
Rua Waldemar Falcão 121, Brotas  
Salvador - BA

Se você tiver qualquer dúvida sobre seus direitos como participante de pesquisa, você e/ou seu responsável legal também podem procurar o Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz, (CEP Fiocruz). O CEP é composto por várias pessoas que avaliam todos os estudos com os seres humanos, e foi criado para defender os direitos das pessoas que decidem participar.

Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz  
e-mail: [cep.igem@fiocruz.br](mailto:cep.igem@fiocruz.br)  
Telefone: (71) 3176-2285, no horário comercial (8h às 17h)  
Rua Waldemar Falcão 121, Brotas,  
Salvador-BA

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

Rubrica do responsável

Se você e seu responsável deixarem, a sobra do seu material biológico poderá ser guardada e usada em outras pesquisas, mas vamos perguntar novamente se você autoriza.

- ( ) Autorizo que o material biológico que sobrar desta pesquisa seja mantido na Fiocruz, sabendo que o uso em estudos no futuro terão meu novo consentimento.
- ( ) Eu não autorizo, o material biológico que sobrar desta pesquisa deverá ser descartado.

**Assentimento:**

Eu ouvi e entendi este termo de assentimento. Minhas perguntas foram respondidas. Eu, voluntariamente, concordo em participar:

Nome do participante do estudo: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante do estudo

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora



Impressão Digital do Participante do Estudo

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Hora

**Rubrica do Pesquisador**

**Rubrica do participante da pesquisa**

**Rubrica do responsável**

## ANEXO E – Termo de Consentimento Para Maiores Legais



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para maiores legais)

**Título do Projeto:** Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo porque você tem suspeita de estar com leucemia, ou foi diagnosticado com a doença em um momento passado. Outra possibilidade é que você não tenha leucemia e que preencha os requisitos para ser um controle importante para os nossos estudos. No caso de entrar no estudo durante a fase de diagnóstico, estamos consultando você sobre a possibilidade de que as amostras que sobraem de sangue e/ou medula óssea, que forem coletadas para realizar exames de laboratório, possam ser armazenadas e utilizadas para pesquisas. Também pedimos sua autorização para utilizar informações do prontuário médico relacionadas ao diagnóstico, à clínica, à resposta terapêutica, aos testes laboratoriais, e informações demográficas como idade, sexo, etnia. No caso de você entrar no estudo após haver encerrado seu tratamento, não serão obtidas para o estudo novas amostras de sangue ou medula óssea, sendo apenas utilizadas informações de prontuários.

Para você decidir se estamos autorizados a usar amostras biológicas e as informações acima em pesquisas, você precisa conhecer os objetivos deste estudo, os benefícios, riscos e consequências. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer o seu consentimento por escrito para a sua participação, através de sua assinatura e data neste documento. Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que é um pedido de autorização para uso de amostras biológicas e informações referentes à doença, em um projeto de pesquisa (estudo). Deverá ser assinado por você e pelo pesquisador responsável ou membro da equipe, no final do documento e rubricado em todas as páginas, em duas vias; uma ficará com você e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável pelo estudo.

#### Propósito do estudo

O objetivo desse estudo é identificar alterações na medula óssea ou sangue periférico dos pacientes que possam auxiliar no aperfeiçoamento da classificação de risco das leucemias agudas, na melhoria de tratamentos já existentes, e no desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, iremos avaliar se essas alterações podem estar associadas com o tipo de leucemia, características clínicas e evolução da doença durante e após o tratamento.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

### Procedimento do estudo

Se você concordar com a sua participação neste estudo, serão realizados nas amostras biológicas que forem coletadas para o diagnóstico e acompanhamento, testes que permitam identificar marcadores adquiridos durante o desenvolvimento da doença. Os pesquisadores participantes deste projeto também consultarão seus dados clínicos. Este material biológico somente será usado se estiver disponível e não interferir na quantidade necessária para a realização do diagnóstico.

Solicitamos também que os pesquisadores participantes deste projeto possam coletar e anotar em um formulário próprio da pesquisa, dados secundários consultados no prontuário médico, tais como data de nascimento, sexo, dados clínicos e resultados de testes laboratoriais.

A partir do material biológico iremos realizar exames que identifiquem proteínas das células doentes e das células que protegem o organismo de doenças (células do Sistema Imune). Também iremos estudar alguns aspectos do comportamento dessas células, como capacidade de saída da medula óssea e invasão em outros órgãos. Algumas das proteínas estudadas nas células doentes serão CXCR4, VLA-4, CD44, CD43 e PSGL-1, e entre as células de defesa do organismo, denominadas linfócitos T, iremos estudar a expressão de proteínas como PD-1, TIM3, OX40, LAG3, ICOS entre outras. Também iremos verificar as respostas funcionais das células doentes e das células do sistema imune através de estudos *in vitro* (testes no laboratório). As pesquisas das células e proteínas alteradas serão feitas nas sobras das amostras do diagnóstico e nas sobras das amostras coletadas ao longo do tratamento, com o objetivo de verificar se há a presença de quantidade mínima de células leucêmicas residuais e como está a resposta do seu sistema imune.

### Bases da participação voluntária (direito a recusa ou abandono)

Sua participação nesta pesquisa é voluntária. Você pode se recusar a participar ou desistir de participar em qualquer momento. A recusa em participar de todo ou de parte desta pesquisa não afetará seus cuidados médicos e nem haverá prejuízo em suas relações presentes ou futuras com o hospital ou com as instituições envolvidas na pesquisa. Você poderá levar uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido para casa e discutir com seus amigos e/ou familiares se assim desejarem, por um tempo suficiente para sua compreensão, conforme item IV.1.c da Resolução 466/2012 do CNS. Caso concorde em participar, você receberá uma via deste termo de consentimento, que deverão ser rubricadas em todas as páginas e assinadas por você ou seu representante legal e pelo pesquisador responsável ou membro da equipe.

### Riscos

Esta é uma pesquisa de risco mínimo, uma vez que será utilizada apenas parte das amostras biológicas coletadas de rotina para o diagnóstico ou acompanhamento médico. As punções venosas (retiradas de sangue da veia) e punções de medula óssea podem

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

resultar em dor no local da punção, um pequeno sangramento ou manchas roxas transitórias, mas a equipe de coleta é treinada e tomará os cuidados necessários para reduzir os riscos. Em relação à segurança de suas informações, seu nome não será divulgado em nenhuma circunstância. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste TCLE assinado em sigilo absoluto, e atribuirá um número de identificação para a amostra biológica, para que seja processado de forma que a privacidade e identidade sejam totalmente preservadas.

### **Benefícios**

Você não será beneficiado diretamente pela sua participação nessa pesquisa, nem receberá compensação financeira pela sua participação. No entanto, poderá contribuir para um melhor diagnóstico e melhor compreensão da leucemia aguda, e o desenvolvimento de novas terapias. Além disso, irá contribuir para identificar características específicas da população brasileira, que será investigada neste trabalho.

### **Custos**

Você não será responsável por nenhuma despesa associada com esta pesquisa. Suas amostras e informações só serão utilizadas para a pesquisa, sem fins comerciais. Caso haja algum custo adicional com alimentação, transporte e outros decorrentes da participação na pesquisa você será ressarcido. Em caso de danos diretos ou indiretos, decorrentes da sua participação na pesquisa, será dada assistência médica gratuita imediata e integral pelo tempo necessário, até sua plena recuperação. No caso de algum prejuízo, você tem direito a buscar indenização nos termos da lei

### **Confidencialidade**

Como medidas de proteção de dados individuais, todos os documentos referentes ao acompanhamento clínico, tais como resultados de exames, testes, TCLE ou prontuário serão confidenciais. Apenas você, as equipes de saúde que fazem o atendimento, a equipe da pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da Fiocruz terão acesso a estas informações. Suas amostras e informações receberão um código único. O acesso ao banco de dados e as amostras ficarão controlados por senha e restrição de acesso. Você também não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante da pesquisa.

No Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP Fiocruz), participam servidores da Fiocruz e representantes da sociedade, que avaliam e aprovam projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, a fim de garantir os princípios éticos e científicos na pesquisa e o cumprimento das Resoluções do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) e legislações vigentes.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa



#### **Garantia de esclarecimentos**

Você tem a liberdade de conversar com os pesquisadores envolvidos neste estudo toda vez que precisar. O médico responsável por explicar e obter assinaturas neste "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)", e que lhe explicou todas estas informações, também se coloca à disposição para responder suas perguntas sempre que precisar.

Se você tiver qualquer questão sobre sua participação, suas amostras, ou sobre seus direitos como participante na pesquisa, por favor, procure a pesquisadora responsável por este projeto, que estará disponível através dos seguintes contatos:

#### **Pesquisadora Responsável:**

Nome: Dra. Eugênia Terra Granado

E-mail: [eugranado@yahoo.com.br](mailto:eugranado@yahoo.com.br)

Telefone: (71) 3176-2226 no horário comercial (8h às 17h)

Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz (IGM/Fiocruz)

Rua Waldemar Falcão 121, Brotas

Salvador - BA

Se tiver perguntas com relação aos seus direitos, como participante deste projeto de pesquisa, também pode contar com um contato imparcial, no Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz, (CEP Fiocruz), através dos seguintes contatos:

#### **Comitê de Ética em Pesquisas da Fiocruz**

e-mail: [cep.igm@fiocruz.br](mailto:cep.igm@fiocruz.br)

Telefone: (71) 3176-2285, no horário comercial (8h às 17h)

Rua Waldemar Falcão 121, Brotas,

Salvador-BA

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do participante da pesquisa

## ANEXO F – Termo de Consentimento Para Responsáveis por Pacientes Menores de Idade



### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Responsáveis por pacientes menores de Idade)**

**Título do Projeto:** Estudo das alterações citogenético-moleculares, imunofenotípicas e do microambiente medular nas Leucemias Agudas da Infância na Bahia

A criança ou adolescente de sua responsabilidade está sendo convidado (a) a participar de um estudo porque ele (a) tem suspeita de estar com leucemia, ou foi diagnosticado com a doença em um momento passado. Outra possibilidade é que ele (a) não tenha leucemia e que preencha os requisitos para ser um controle importante para os nossos estudos. No caso de crianças ou adolescentes que entrem no estudo durante a fase de diagnóstico, estamos consultando você sobre a possibilidade de que as amostras que sobraem de sangue e/ou medula óssea, que forem coletadas para realizar exames de laboratório, possam ser armazenadas e utilizadas para pesquisas. Também pedimos sua autorização para utilizar informações do prontuário médico relacionadas ao diagnóstico, à clínica, à resposta terapêutica, aos testes laboratoriais, e informações demográficas como idade, sexo, etnia. No caso de crianças ou adolescentes que entrem no estudo após haver encerrado o tratamento, não serão obtidas para o estudo novas amostras de sangue ou medula óssea, sendo apenas utilizadas informações de prontuários.

Para você decidir se estamos autorizados a usar estas amostras biológicas e as informações acima em pesquisas, você precisa conhecer os objetivos deste estudo, os benefícios, riscos e consequências para a criança ou adolescente de sua responsabilidade. Após receber todas as informações abaixo você poderá fornecer o seu consentimento por escrito para a participação da criança ou adolescente, através de sua assinatura e data neste documento. Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que é um pedido de autorização para uso de amostras biológicas e informações referentes a doença, em um projeto de pesquisa (estudo). Deverá ser assinado por você e pelo pesquisador responsável ou membro da equipe, no final do documento e rubricado em todas as páginas, em duas vias; uma ficará com você e a outra ficará sob a guarda do pesquisador responsável pelo estudo.

#### **Propósito do estudo**

O objetivo desse estudo é identificar alterações na medula óssea ou sangue periférico dos pacientes que possam auxiliar no aperfeiçoamento da classificação de risco das leucemias agudas, na melhoria de tratamentos já existentes, e no desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, iremos avaliar se essas alterações podem estar associadas com o tipo de leucemia, características clínicas e evolução da doença durante e após o tratamento.

#### **Procedimento do estudo**

Se você concordar com a participação da criança ou adolescente de sua responsabilidade neste estudo, serão realizados nas amostras biológicas que forem coletadas para o diagnóstico e acompanhamento, testes que permitam identificar marcadores adquiridos durante o

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do responsável

## **ANEXO G - Consentimento informado para menores de 12 anos (Moçambique)**

*Consentimento Informado " Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique "*

### **FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO INFORMADO PARA MENORES DE 12 ANOS**

#### **Título do estudo: Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique**

**Para os pais ou tutores legais,**

Gostaríamos de convidar o seu (sua) filho (a) ou criança sob sua guarda a participar num estudo que está a ser conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde no âmbito do diagnóstico de leucemias agudas. Este é o formulário de consentimento informado, que lhe dará a informação necessária sobre todos os detalhes do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comité Institucional de Bioética do Instituto Nacional de Saúde (CIBS) e pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) de Moçambique.

#### **1. Objectivo do estudo**

Este estudo tem como objectivo principal avaliar o impacto da introdução de uma técnica denominada imunofenotipagem, que permite fazer uma melhor caracterização das células que estão no sangue da sua criança e avaliar a presença de células tumorais que causam a doença designada leucemia. A imunofenotipagem, pode apoiar os médicos a decidir muito rápido sobre o melhor tratamento a dar a criança sob sua guarda. Pretendemos também avaliar que tipo de bactérias, tanto as que causam doença assim como as benéficas, a ocorrência de infeções virais, e como é que o estado das células de defesa influencia na resposta ao tratamento de crianças com leucemia aguda em Moçambique.

#### **2. Justificativa do estudo**

O diagnóstico precoce das leucemias agudas e emprego do protocolo de tratamento mais preciso é essencial para aumentar as chances de sobrevivência dos pacientes. Embora a classificação da leucemia seja importante para determinar o tratamento mais preciso, até em 2019, em Moçambique, o diagnóstico era feito apenas com base na leitura de lâminas de amostras de sangue periférico e aspirados de medula óssea. Estas duas técnicas não permitem fazer uma caracterização precisa do tipo de célula que originou a leucemia. Assim sendo, pela falta deste detalhe, na maioria das vezes, o tratamento oferecido às crianças era genérico.

*Versão 1.0 datada de 29.Nov.2022*

**1**

Embora se saiba do papel que uma resposta imune eficaz sobre a eliminação de tumores, até então pouca informação existe sobre o valor que ela tem na previsão do desfecho do tratamento das leucemias agudas. Ainda mais, pouco se sabe sobre o impacto das infeções virais, persistentes ou agudas, sobre as complicações que podem ocorrer durante o tratamento das leucemias.

### **3. Procedimentos do estudo**

Neste estudo serão colhidas informações da criança sob sua guarda através do preenchimento de um questionário com perguntas abertas e perguntas fechadas que serão respondidas recorrendo ao processo clínico da sua criança.

No momento em que a sua criança for admitida ao serviço no estudo, primeiro lhe serão colhidas as amostras para realização dos testes de rotina dos serviços. Nesse âmbito serão coletadas amostras de sangue periférico e sangue de medula óssea, num volume de 5 ml de cada, que serão utilizadas para fazer o hemograma, morfologia celular (lâmina) e para caracterização das células leucémicas por imunofenotipagem. Caso os resultados sejam positivos para leucemia aguda, estes volumes de sangue serão colhidos novamente para avaliação da eficácia do tratamento em mais 3 ocasiões, mês 1, mês 2 e mês 4. Estas colheitas são feitas rotineiramente. Serão também feitos testes de rotina como para COVID-19 e do HIV-1. Se aplicável, ainda como um procedimento de rotina dos serviços, durante o internamento da criança sob sua guarda será colhida adicionalmente uma amostra de sangue, no volume de 1-2 ml para crianças menores de 3 anos e 4 ml para maiores de 3 anos ou uma amostra de urina no volume de 10 ml, para avaliar a presença de bactérias no sangue ou na urina.

Após as análises de rotina, o remanescente das amostras de sangue periférico e da medula será usada para fazer estudos das células de defesa, para avaliação de marcadores séricos da funcionalidade das bactérias protetoras que se encontram no intestino da sua criança, para o rastreio de um vírus que causa leucemias denominado vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV) e de diferentes herpesvírus que podem ser reativados durante o tratamento da sua criança como representado na tabela 1. A colheita das amostras usadas para estas análises são normalmente feitas durante a assistência da sua criança, como referido acima, no momento do diagnóstico e nos meses 1, 2 e 4, após o início do tratamento. Para isto não será colhido amostra adicional. Caso o resultados da sua criança sejam categorizados como negativos para leucemia, apenas faremos uso das amostras colhidas no momento de admissão ao serviço. Colheremos

também amostras adicionais e faremos os testes descritos na tabela 1 na fase de diagnóstico/internamento.

Para além dos procedimentos feitos nos serviços de rotina disponibilizados na unidade sanitária, se durante o estudo a sua criança apresentar sintomas de doença respiratória, será feita a colheita de uma amostra naso ou orofaríngeas para rastreio de vírus respiratórios. Se houver alguma suspeita de reativação de vírus do herpes será colhida uma amostra usando uma zaragatoa nas vesículas que geralmente aparecem no rosto. Se houver alguma suspeita de infeção parasitária será feito o despiste e o remanescente da amostra poderá ser usado para caracterização molecular de bactérias que se encontram no intestino da sua criança. Esta avaliação molecular das bactérias e sua função será feita na Itália, até que a técnica esteja estabelecida em Moçambique. A tabela 1 descreve os testes que serão feitos neste estudo, incluindo a informação sobre a necessidade uma colheita de amostras adicionais ou não. **Note que para este estudo não será colhida nenhuma quantidade adicional de sangue periférico ou da medula, além daquela colhida durante a rotina.**

Tabela 1: Procedimentos do estudo que serão feitos usando *o remanescente das amostras de sangue periférico e da medula*, e a partir da colheita de zaragatoa nasal/ orofaríngea/ nas lesões de pele e fezes.

	Diagnóstico/ Internamento	Indução (Mês 1)	Consolidação (Mês 2)	Manutenção (Mês 4)	Recidiva
<i>Consentimento/assentimento informado</i>	X				
<i>Doseamento de citocinas*</i>	X	X	X	X	X
<i>Imunofenotipagem exploratória*</i>	X	X	X	X	X
<i>Teste molecular para vírus respiratórios***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste serológico para herpes vírus*</i>	X				
<i>Teste molecular para herpes vírus***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste HTLV-1/2*</i>	X				

também amostras adicionais e faremos os testes descritos na tabela 1 na fase de diagnóstico/internamento.

Para além dos procedimentos feitos nos serviços de rotina disponibilizados na unidade sanitária, se durante o estudo a sua criança apresentar sintomas de doença respiratória, será feita a colheita de uma amostra naso ou orofaríngeas para rastreio de vírus respiratórios. Se houver alguma suspeita de reativação de vírus do herpes será colhida uma amostra usando uma zaragatoa nas vesículas que geralmente aparecem no rosto. Se houver alguma suspeita de infeção parasitária será feito o despiste e o remanescente da amostra poderá ser usado para caracterização molecular de bactérias que se encontram no intestino da sua criança. Esta avaliação molecular das bactérias e sua função será feita na Itália, até que a técnica esteja estabelecida em Moçambique. A tabela 1 descreve os testes que serão feitos neste estudo, incluindo a informação sobre a necessidade uma colheita de amostras adicionais ou não. **Note que para este estudo não será colhida nenhuma quantidade adicional de sangue periférico ou da medula, além daquela colhida durante a rotina.**

Tabela 1: Procedimentos do estudo que serão feitos usando o remanescente das amostras de sangue periférico e da medula, e a partir da colheita de zaragatoa nasal/ orofaríngea/ nas lesões de pele e fezes.

	Diagnóstico/ Internamento	Indução (Mês: 1)	Consolidação (Mês: 2)	Manutenção (Mês: 4)	Recidiva
<i>Consentimento/assentimento informado</i>	X				
<i>Doseamento de citocinas*</i>	X	X	X	X	X
<i>Imunofenotipagem exploratória*</i>	X	X	X	X	X
<i>Teste molecular para vírus respiratórios***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste serológico para herpes vírus*</i>	X				
<i>Teste molecular para herpes vírus***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste HTLV-1/2*</i>	X				

<i>Microbioma em fezes**</i>	X	X	X	X	X
<i>Marcaadores serológicos da funcionalidade do microbioma**</i>	X	X	X	X	X

(X) Quando solicitado pelo clínico

\* Remanescente de amostras colhidas durante as testagens dos serviços de rotina

\*\* Colheita adicional específica do estudo

1. Pacientes que apresentem um dos sintomas: tosse, rinite, dor/inflamação na garganta, dificuldade respiratória/dispneia, apneia pneumonia, broncopneumonia, bronquite, bronquiólite, laringite, laringo-traquite, infecção das vias respiratórias superiores, ou suspeita de tuberculose, por 10 ou menos dias. Esta colheita poderá ser feita sempre que houver sintomas mesmo fora do calendário.

2. Pacientes diagnosticados como seropositivos para herpes virus com febre e lesões mucocutâneas na região orofacial e axilas durante o tratamento.

#### **4. Riscos/Benefícios de participação no estudo**

Os resultados deste estudo terão um potencial benefício para indivíduos com leucemias agudas em Moçambique e no mundo no geral, pela possibilidade da otimização das abordagens no diagnóstico e tratamento de futuros casos diagnosticados, para além do rastreio de infeções virais que podem surgir no decurso do tratamento. Contudo, os benefícios não serão imediatos, isto é, não ocorrerão mudanças imediatas para o sistema de saúde. Os procedimentos feitos neste estudo são maioritariamente conduzidos numa base regular no sistema nacional de Saúde, pelo que, o estudo não contempla a compensação dos participantes no estudo.

A colheita de amostras de sangue poderá causar um pequeno desconforto ao paciente, e o paciente corre o risco de ter hematomas se houver alguma dificuldade durante a colheita, mas nada que altere o seu estado de saúde. As amostras de sangue colhidas, conforme a rotina dos serviços, não terão nenhum impacto sobre o estado da sua criança.

A biópsia da medula óssea é considerada um procedimento seguro com risco mínimo. As complicações são raras. Em alguns casos, pode haver algum desconforto ou dor no local da biópsia por 1-2 dias. Em casos raros, pode ocorrer infeção ou sangramento. Se a criança estiver sedada, há uma pequena chance de reação ao medicamento, como reação alérgica ou respiração lenta, como também são aumentadas as chances de sucesso na colheita, uma vez que o processo pode criar irritações, como também dores. Algumas crianças podem sentir enjoos ou náuseas. Elas podem ter dor de cabeça, dor de garganta, tontura ou ficar chateados. Esses efeitos colaterais

são de curta duração e não são graves. No entanto, se houver algum problema com a sedação, a equipa médica deve tratá-los imediatamente.

Os procedimentos dessas medidas diagnósticas são necessários para confirmar o diagnóstico e iniciar o tratamento adequado e, portanto, fazem parte dos cuidados de rotina e não serão realizados apenas para fins de estudo. Para os estudos exploratórios serão apenas usadas amostras de sangue e medula óssea remanescentes dos cuidados de rotina, sem nenhuma adição. A colheita de zangãos pode ser um procedimento desconfortável, contudo não irá interferir com a saúde da criança sob sua guarda.

#### **5. Confidencialidade**

Os resultados do seu (sua) filho(a) ou parente que você toma conta serão mantidos em sigilo, somente os pesquisadores terão acesso às suas informações. Depois de aceitar a participação do seu (sua) filho(a) ou parente que você toma conta no estudo, ser-lhe-á atribuído um código único, exclusivo para este estudo e confidencial. O questionário e as amostras da criança sob sua guarda, serão codificados utilizando este código único de tal modo que ninguém poderá relacionar o questionário e as amostras da sua criança. Os documentos que contêm sua informação serão guardados em um lugar seguro e apenas o pesquisador principal terá acesso a ele. Quando o estudo terminar, os documentos contendo os resultados e informações pessoais serão destruídas. As amostras da criança sob sua guarda serão conservadas nos laboratórios do Instituto Nacional de Saúde, num período não mais de 10 anos, até que as análises aqui previstas sejam feitas. Amostras de plasma ou fezes enviadas para testagem no laboratório da Universidade de Florença, na Itália, serão testadas de imediato, sem previsão de armazenamento adicional. O relatório final do estudo não mencionará o nome da sua criança a qualquer momento, mesmo depois da colheita de amostras e estas não serão usadas para os procedimentos acima descritos. No entanto isto não vai afetar no tratamento a ser dado a sua criança e ela será atendida normalmente nas unidades sanitárias. Uma cópia do consentimento deve ser arquivada no processo do estudo referente aos participantes e outra deve ser entregue aos pais ou guardião.

#### **6. Participação voluntária**

A participação do seu (sua) filho (a) ou criança sob sua guarda neste estudo é voluntária. É livre de aceitar ou não participar neste estudo. Caso recuse em participar neste estudo isto não afectará o tratamento do seu (sua) filho (a) nesta unidade sanitária e ele (a) será tratado normalmente.

*Versão 1.0 datada de 29.Nov.2022*

5

**7. Quem pode contactar em caso de problemas?**

Se você tiver qualquer dúvida pode contactar a Investigadora Principal do estudo, Raquel Matavele Chissumba, telefone: +258 827393830, email: [raquelmatavele@gmail.com](mailto:raquelmatavele@gmail.com) ou a Co-Investigadora Principal Faizana Amodo, telefone: +258 823193410, email: [faizanaa@gmail.com](mailto:faizanaa@gmail.com). Se você concordar em participar deste estudo, por favor assine o termo de consentimento. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos entre em contato com a Senhora Cristina Chissico, pelo contacto +258 824066350, secretária do Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique localizado fisicamente no edifício central do Ministério da Saúde, Av. Eduardo Mondlane 1008, R/C, Maputo, ou pelo telefone (+258) 21 430814. Se você concordar em participar deste estudo, por favor assinar o termo de consentimento. Obrigado por participar neste estudo.

**DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE**

Eu li e compreendi este documento e toda informação verbal fornecido pelo pessoal do estudo de *Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no*

*Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique* e recebi uma cópia deste documento. Foi-me permitido fazer questões relacionadas com o estudo, recebi respostas satisfatórias as minhas perguntas. Tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Foi-me garantida a possibilidade de em qualquer altura, recusar ou abandonar o estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma:

- Concordo com a participação do meu filho (a)/ criança sob minha guarda neste estudo e o respetivo uso das amostras remanescentes do diagnóstico de rotina.
- Concordo com a avaliação da presença infecção pelo vírus linfotrópico das células T humano e herpesvírus e vírus respiratórios, se a criança sob minha guarda for elegível.
- Concordo com a colheita e envio de amostras para testagem na Universidade de Florença, na Itália.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante (letras maiúsculas)

Impressão digital  
do representante  
que não sabe  
assinar

\_\_\_\_\_  
Nome do encarregado de educação/ acompanhante/ representante legal

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura do encarregado de educação/ acompanhante/ representante legal      Data e hora

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha (letras maiúsculas)

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura da (o) testemunha      Data e hora

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Nome (em letras maiúsculas) da pessoa que obteve o assentimento      Data e hora

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que obteve assentimento      Data e hora

## **Anexo H- Assentimento informado para menores de 14 anos e maiores de 12 anos**

*Assentimento Informado " Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique "*

### **FORMULÁRIO DE ASSENTIMENTO INFORMADO PARA MENORES DE 14 ANOS E MAIORES DE 12 ANOS**

**Título do estudo: Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique**

#### **Estimado**

Gostaríamos de convidá-lo a participar num estudo que está a ser conduzido pelo Instituto Nacional de Saúde no âmbito do diagnóstico de leucemias agudas. Este é o formulário de assentimento informado, que lhe dará a informação necessária sobre todos detalhes do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comité Institucional de Bioética do Instituto Nacional de Saúde (CIBS) e pelo Comité Nacional de Bioética para a Saúde (CNBS) de Moçambique.

#### **1. Objectivo do estudo**

Este estudo tem como objectivo principal avaliar o impacto da introdução de uma técnica denominada imunofenotipagem, que permite fazer uma melhor caracterização das células que estão no seu sangue e avaliar a presença de células tumorais que causam a doença designada leucemia. A imunofenotipagem pode apoiar os médicos a decidir muito rápido sobre o melhor tratamento a dar a você. Pretendemos também avaliar que tipo de bactérias, tanto as que causam doença assim como as benéficas, a ocorrência de infeções virais, e como é que o estado das células de defesa influencia na resposta ao tratamento de crianças com leucemia aguda em Moçambique.

#### **2. Justificativa do estudo**

O diagnóstico precoce das leucemias agudas e emprego do protocolo de tratamento mais preciso é essencial para aumentar as chances de sobrevivência dos pacientes. Embora a classificação da leucemia seja importante para determinar o tratamento mais preciso, até em 2019, em Moçambique, o diagnóstico era feito apenas com base na leitura de lâminas de amostras de sangue periférico e aspirados de medula óssea. Estas duas técnicas não permitem fazer uma caracterização precisa do tipo de célula que originou a leucemia. Assim sendo, pela falta deste detalhe, na maioria das vezes, o tratamento oferecido às crianças era genérico.

*Versão 1 datada de 29.Nov.2022*

1

Embora se saiba do papel que uma resposta imune eficaz sobre a eliminação de tumores, até então pouca informação existe sobre o valor que ela tem na previsão do desfecho do tratamento das leucemias agudas. Ainda mais, pouco se sabe sobre o impacto das infecções virais, persistentes ou agudas, sobre as complicações que podem ocorrer durante o tratamento das leucemias.

### **3. Procedimentos do estudo**

Neste estudo serão colhidas suas informações através do processo seu clínico. No momento em que for admitida/o ao serviço no estudo, primeiro lhe serão colhidas as amostras para realização dos testes de rotina dos serviços. Nesse âmbito serão coletadas amostras de sangue periférico e sangue de medula óssea, num volume de 5 ml de cada, que serão utilizadas para fazer o hemograma, morfologia celular (lâmina) e para caracterização das células leucémicas por imunofenotipagem. Caso os resultados sejam positivos para leucemia aguda, estes volumes de sangue serão colhidos novamente para avaliação da eficácia do tratamento em mais 3 ocasiões, mês 1, mês 2 e mês 4. Estas colheitas são feitas rotineiramente. Serão também feitos testes de rotina como para COVID-19 e do HIV-1. Se aplicável, ainda como um procedimento de rotina dos serviços, durante o seu internamento será colhida adicionalmente uma amostra de sangue, no volume de 4 ml ou uma amostra de urina no volume de 10 ml, para avaliar a presença de bactérias no sangue ou na urina.

Após as análises de rotina, o remanescente das amostras de sangue periférico e da medula será usada para fazer estudos das células de defesa, para avaliação de marcadores presentes no sangue da funcionalidade das bactérias protetoras que se encontram no seu intestino, para o rastreio de um vírus que causa leucemias denominado vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV) e de diferentes herpesvírus que podem ser reativados durante o seu tratamento como representado na tabela 1. A colheita das amostras usadas para estas análises são normalmente feitas durante a sua assistência, como referido acima, no momento do diagnóstico e nos meses 1, 2 e 4, após o início do tratamento. Para isto não será colhido amostra adicional. Caso os seus resultados sejam categorizados como negativos para leucemias, apenas faremos uso das amostras colhidas no momento de admissão ao serviço. Colheremos também amostras adicionais e faremos os testes descritos na tabela 1 na fase de diagnóstico/internamento.

Para além dos procedimentos feitos nos serviços de rotina disponibilizados na unidade sanitária, se durante o estudo você apresentar sintomas de doença respiratória, será feita a colheita de uma

amostra naso ou orofaríngeas para rastreio de vírus respiratórios. Se houver alguma suspeita de reativação de vírus do herpes será colhida uma amostra usando uma zaragatoa nas feridas que geralmente aparecem no rosto. Se houver alguma suspeita de infeção parasitária será feito o despiste e o remanescente da amostra poderá ser usado para caracterização molecular de bactérias que se encontram no seu intestino. Esta avaliação molecular das bactérias e sua função será feita na Itália, até que a técnica esteja estabelecida em Moçambique. A tabela 1 descreve os testes que serão feitos neste estudo, incluindo a informação sobre a necessidade uma colheita de amostras adicionais ou não. **Note que para este estudo não será colhida nenhuma quantidade adicional de sangue periférico ou da medula, além daquela colhida durante a rotina.**

Tabela 1: Procedimentos do estudo que serão feitos usando o remanescente das amostras de sangue periférico e da medula, e a partir da colheita de zaragatoa nasal/ orofaríngea/ nas lesões de pele e fezes.

	Diagnóstico/ Internamento	Indução (Mês 1)	Consolidação (Mês 2)	Manutenção (Mês 4)	Recidiva
<i>Consentimento/assentimento informado</i>	X				
<i>Doseamento de citocinas*</i>	X	X	X	X	X
<i>Imunofenotipagem exploratória*</i>	X	X	X	X	X
<i>Teste molecular para vírus respiratórios***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste serológico para herpes vírus*</i>	X				
<i>Teste molecular para herpes vírus***</i>		(X)	(X)	(X)	(X)
<i>Teste HTLV-1/2*</i>	X				
<i>Microbioma em fezes**</i>	X	X	X	X	X
<i>Marcadores serológicos da funcionalidade do microbioma**</i>	X	X	X	X	X

(X) Quando solicitado pelo clínico

\* Remanescente de amostras colhidas durante as testagens dos serviços de rotina

\*\* Colheita adicional específica do estudo  
Versão 1 datada de 29.Nov.2022

1. Pacientes que apresentem um dos sintomas: tosse, rinite, dor/inflamação na garganta, dificuldade respiratória/dispneia, apneia pneumonia, hemoconpneumonia, bronquite, bronquiolite, laringite, laringo-traqueite, infecção das vias respiratórias superiores, ou suspeita de tuberculose, por 10 ou menos dias. Esta colheita poderá ser feita sempre que houver sintomas mesmo fora do calendário.
2. Pacientes diagnosticados como seropositivos para herpes virus com febre e lesões mucocutâneas na região orofacial e axilas durante o tratamento.

#### **4. Riscos/Benefícios de participação no estudo**

Os resultados deste estudo terão um potencial benefício para indivíduos com leucemias agudas em Moçambique e no mundo no geral, pela possibilidade da otimização das abordagens no diagnóstico e tratamento de futuros casos diagnosticados, para além do rastreio de infeções virais que podem surgir no decurso do tratamento. Contudo, os benefícios não serão imediatos, isto é, não ocorrerão mudanças imediatas para o sistema de saúde. Os procedimentos feitos neste estudo são maioritariamente conduzidos numa base regular no sistema nacional de Saúde, pelo que, o estudo não contempla a compensação dos participantes no estudo.

A colheita de amostras de sangue poderá causar um pequeno desconforto ao paciente, e o paciente corre o risco de ter hematomas se houver alguma dificuldade durante a colheita, mas nada que altere o seu estado de saúde. As amostras de sangue colhidas, conforme a rotina dos serviços, não terão nenhum impacto sobre o seu estado.

A biópsia da medula óssea é considerada um procedimento seguro com risco mínimo. As complicações são raras. Em alguns casos, pode haver algum desconforto ou dor no local da biópsia por 1-2 dias. Em casos raros, pode ocorrer infeção ou sangramento. Se a criança estiver sedada, há uma pequena chance de reação ao medicamento, como reação alérgica ou respiração lenta, como também são aumentadas as chances de sucesso na colheita, uma vez que o processo pode criar irritações, como também dores. Algumas crianças podem sentir enjoos ou náuseas. Elas podem ter dor de cabeça, dor de garganta, tontura ou ficar chateados. Esses efeitos colaterais são de curta duração e não são graves. No entanto, se houver algum problema com a sedação, a equipa médica deve tratá-los imediatamente.

Os procedimentos dessas medidas diagnósticas são necessários para confirmar o diagnóstico e iniciar o tratamento adequado e, portanto, fazem parte dos cuidados de rotina e não serão realizados apenas para fins de estudo. Para os estudos exploratórios serão apenas usadas amostras de sangue e medula óssea remanescentes dos cuidados de rotina, sem nenhuma adição. A colheita

de zangaratoas pode ser um procedimento desconfortável, contudo não irá interferir com a sua saúde.

#### **5. Confidencialidade**

Os seus resultados serão mantidos em sigilo, somente os pesquisadores terão acesso às suas informações. Depois de aceitar a sua participação, ser-lhe-á atribuído um código único, exclusivo para este estudo e confidencial. O questionário e as suas amostras, serão codificados utilizando este código único de tal modo que ninguém poderá relacionar o questionário e as suas amostras. Os documentos que contêm sua informação serão guardados em um lugar seguro e apenas o pesquisador principal terá acesso a ele. Quando o estudo terminar, os documentos contendo os resultados e informações pessoais serão destruídas. As suas amostras serão conservadas nos laboratórios do Instituto Nacional de Saúde, num período não mais de 10 anos, até que as análises aqui previstas sejam feitas. Amostras de plasma ou fezes enviadas para testagem no laboratório da Universidade de Florença, na Itália, serão testadas de imediato, sem previsão de armazenamento adicional. O relatório final do estudo não mencionará o seu nome a qualquer momento, mesmo depois da colheita de amostras e estas não serão usadas para os procedimentos acima descritos. No entanto isto não vai afetar no seu tratamento você será atendida/o normalmente nas unidades sanitárias. Uma cópia do consentimento dos seus pais e seu assentimento deve ser arquivada no processo do estudo referente aos participantes e outra deve ser entregue a você e aos seus pais ou guardiões.

#### **6. Participação voluntária**

A sua participação neste estudo é voluntária. É livre de aceitar ou não participar neste estudo. Caso recuse em participar neste estudo isto não afectará o seu tratamento nesta unidade sanitária e você será tratado normalmente.

#### **7. Quem pode contactar em caso de problemas?**

Se você tiver qualquer dúvida pode contactar a Investigadora Principal do estudo, Raquel Matavele Chissumba, telefone: +258 827393830, email: [raquelmatavele@gmail.com](mailto:raquelmatavele@gmail.com) ou a Co-Investigadora Principal Faizana Amodo, telefone: +258 823193410, email: [faizanaa@gmail.com](mailto:faizanaa@gmail.com). Se você concordar em participar deste estudo, por favor assine o termo de consentimento. Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos entre em contato com a Senhora Cristina Chissico,

*Assentimento Informado "Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique"*

pelo contacto +258 824066350, secretária do Comitê Nacional de Bioética para Saúde de Moçambique localizado fisicamente no edifício central do Ministério da Saúde, Av. Eduardo Mondlane 1008, R/C, Maputo, ou pelo telefone (+258) 21 430814. Se você concordar em participar deste estudo, por favor assinar o termo de assentimento. Obrigado por participar neste estudo.

### DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu li e compreendi este documento e toda informação verbal fornecido pelo pessoal do estudo de *Avaliação do Impacto da Introdução da Imunofenotipagem e do Perfil Microbiológico no Programa de Tratamento de Leucemias Agudas Pediátricas em Moçambique* e recebi uma cópia deste documento. Foi-me permitido fazer questões relacionadas com o estudo, recebi respostas satisfatórias as minhas perguntas. Tive tempo suficiente para considerar a minha participação no estudo. Foi-me garantida a possibilidade de em qualquer altura, recusar ou abandonar o estudo sem qualquer tipo de conseqüências. Desta forma:

- Concordo com a minha participação neste estudo e o respectivo uso das amostras remanescentes do diagnóstico de rotina.
- Concordo com a avaliação da presença infecção pelo vírus linfotrópico das células T humano e herpesvírus e vírus respiratórios, se eu for elegível.
- Concordo com a colheita e envio de amostras para testagem na Universidade de Florença, na Itália.

Impressão digital  
do participante  
que não possa  
assinar

\_\_\_\_\_  
Nome do participante (letras maiúsculas)

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital do participante Data e hora

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha (letras maiúscula)

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura da (o) testemunha Data e hora

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Nome (em letras maiúsculas) da pessoa que obteve o assentimento Data e hora

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/20\_\_\_\_ :\_\_\_\_  
Assinatura da pessoa que obteve assentimento Data e hora