

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Farmácia**  
**Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas**

Flávia Favretto

**CARACTERIZAÇÃO METABOLÔMICA GLOBAL EM PLASMA DE PACIENTES  
COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Belo Horizonte

2024

Flávia Favretto

**CARACTERIZAÇÃO POR METABOLÔMICA GLOBAL NO PLASMA DE  
PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E LEUCEMIA MIELOIDE  
AGUDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Adriana Nori de Macedo

Belo Horizonte

2024

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| F277c | <p>Favretto, Flávia.</p> <p>Caracterização por metabolômica global no plasma de pacientes com leucemia linfoblástica aguda e leucemia mieloide aguda [recurso eletrônico] / Flávia Favretto. – 2024.</p> <p>1 recurso eletrônico (133 f. : il.) : pdf</p> <p>Orientador: Adriano de Paula Sabino.<br/>Coorientadora: Adriana Nori de Macedo.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.</p> <p>1. Metabolômica – Teses. 2. Cromatografia líquida – Teses. 3. Espectrometria de massa – Teses. 4. Leucemia linfocítica – Teses. 5. Leucemia – Teses. 6. Câncer – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Macedo, Adriana Nori de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 616.994</p> |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Às 09:00 horas do dia três de julho de dois mil e vinte e quatro, na sala 3062 da Faculdade de Farmácia, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Flávia Favretto**. A presidência da sessão coube ao **Adriano de Paula Sabino**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Adolfo Henrique de Moraes Silva** (UFMG), **Diego Gomes Rocha** (UFMG), **Maria Jose Nunes de Paiva** (UFMG), **Ana Paula Lucas Mota** (UFMG), **Adriana Nori de Macedo** (UFMG) e **Adriano de Paula Sabino - Orientador** (UFMG). Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de **Doutorado**, intitulada: "**CARACTERIZAÇÃO METABOLÔMICA GLOBAL EM PLASMA DE PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA E LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada** a Tese de **Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 03 de julho de 2024.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Prof. Adolfo Henrique de Moraes Silva  
UFMG

Prof. Diego Gomes Rocha  
UFMG

Profa. Maria Jose Nunes de Paiva  
UFMG

Profa. Ana Paula Lucas Mota  
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo - Coorientadora  
UFMG

Prof. Adriano de Paula Sabino - Orientador  
UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Diego Gomes Rocha, Professor do Magistério Superior**, em 03/07/2024, às 14:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 03/07/2024, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 04/07/2024, às 12:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 04/07/2024, às 13:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Nunes de Paiva, Professora do Magistério Superior**, em 12/07/2024, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adolfo Henrique de Moraes Silva, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2024, às 14:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 3319984 e o código CRC 4452929E.

*Dedico este trabalho a todos que sofrem  
com alguma doença que ameaça a  
continuidade da vida... em especial aos  
pacientes deste estudo!*

## AGRADECIMENTOS

Ao Bondoso Senhor Bom Jesus! Por ser uma força diária, me sustentando e fazendo transpassar por todos os momentos..." *Vós que estais sobrecarregados das dificuldades da vida, vinde a mim e eu vos aliviarei.*"

Tenho muitos a agradecer, desde o início da minha trajetória de vida que levou até aqui. Especialmente aos meus pais, Alcides Rocco Favretto e Dercí Farina Favretto, conseguir chegar até aqui é graças e mérito de vocês. Obrigada por tudo, amo vocês!

As minhas irmãs Carla e Adriana, aos meus avós maternos (*in memoriam*) Jose Stefano Farina e Emma Donin Farina, meus avós paternos (*in memoriam*) Antônio Favretto e Maria Meneghini e tantos outros familiares, professores, amigos, conhecidos, colegas de trabalhos por onde andei e todos os que passaram por minha vida. Agradeço muito, honro e enfatizo os que levo na alma.

A meu orientador, Prof. Adriano de Paula Sabino muito obrigado por ter acreditado no meu trabalho, por seu incentivo, conhecimentos transmitidos, auxílio, confiança e paciência durante todos esses anos. E claro, sempre me tranquilizando dizendo: calma vai dar certo!

A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Adriana Nori de Macedo, por aceitar me orientar, ensinando a metabolômica cujas contribuições foram fundamentais para a realização deste trabalho. Sempre com muita paciência, competência, disponibilidade e carinho.

Ao professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira e Olivia Brito de Oliveira Moreira do Grupo de Química Analítica e Quimiometria da Universidade Federal de Juiz de Fora, por ter proporcionado a concretização do experimento. Muito obrigada!

Aos amigos do Hospital das Clínicas e do Laboratório de Análises Clínicas da UFMG, muito obrigada pela ajuda nas coletas, no cuidado com as amostras, pelos cafés, pelo apoio na cobertura das escalas de trabalho e pela compreensão.

Aos amigos do coração Jane, Juliana, Leticiane, Nislene, Adriana e Alexandre, Ivana, Lilian Carolina, Toninho e Magda, Luciana e Renata muito, muito obrigada pela amizade, pela troca, pela escuta por todo o suporte... por estarem ao meu lado em momentos tão difíceis. Amor e gratidão sempre!

Ao meu enteado Davi, obrigada pelo carinho, pelas memórias e pela ajuda com a informática. Seu Papi está orgulhoso de você!

Aos pacientes e familiares desse estudo meu eterno agradecimento, meu respeito, minha dor, solidariedade e todo o meu afeto das inesquecíveis histórias e dolorosamente belas...

Agradeço a Universidade Federal de Minas Gerais e ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas por todo suporte acadêmico, estrutura física e espaços de convivência, agradeço a ajuda dos funcionários, professores e colegas. Por proporcionarem essa experiência do conhecimento, formação e desenvolvimento pessoal.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições.

E por fim, com todo meu amor e saudades para Evandro Machado Fiuza (*in memoriam*), que sempre foi âncora e trampolim....

Quanto do que vivi esses anos sem você aqui você sabe? Minha mente racional diz: “zero, nada”, enquanto minha mente infantil, chorosa, cambaleante e emocional ouviu você dizer: “Eu sei de tudo, minha querida. Estive ao seu lado, acompanhando a cada momento da sua jornada.” Não tenho dúvidas disso. Te amo pra sempre!



*"Nada jamais continua,  
Tudo vai recomeçar!"*

*E sem nenhuma lembrança  
Das outras vezes perdidas,  
Atiro a rosa do sonho  
Nas tuas mãos distraídas..."*

(Mario Quintana)

## RESUMO

A Leucemia linfoblástica aguda (LLA) e Leucemia mieloide aguda (LMA) são neoplasias hematológicas que resultam em alterações quantitativas e qualitativas das células sanguíneas. Ambas as neoplasias hematológicas possuem limitações inerentes aos sistemas de estadiamento, favorecendo a busca por marcadores clínicos e biológicos que possam aprimorar a predição evolutiva dessas doenças. Assim, o objetivo geral desse estudo foi identificar metabólitos diferenciadores presentes no plasma de pacientes com leucemias agudas em relação ao grupo controle através da abordagem metabolômica global, utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS). Foram analisadas no estudo amostras de plasma de 27 pacientes com LLA e de 26 pacientes com LMA, em diferentes tempos de coleta, provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais e de 32 indivíduos saudáveis que constituíram o grupo controle. O ensaio gerou 4.241 e 6.688 *molecular features* respectivamente nos modos negativo e positivo de aquisição. Os dados foram analisados por métodos estatísticos multivariados e univariados para criar o ranqueamento dos *features* discriminadores entre os grupos estudados. Para o grupo LLA (T0) vs. CTRL (grupo controle) foram selecionados 30 metabólitos com a seguinte distribuição das classes: 50% de lipídios que se enquadram em quatro categorias (ácil lipídio, esfingolipídios, glicerofosfolipídios e glicosfingolipídios), 13% de ácidos biliares; 10% de medicamentos, 3% de nucleosídeos e 24% ainda 'desconhecidos', todos com intensidade aumentada nos pacientes com LLA. Na análise das coletas temporais do grupo LLA, quando comparado com o grupo controle os metabólitos identificados com intensidade diminuída são da classe dos ácidos dicarboxílicos e leucotrienos B4/B5, e os principais com intensidade aumentada foram o ácido taurocólico, esfingosina, ácido fosfatídico, LPE O (20:4), LysoPE (14:1), CDP-DG e gangliosídeo GA1/GB4, parecendo não ter havido diferenças consideráveis desses metabólitos nos diferentes tempos de coleta. Na avaliação do grupo LMA (T0) vs. CTRL foram escolhidos os 30 principais metabólitos diferenciadores com intensidade aumentada na LMA, pertencente a classe, dos lipídios (esfingolipídios; glicerofosfolipídios), ácidos biliares, aminoácidos, nucleosídeos, medicamentos e alguns ainda desconhecidos. Para a investigação das coletas temporais do grupo LMA a partir do *heatmap* 25 principais metabólitos apresentando intensidade diminuída nos pacientes com LMA, relacionada

à classe dos ácidos dicarboxílicos e leucotrienos e com intensidade aumentada ácido taurocólico; esfingosina C17; derivados de vitamina D e ácido fosfatídico quando comparados com o grupo controle. O perfil do fenótipo metabólico aparenta não ter grandes variações de intensidade no decorrer das três semanas analisadas. Quando realizada a comparação entre os dois grupos LLA e LMA a partir do conjunto dos 30 metabólitos de cada grupo, identificamos que há 8 metabólitos exclusivos do grupo LLA (T0), 12 metabólitos exclusivos do grupo LMA (T0) e 16 metabólitos em comum entre as duas leucemias. Os metabólitos revelados nesse estudo aparecem apontados em vias biológicas importantes relacionadas nos processos da regulação imunológica como a inflamação, atuação nas cascatas de sinalização RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, (mTOR), na angiogênese, processos de sinalização celular, metabolismo energético celular e da microbiota intestinal.

Palavras-chave: metabolômica; cromatografia líquida-espectrometria de massas; leucemia linfoblástica aguda; leucemia mieloide aguda; biomarcadores; vias biológicas; câncer.

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) and acute myeloid leukemia (AML) are hematologic neoplasms that result in quantitative and qualitative alterations of blood cells. Both hematologic neoplasms have genetic limitations to staging systems, favoring the search for clinical and biological markers that can improve the evolutionary prediction of these diseases. Thus, the general objective of this study was to identify differentiating metabolites present in the plasma of patients with acute leukemias in relation to the control group through the global metabolic approach, using the liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) technique. Plasma samples from 27 patients with ALL and 26 patients with AML, at different collection times, from the Hospital das Clínicas of the Federal University of Minas Gerais and from 32 healthy individuals who constituted the control group were analyzed in the study. The assay generated 4.241 and 6.688 molecular characteristics respectively in the negative and positive acquisition modes. The data were analyzed by multivariate and univariate statistical methods to create the ranking of discriminating characteristics between the studied groups. For the ALL (T0) vs. CTRL group, 30 metabolites were selected with the following class distribution: 50% lipids that fall into four categories (acyl lipid, sphingolipid, glycerophospholipid and glycosphingolipid); 13% bile acids; 10% drugs, 3% nucleosides and 24% still 'unknown', all with increased intensity in ALL patients. In the analysis of the temporal collections of the ALL group, when compared with the control group, the metabolites identified with decreased intensity are from the class of dicarboxylic acids and leukotrienes B4/B5, and the main ones with increased intensity were taurocholic acid, sphingosine, phosphatidic acid, LPE O (20:4), LysoPE (14:1), CDP-DG and ganglioside GA1/GB4, it seems that no considerable differences were observed in these metabolites at the different collection times. In the evaluation of the AML group (T0) vs. CTRL, the 30 main differentiating metabolites with increased intensity in AML were chosen, belonging to the class of lipids (sphingolipids; glycerophospholipids), bile acids, amino acids, nucleosides, drugs and some still unknown. To investigate the temporal collections of the AML group from the heatmap, 25 main metabolites presented decreased intensity in patients with AML, related to the class of dicarboxylic acids and leukotrienes and with increased intensity of taurocholic acid; sphingosine C17; vitamin D derivative and phosphoric acid when compared to the control group. The metabolic phenotype profile does not appear to have major

variations in intensity over the three weeks analyzed. When comparing the two groups ALL and AML from the set of 30 metabolites of each group, it was identified that there are 8 metabolites exclusive to the ALL group (T0), 12 metabolites exclusive to the AML group (T0) and 16 metabolites in common between the two leukemias. The metabolites revealed in this study appear to be indicated in important biological pathways related to immune regulation processes such as inflammation, acting on the RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT (mTOR) signaling cascades, angiogenesis, cell signaling processes, cellular energy metabolism and intestinal microbiota.

Keywords: metabolomics; liquid chromatography-mass spectrometry; acute lymphoblastic leukemia; acute myeloid leukemia; biomarkers; biological pathways; cancer.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Compartimento da medula óssea na produção das células sanguíneas .                 | 21 |
| Figura 2 – Linfoblastos no sangue periférico na classificação FAB.....                        | 26 |
| Figura 3 – Exemplos de morfologias da LMA em esfregaço de sangue periférico ....              | 39 |
| Figura 4 – Organização biológica das ciências ‘ômicas’ .....                                  | 44 |
| Figura 5 – Metabólitos como moduladores ativos da atividade de genes e<br>proteínas.....      | 46 |
| Figura 6 – Fluxo de análise em metabolômica .....                                             | 48 |
| Figura 7 – Visão geral dos componentes de um instrumento de espectrometria de<br>massas ..... | 50 |
| Figura 8 – Delineamento experimental.....                                                     | 59 |
| Figura 9 – Fluxo de trabalho da etapa de preparo das amostras de plasma.....                  | 63 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Gráfico 1 – Gráfico de escores por PCA construído com amostras dos grupos doentes (LLA (T0) e LMA (T0)), grupo controle e amostras do controle de qualidade ..... | 74  |
| Gráfico 2 – PCA controle vs. LLA_T0.....                                                                                                                          | 75  |
| Gráfico 3 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) entre o grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0).....                     | 76  |
| Gráfico 4 – Classificação do modelo PLS-DA pela validação cruzada.....                                                                                            | 77  |
| Gráfico 5 – Valores dos 30 metabólitos como maiores VIPs identificados no modelo de PLS-DA para o grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0).....              | 77  |
| Gráfico 6 – Volcano plot aplicado aos dados das amostras do grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0).....                                                    | 78  |
| Gráfico 7 – Diagrama de Venn para os features moleculares discriminantes obtidos pelo PLS-DA e pelo Volcano plot para LLA (T0) vs. CTRL .....                     | 79  |
| Gráfico 8 – Mapa de calor (heatmap) dos 25 metabólitos mais relevantes selecionados a partir do PLS-DA para o grupo LLA nos tempos T0, T1, T2 e T3 .....          | 86  |
| Gráfico 9 – Volcano Plot aplicado aos dados das amostras entre os grupos doentes LLA_T0 vs. LMA_T0 .....                                                          | 115 |
| Gráfico 10 – Diagrama de Venn construído com as duas listas dos 30 metabólitos VIP de cada grupo em suas comparações com o grupo controle .....                   | 117 |

## LISTA DE QUADROS

|                                                                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Quadro 1 – Fatores de prognóstico para a leucemia linfoblástica aguda .....                                          | 28  |
| Quadro 2 – Sistema de classificação da LMA de acordo com o grupo FAB .....                                           | 32  |
| Quadro 3 – Sistemas de classificação da OMS para leucemias mieloides agudas ..                                       | 33  |
| Quadro 4 – Categorias do perfil de risco conforme determinado por anormalidades<br>citogenéticas e moleculares ..... | 35  |
| Quadro 5 – Alterações genéticas na LMA categorizadas em agrupamentos<br>funcionais .....                             | 36  |
| Quadro 6 – Relação dos metabólitos exclusivos e comuns entre os grupos<br>LLA e LMA.....                             | 117 |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1 – Resumo da população estudada.....                                                                                    | 60  |
| Tabela 2 – Período e número de amostras coletas para cada doença .....                                                          | 61  |
| Tabela 3 – Programação da eluição gradiente utilizada na separação<br>cromatográfica.....                                       | 64  |
| Tabela 4 – Comparação das variáveis do exame hemograma do grupo LLA .....                                                       | 68  |
| Tabela 5 – Comparação das dosagens séricas do grupo LLA .....                                                                   | 69  |
| Tabela 6 – Comparação das variáveis do exame hemograma do grupo LMA .....                                                       | 71  |
| Tabela 7 – Comparação das dosagens séricas do grupo LMA .....                                                                   | 72  |
| Tabela 8 – Caracterização dos 30 metabólitos plasmáticos diferenciadores entre o<br>grupo doente LLA (T0) e grupo controle..... | 80  |
| Tabela 9 – Relação dos features diferenciadores entre dois grupos LLA_T0 e<br>LMA_T0.....                                       | 116 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|          |                                                                                                                         |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CD       | Cluster of differentiation (grupamento/cluster de diferenciação)                                                        |
| Da       | Daltons                                                                                                                 |
| ESI      | Eletrospray ionization (Ionização do tipo electrospray)                                                                 |
| FISH     | Hibridação por Sondas de Fluorescência <i>in situ</i>                                                                   |
| GLOBOCAN | Global cancer observatory                                                                                               |
| HLF      | Hepatic leukemia factor                                                                                                 |
| INCA     | Instituto Nacional de Câncer                                                                                            |
| LC-MS    | Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas                                                               |
| LLA-B    | Leucemia linfoblástica aguda de linhagem B                                                                              |
| LLA-T    | Leucemia linfoblástica aguda de linhagem T                                                                              |
| miRNA    | micro-Ribonucleic acid (ácido micro-ribonucléico)                                                                       |
| OPLS-DA  | Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (Análise Discriminante Ortogonal por Mínimos Quadrados Parciais) |
| PCA      | Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)                                                        |
| PLS-DA   | Partial Least-Squares Discriminant Analysis (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais)                      |
| PML-RARA | Fusão dos genes da leucemia promielocítica com receptor alfa do ácido retinóico                                         |
| QC       | Controle de qualidade                                                                                                   |
| Q-ToF    | Analisador de massas tipo quadrupolo-tempo de voo                                                                       |

## SUMÁRIO

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                            | 19 |
| 1.1 Aspectos gerais das leucemias                                              | 20 |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                 | 23 |
| 2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda                                               | 23 |
| 2.1.1 <i>Diagnóstico</i>                                                       | 25 |
| 2.1.2 <i>Prognóstico e tratamento</i>                                          | 27 |
| 2.2 Leucemia Mieloide Aguda                                                    | 30 |
| 2.2.1 <i>Patogênese</i>                                                        | 33 |
| 2.2.2 <i>Diagnóstico</i>                                                       | 37 |
| 2.2.3 <i>Prognóstico e tratamento</i>                                          | 39 |
| 2.3 Metabolismo                                                                | 42 |
| 2.4 Metabolômica                                                               | 43 |
| 2.4.1 <i>Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)</i> | 48 |
| 2.4.2 <i>Processamento dos dados</i>                                           | 52 |
| <b>3 JUSTIFICATIVA</b>                                                         | 55 |
| 3.1 Objetivo geral                                                             | 56 |
| 3.2 Objetivos específicos                                                      | 56 |
| 3.3 Materiais e métodos                                                        | 57 |
| 3.3.1 <i>Delineamento experimental</i>                                         | 57 |
| 3.3.2 <i>Critérios de inclusão/exclusão</i>                                    | 58 |
| 3.3.3 <i>População estudada</i>                                                | 60 |
| <b>3.3.3.1 Protocolo do tratamento</b>                                         | 61 |
| 3.3.4 <i>Coleta das amostras</i>                                               | 61 |
| 3.3.5 <i>Reagentes químicos e consumíveis</i>                                  | 62 |
| 3.3.6 <i>Preparo das amostras</i>                                              | 63 |
| 3.3.7 <i>Preparo do branco e dos controles de qualidade (QC)</i>               | 64 |
| 3.4 Análise instrumental                                                       | 64 |
| 3.5 Processamento dos dados e análises estatísticas                            | 65 |
| 3.6 Identificação das entidades moleculares                                    | 66 |
| <b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                | 68 |
| 4.1 Características laboratoriais da população de estudo                       | 68 |
| 4.1.1 <i>Características laboratoriais do grupo LLA</i>                        | 68 |
| 4.1.2 <i>Características laboratoriais do grupo LMA</i>                        | 71 |

|                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2 Análise metabolômica global.....                                                                       | 73         |
| 4.3 Grupo pacientes LLA.....                                                                               | 75         |
| 4.3.1 <i>Análises Estatísticas do grupo: LLA vs. controle</i> .....                                        | 75         |
| 4.3.2 <i>Análises Estatísticas para os diferentes tempos de coleta do grupo LLA (T0, T1, T2, T3)</i> ..... | 85         |
| 4.4 Grupo pacientes LMA – artigo submetido .....                                                           | 87         |
| <b>5 COMPARAÇÕES PACIENTES LLA VS. LMA.....</b>                                                            | <b>115</b> |
| 5.1 Análises Estatísticas entre os grupos LLA vs. LMA .....                                                | 115        |
| <b>6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....</b>                                                                        | <b>119</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES.....</b>                                                                                   | <b>120</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                   | <b>121</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                         | <b>132</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Leucemias representam uma parcela significativa das doenças malignas que afetam todas as faixas etárias. São distúrbios clonais malignos dos órgãos formadores do sangue envolvendo uma ou mais linhagens de células do sistema hematopoiético. Apesar do progresso significativo no tratamento dessas doenças, sua etiologia ainda permanece desconhecida. As leucemias agudas apresentam marcada heterogeneidade na morfologia celular, taxa de proliferação, lesões genéticas e, conseqüentemente, na resposta ao tratamento. Os mecanismos moleculares, subjacentes à heterogeneidade das neoplasias malignas, são pontos importantes no estudo da biologia do câncer (Gallegos-Arreola; Borjas-Gutiérrez; Zúñiga-González; Figueroa *et al.*, 2013).

Um grande e diversificado grupo de variáveis genéticas e ambientais tem sido proposto. O papel de uma variedade de fatores, incluindo mutações genéticas pré-existentes e adquiridas, exposição à radiação, a produtos químicos durante a concepção, gravidez e ao longo da vida, efeitos de variações e distúrbios genéticos hereditários, doenças pré-existentes, agentes infecciosos, ocupações, tratamentos anteriores e uma série de outros fatores foram propostos, mas nenhum é universalmente aplicável a todos os casos (Tebbi, 2021).

As leucemias são classificadas de acordo com o tipo celular envolvido (mieloide ou linfóide) e com grau de maturação das células envolvidas (Manisha, 2012). As leucemias são doenças progressivas, neoplasias malignas que acometem o sistema hematopoiético do homem, de acordo com o banco de dados da GLOBOCAN ocupando o 13º lugar na incidência de câncer mais comum em todo mundo (Globocan, 2020) e ocupando a 11ª causa de mortalidade por câncer no mundo (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020). Para o Brasil, segundo as estimativas de incidência do INCA (Instituto Nacional de Câncer) para cada ano do triênio de 2023 a 2025, é de 11.540 casos, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres (INCA 2022).

O diagnóstico e o tratamento das neoplasias hematológicas tiveram um grande avanço nas últimas duas décadas. Muitas melhorias no atendimento aos pacientes decorrem do progresso geral da medicina, mas os avanços espetaculares no diagnóstico molecular das leucemias foram possíveis graças aos avanços na

aplicação de tecnologias moleculares e da bioinformática para refinar os esquemas de classificação tradicionais (Haferlach; Maciejewski, 2020).

A contribuição de recentes abordagens bioanalíticas como a metabolômica está melhorando nossa compreensão sobre a diversidade metabólica do câncer, resultando em classificações detalhadas dos tumores e aumentando a eficácia da medicina de precisão (Reglero; Reglero, 2019). Nesse contexto, a busca por marcadores que possam auxiliar no diagnóstico e/ou no prognóstico das leucemias agudas, através do estudo do perfil dos diferentes tipos e proporções de metabólitos é promissora para elucidação dos mecanismos envolvidos.

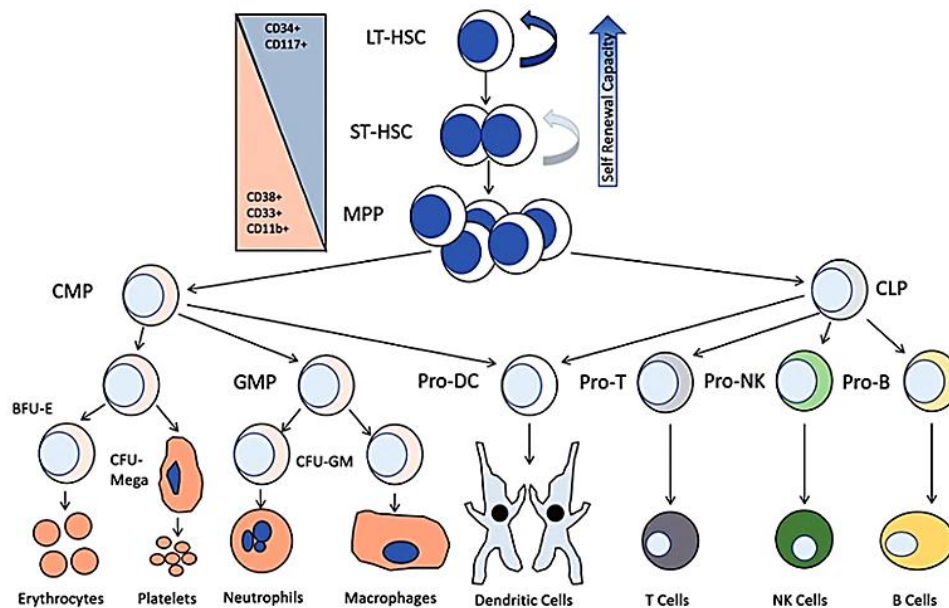
### 1.1 Aspectos gerais das leucemias

A história inicial da leucemia remota há mais de 200 anos atrás. O primeiro caso foi oficialmente diagnosticado pelo médico John Hughes Bennett e publicado em 1845, chamou a doença de 'leucocitemia', com base no acúmulo de leucócitos observado no microscópio. Nesse mesmo ano, Rudolf Virchow definiu um equilíbrio reverso de glóbulos brancos e vermelhos. Em 1847, ele introduziu o termo da doença como "leucemia", que é derivado do grego "*leukos*" (branco) e "*haima*" (sangue). Desde então, a compreensão da doença é um processo gradual com contribuição de vários pesquisadores ao longo da história. O início da doença começa com a alteração de mecanismos específicos, rigidamente regulados e envolvidos na homeostase normal da produção das células sanguíneas (Kampen, 2012).

Todos os elementos do sangue são originados durante a vida fetal e adulta a partir da célula-tronco hematopoiética pluripotente, localizada na medula óssea. Todas as células sanguíneas periféricas, tanto da linhagem mieloide quanto linfóide, se diferenciam a partir de um *pool* comum de células-tronco hematopoiéticas (HSPCs) que residem na medula óssea. Com os avanços na caracterização das células-tronco pluripotentes, aprofundou-se nossa compreensão da hematopoiese normal, como também das suas malignidades relacionadas (Lane; Gilliland, 2010; Sawyers; Denny; Witte, 1991). Esse *pool* de HSPCs pode ser dividido em três subconjuntos de tipos de células: a célula-tronco hematopoiética de longo prazo (LT-HSC), células-tronco hematopoiéticas de curto prazo (ST-HSPC), e a célula progenitora multipotente (MPP). Duas populações distintas emergem do *pool* de MPP: os progenitores linfóides comuns (CLPs) e progenitores mielóides comuns (CMPs), mostrado na Figura 1

(Carroll; St. Clair, 2018). A regulação da hematopoiese normal é um sistema rigidamente controlado, com notável renovação celular que se regenera constantemente a partir de poucas células-tronco hematopoiéticas com capacidade de autorrenovação através de um processo de divisão e diferenciação celular (Steffen; Müller-Tidow; Schwäble; Berdel *et al.*, 2005).

Figura 1 – Compartimento da medula óssea na produção das células sanguíneas



**Legenda:** Começando com as LT-HSCs CD34+ mais primitivas, que tem capacidade de auto renovação e diferenciação. A partir do pool de MPP, os tipos de células linfóides e mielóides se desenvolvem. LT-HSC: célula-tronco hematopoiética de longo prazo; ST-HSC: célula-tronco hematopoiética de curto prazo; MPP: célula progenitora multipotente; CMP: progenitor mieloide comum; CLP: progenitor linfóide comum. BFU-E: Burst-Forming Unit-Erythroid, unidade formadora de crescimento rápido-eritroide; GMP: Progenitor de Granulócito/Monócito; Erythrocytes: eritrócitos; Platelets: plaquetas; Neutrophils: neutrófilos; Macrophages: macrófagos; Dendritic cells: Células dendríticas; T-Cells: linfócitos T; NK cells: células Natural Killer; B-Cells: linfócitos B.

**Fonte:** Adaptado de Carroll; St. Clair (2018, p. 1613).

Estudos realizados demonstram que uma marca registrada de todos os cânceres é a sua capacidade de autorrenovação ilimitada, compartilhando desse atributo, foi proposto que as leucemias podem ser iniciadas por eventos transformadores que ocorrem nas células-tronco hematopoiéticas (Passegué; Jamieson; Ailles; Weissman, 2003). Várias alterações genéticas contribuem para a transformação leucêmica das células-tronco hematopoiéticas ou seus progenitores alterando as funções celulares. Elas alteram os principais processos regulatórios, por manter ou aumentar a capacidade ilimitada de autorrenovação, subvertendo os

controles de proliferação normal, bloqueando a diferenciação e promovendo resistência aos sinais de apoptose (Pui; Relling; Downing, 2004).

As células-tronco da leucemia (LSCs) podem se originar da transformação maligna de células-tronco hematopoiéticas normais (HSCs) ou alternativamente, de progenitores nos quais as mutações adquiridas favorecem um programa de autorrenovação desregulado (Buss; Ho, 2011).

As leucemias são conhecidas por serem uma doença heterogênea, tendo como característica principal a proliferação clonal acompanhada de bloqueio da maturação. Sua classificação depende do tipo celular envolvido na leucemogênese (linfoide ou mieloide) e quanto ao grau de maturidade dessas células (agudas ou crônicas). As leucemias agudas progridem num curto espaço de tempo, as células geralmente são imaturas, denominadas blastos. Ao passo que leucemias crônicas, progridem mais lentamente podendo permanecer estacionárias. Existem quatro principais tipos de leucemias, sendo elas: Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA); Leucemia mieloide aguda (LMA); Leucemia linfocítica crônica (LLC) e Leucemia Mieloide Crônica (LMC) (Alves, 2012; Farias; Castro, 2004; Kampen, 2012; Matias, 2019).



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia hematológica dos progenitores linfoides da linhagem B ou T compreendendo vários subtipos, conforme recente revisão apresentada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) na sua 5ª edição para classificação dos tumores hematopoiéticos e linfoides (Alaggio; Amador; Anagnostopoulos; Attygalle *et al.*, 2022). A LLA deriva da multiplicação desordenada das células linfoides imaturas (linfoblastos). Em condições normais o linfoblasto sofre processo de multiplicação e amadurecimento, diferenciando-se progressivamente até o estágio de linfócito maduro. A perda dessa capacidade de diferenciação e maturação associada a uma multiplicação desordenada faz com que essas células imaturas não só se acumulem na medula óssea, diminuindo drasticamente a hematopoiese normal, como também migrem e invadam outros órgãos como linfonodos, baço, rins, sistema nervoso central, gônadas etc. (Farias; Castro, 2004). A LLA é caracterizada por anormalidades cromossômicas e alterações genéticas, incluindo aneuploidia e translocações cromossômicas em genes envolvidos na diferenciação e proliferação das células precursoras linfoides (Malard; Mohty, 2020). A leucemia linfoblástica aguda tem uma distribuição etária bimodal, o primeiro pico ocorrendo aproximadamente até os 5 anos de idade e o segundo aproximadamente após 50 anos (Jabbour; Pui; Kantarjian, 2018). Atingindo o ponto mais baixo entre 25 anos e 45 anos, cerca de 60% dos casos de LLA são diagnosticados antes dos 20 anos de idade (Malard; Mohty, 2020). A LLA é o câncer infantil mais comumente diagnosticado em todo o mundo. É responsável por cerca de 75% a 80% dos casos de leucemia em crianças com <15 anos de idade (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020).

A forma mais comum de LLA é da linhagem das células B, tendo também melhor prognóstico (Armstrong; Look, 2005), enquanto a LLA de origem de células T representa em torno de 12 a 15% dos casos (Raetz; Teachey, 2016). Embora a LLA seja predominante em crianças, ela representa uma doença devastadora quando ocorre em adultos, nos quais as leucemias mieloides agudas e as leucemias linfocíticas crônicas são mais comuns (Onciu, 2009; Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). As causas que fundamentam o processo da leucemogênese da maioria dos casos LLA ainda são desconhecidos. No entanto, fatores predisponentes como a susceptibilidade

genética e fatores ambientais foram identificados em alguns pacientes. Entre as causas de susceptibilidade genética podemos citar as síndromes congênitas como: a Síndrome de Down, a anemia de Fanconi, ataxia telangiectasia, Síndrome de Bloom, Síndrome de quebras de Nijmegen; as doenças hereditárias raras como as síndromes que provocam a falência da medula óssea (Síndrome de Kostmann, anemia de Blackfan-Diamond, disceratose Congênita e a síndrome de Shwachman-Diamond); as variantes genéticas herdadas (ARID5B, IKZF1, CEBPE, CDKN2A or CDKN2B, PIP4K2A, ETV6); a translocação entre cromossomos 15 e 21, rob(15;21)(q10;q10); e os polimorfismos de um único nucleotídeo rs12402181 em miR-3117 e rs62571442 em miR-3689d2 (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020; Malard; Mohty, 2020; Teitell; Pandolfi, 2009; Terwilliger; Abdul-Hay, 2017).

Os genes alterados na leucemia podem resultar em perda ou ganho da função através de diversos mecanismos, por exemplo: recombinação cromossômica anormal (translocação, inversão, inserção) perda de material genético (deleção) ganho de material genético (duplicação), mutação pontual, presença de anormalidade numéricas como a hiperdiploidia (cópias adicionais de certos cromossomos), hipodiploidia (45 cromossomos ou menos) alterações prévias favorecendo a ativação de oncogenes, que codificam proteínas que controlam a proliferação celular, apoptose ou ambas (Farias; Castro, 2004; Gallegos-Arreola; Borjas-Gutiérrez; Zúñiga-González; Figueroa *et al.*, 2013). As mutações genéticas, apesar de serem importantes potenciadores do desenvolvimento das neoplasias, por si só, parecem não ser suficientes para a ocorrência da LLA (Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). As mutações genéticas mais frequentes e conhecidas associadas ao desenvolvimento da LLA-B são as seguintes: hiperdiploidia, hipodiploidia, as translocações t(12;21), translocação envolvendo fusão genes [ETV6-RUNX1], t(1;19) envolvendo os genes [TCF3-PBX1], t(9;22) envolvendo a fusão dos genes [BCR-ABL1], e as recentes alterações citogenéticas da amplificação intracromossômica do 21 (iAMP21) e os rearranjos envolvendo o gene KMT2A (Alaggio; Amador; Anagnostopoulos; Attygalle *et al.*, 2022). A frequência de pacientes com presença do cromossomo Philadelphia (Ph) [t(9;22)(q34;q11)] na LLA aumenta com a idade: 2-5% na infância e mais de 25% em adultos. Este gene evento de fusão está associado a mau prognóstico (Malard; Mohty, 2020). Com o progresso da análise genômica foi identificado na leucemia novo subtipo de cromossomo Philadelphia positivo, com a fusão do gene BCR-ABL1 ausente, denominado '*Philadelphia chromosome-like*', mas com semelhantes alterações que

afetam os fatores de transcrição das células B, os receptores de citocinas e vias de sinalização de tirosina quinase (Malard; Mohty, 2020).

Enquanto, na LLA de células T resulta de um processo de várias etapas onde as mutações genéticas e alterações moleculares se acumulam e alteram o controle normal do crescimento celular, diferenciação, proliferação e sobrevivência durante a timopoiese. Mutações ativadoras no gene NOTCH1, ou mutações de perda de função no gene FBXW7, é a principal via oncogênica encontrada em cerca de 80% dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células T (Kimura; Mullighan, 2020; Malard; Mohty, 2020).

Outros fatores predisponentes incluem exposição a radiações ionizantes, pesticidas, certos solventes ou vírus como o vírus Epstein-Barr e o vírus da imunodeficiência humana. No entanto, na maioria dos casos, aparece como uma malignidade nova em indivíduos previamente saudáveis (Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). Embora a frequência de subtipos genéticos seja diferente em crianças e adultos, os mecanismos gerais subjacentes à indução de LLA são semelhantes. Incluindo a expressão aberrante de proto-oncogenes, translocações cromossômicas que criam genes de fusão que codificam quinases ativadas e fatores de transcrição alterados (Pui; Relling; Downing, 2004).

#### 2.1.1 Diagnóstico

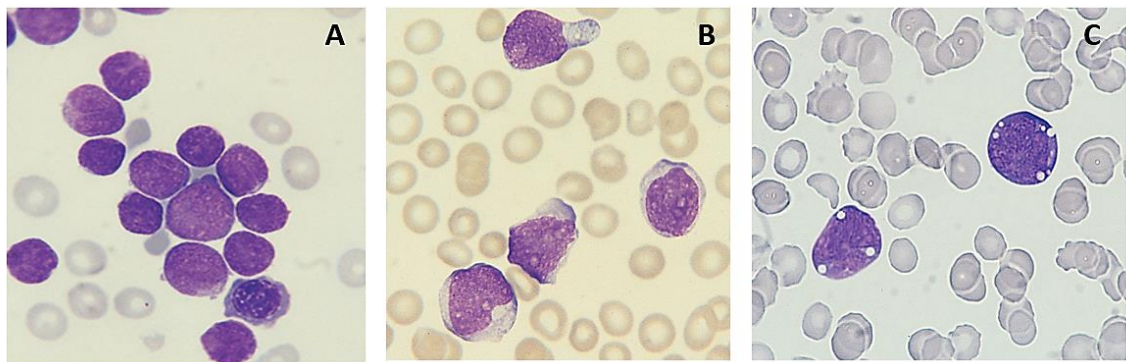
A apresentação clínica da LLA pode ser inespecífica ou com uma combinação de sinais e sintomas constitucionais de insuficiência da medula óssea como a anemia, trombocitopenia, leucopenia. Sintomas comuns incluem febre, perda de peso, suores noturnos, sangramento ou hematomas, fadiga, dispneia e infecção. O envolvimento de sítios extramedulares comumente ocorre e pode causar linfadenopatia, esplenomegalia e hepatomegalia em 20% dos casos. O envolvimento do sistema nervoso central (SNC) no momento do diagnóstico ocorre em 5-8% dos pacientes e se apresenta mais comumente com déficits de nervos cranianos ou meningismo (Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). O SNC é o sítio extramedular mais acometido na leucemia linfóide aguda (Cancela; Murao; Souza; Barcelos *et al.*, 2013).

O diagnóstico de LLA, baseia-se na avaliação da morfologia, na imunofenotipagem por citometria de fluxo e na identificação de anormalidades citogenéticas e moleculares, com uso de técnicas como a hibridização *in situ* por

fluorescência (*Fluorescent in situ hybridization* – FISH), análise de *microarrays*, análise de polimorfismos de nucleotídeo único (snps). Para definir subtipos com resposta diferente à terapia e o prognóstico, pode ser ainda determinado através dos perfis genômicos (Jabbour; Fullmer; Faderl, 2011; Mrózek; Harper; Aplan, 2009).

A classificação da LLA pelo Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) distingue a doença em três grupos (L1, L2, L3) com base em critérios morfológicos: tamanho da célula, citoplasma, nucléolos, basofilia e vacuolização. A distinção morfológica entre L1 e L2 perdeu seu significado prognóstico. A morfologia L3 está associada à fase leucêmica do linfoma de Burkitt (Jabbour; Fullmer; Faderl, 2011). Exemplos de linfoblastos neoplásicos classificados como L1, L2 e L3, são mostrados na Figura 2.

Figura 2 – Linfoblastos no sangue periférico na classificação FAB



**Legenda:** Distensões sanguíneas mostrando A) Linfoblastos LLA L1.B) Linfoblastos LLA L2.C) Linfoblastos LLA L3. Coloração de May–Grunwald–Giemsa. Ampliação de 100x.

**Fonte:** Bain (2016, p. 458 e 459).

O diagnóstico laboratorial é estabelecido pela presença de 20% ou mais de linfoblastos na medula óssea ou no sangue periférico. Associado com a análise da morfologia para identificação de linfoblastos por microscopia, a realização da imunofenotipagem por citometria de fluxo e a avaliação de anormalidades citogenéticas ou moleculares são fundamentais tanto para confirmar o diagnóstico como para fazer a estratificação de risco e o planejamento do tratamento (Alvarnas; Brown; Aoun; Ballen *et al.*, 2015; Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). Os achados no exame hemograma, podem relevar anemia normocítica e normocrômica, aumento ou menos frequentemente, diminuição da contagem de leucócitos, neutropenia e/ou presença de blastos e trombocitopenia (Jaime-Pérez; García-Arellano; Herrera-Garza; Marfil-Rivera *et al.*, 2019).

Considerando que as leucemias representam a expansão clonal de uma célula em determinado estágio maturativo, o emprego de marcadores que consigam estabelecer a diferenciação do estágio maturativo, através da identificação de antígenos de superfície e de membranas citoplasmáticas é de extrema importância para estabelecer a classificação diferenciada e uniformizada (Alves, 2012). Assim, a identificação do imunofenótipo, através da imunofenotipagem é considerado o padrão ouro para a avaliação, classificação e detecção das características das linhagens celulares, como também possui grande importância na avaliação da doença residual mínima (DRM) (Malard; Mohty, 2020). A leucemia da linhagem B está separada em quatro subtipos, sendo que cada um deles está ligado com o estágio de maturação dos progenitores, são eles: pró-B, comum, pré-B e B-maduro, conforme a expressão fenotípica. As células blásticas do tipo pró-B expressam: HLA-DR, Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), CD34, CD19 e CD22 intracitoplasmática (cCD22). A do tipo comum também denominada Calla, expressa CD10, que tem grande influência positiva no prognóstico, CD22, CD19 ou CD20, representando 75% dos casos da LLA infantil e 50% dos casos em adultos. As células blásticas do tipo pré-B apresentam cadeia  $\mu$  (mi) citoplasmática, associada com a presença do CD19, cCD79a e CD10. Por fim, as do tipo B-maduro caracterizam-se pela expressão de cadeias leves de imunoglobulina na superfície de membrana (Smlg) (Alves, 2012; Cavalcante; Rosa; Torres, 2017). Para a leucemia de células T dividindo-se em três subgrupos de acordo com os diferentes estágios de maturação das células T no timo, são elas: células pré-T, T-intermediário e células T-madura. As características mais importantes dessa leucemia são a presença do TdT e do CD7, bem como a expressão da molécula do complexo TCR (receptor de células T) e o antígeno CD3 intracitoplasmático (Alves, 2012).

### *2.1.2 Prognóstico e tratamento*

A avaliação precisa dos fatores de prognóstico é fundamental para o manejo clínico da LLA, possibilitando ao médico fazer a estratificação de risco da doença, seleção dos regimes de tratamento apropriados bem como considerar a elegibilidade para transplante alogênico de células hematopoiéticas. Historicamente, os fatores prognósticos clássicos incluem idade, hemograma no momento do diagnóstico, envolvimento do SNC, raça e etnia, sexo e linhagem celular envolvida. Alguns desses

marcadores, pelo menos em parte, têm sido substituídos por marcadores genéticos e/ou moleculares (Malard; Mohty, 2020; Rowe, 2010; Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). Pacientes diagnosticados entre 1 e 10 anos de idade têm um resultado de prognóstico superior em comparação com aqueles <1 ano ou ≥10 anos (Lee; Cho, 2017). O aumento da idade sinaliza um pior prognóstico. Pacientes com mais de 60 anos têm resultados particularmente ruins, com apenas 10 a 15% de sobrevida a longo prazo (Rowe, 2010).

Embora os fatores clínicos desempenhem um papel importante na orientação da terapia, as alterações citogenéticas têm um papel significativo na determinação favorável ou desfavorável do prognóstico (Terwilliger; Abdul-Hay, 2017). O fator de prognóstico mais importante que afeta em torno de 50% dos adultos com LLA da linhagem B é a presença do cromossomo Filadélfia (Rowe, 2010). Da mesma forma, o rearranjo do gene MLL está associado a hiperleucocitose e com prognóstico ruim, contribuindo como mau prognóstico em bebês com leucemia linfoblástica aguda (até 80% dos lactentes têm o subtipo do rearranjo do gene MLL) (Andersson; Ma; Wang; Chen *et al.*, 2015).

O prognóstico da LLA melhorou notavelmente nas últimas décadas como resultado de melhorias na adaptação da terapia, nos cuidados de suporte e otimização dos medicamentos quimioterápicos (Lennmyr *et al.*, 2019; Onciu, 2009). O sumário com os critérios clínicos, biológicos e alterações genéticas para a classificação dos fatores de prognóstico estão demonstrados no Quadro 1 (Malard; Mohty, 2020).

Quadro 1 – Fatores de prognóstico para a leucemia linfoblástica aguda

| <b>Características demográficas e clínicas</b>           | <b>Fator favorável</b>                                                    | <b>Fator adverso</b>                                                      |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Idade                                                    | 1 ano a <10 anos                                                          | <1 ano ou ≥10 anos                                                        |
| Sexo                                                     | Feminino                                                                  | Masculino                                                                 |
| Raça e etnia                                             | Branco, asiático                                                          | Negra, hispânica                                                          |
| <b>Características clínicas, biológicas ou genéticas</b> |                                                                           |                                                                           |
| Envolvimento do SNC                                      | Não                                                                       | Sim                                                                       |
| Hemograma no diagnóstico                                 | WBC:<50x10 <sup>9</sup> /L (LLA-B)<br>WBC:<100x10 <sup>9</sup> /L (LLA-T) | WBC:>50x10 <sup>9</sup> /L (LLA-B)<br>WBC:>100x10 <sup>9</sup> /L (LLA-B) |
| Imunofenótipo                                            | Linhagem de células B                                                     | Linhagem de células T                                                     |

|                               |                                                                            |                                                                                                                 |
|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                               |                                                                            |                                                                                                                 |
| Características citogenéticas | Hiperdiploidia, ETV6–RUNX, TCF3–PBX1, trissomia dos cromossomos 4,10 ou 17 | Hipodiploidia<br>Rearranjos MLL, expressão TCF3-HLF, Cariótipo complexo ( $\geq 5$ anormalidades cromossômicas) |
| Características genômicas     | Rearranjo gene DUX4 (deleção ERG)                                          | Deleções ou mutações de IKZF1, Philadelphia <i>chromosome-like</i> , e rearranjo de MEF2D                       |
| <b>Resposta ao tratamento</b> |                                                                            |                                                                                                                 |
| Doença residual mínima (DRM)  | Baixa DRM, com $<10^{-3}$ células nucleadas ou indetectáveis               | Persistência de doença residual mínima com $>10^{-3}$ de células nucleadas                                      |

**Legenda:** SNC (sistema nervoso central); WBC (global de leucócitos); ERG - do inglês *Erythroblast transformation-specific-related gene*, MLL *Mixed Lineage Leukemia*, a translocação t(17; 19)(q22;p13) levando ao gene de fusão TCF3-HLF, HLF (*hepatic leukemia factor*), TCF3 (*transcription factor 3*), IKZF1 (*IKAROS Family Zinc Finger 1*), MEF2D (*Myocyte Enhancer Factor 2D*).

**Fonte:** (Malard; Mohty, 2020).

Na grande maioria dos centros o tratamento da LLA envolve quimioterapia intensiva de curto prazo (com altas doses de metotrexato, citarabina, ciclofosfamida, dexametasona ou prednisona, vincristina, L-asparaginase e/ou uma antraciclina). Tipicamente o tratamento inclui quatro fases ao longo de 2 a 3 anos: indução, consolidação, intensificação e manutenção a longo prazo. A fase de indução visa eliminar o maior número possível de células neoplásicas presentes na medula óssea e assim permitir o restabelecimento do processo normal da hematopoiese. Na fase de consolidação tem como objetivo, não só eliminar quaisquer células neoplásicas que possam ter resistido ao tratamento de indução, como impedir a disseminação da leucemia para o SNC. Assim, é nesta fase que se administra a terapêutica profilática da invasão do SNC. Seguido pela fase de intensificação da terapia com uso de medicamentos semelhantes aos usados durante a terapia de indução, e por fim fase de manutenção da terapia. O propósito da última fase do tratamento é evitar a recaída da doença, prolongando a remissão. A fase de manutenção dura entre 2 a 3 anos e o esquema terapêutico mais utilizado consiste na administração diária de mercaptopurina, metotrexato semanal, com ou sem vincristina e esquemas mensais de corticosteróides (Alves, 2012; Malard; Mohty, 2020; Matias, 2019; Onciu, 2009). O

envolvimento do SNC é comum na LLA tanto em crianças como em adultos, por isso, o tratamento profilático da invasão do SNC é muito importante. A profilaxia padrão para malignidade do SNC pode envolver radioterapia, quimioterapia sistêmica, quimioterapia intratecal ou uma combinação destes (Jabbour; Fullmer; Faderl, 2011; Pedrosa; Lins, 2002).

O transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (alo-TCTH) tem um importante papel e potencialmente curativo no manejo da LLA dos pacientes de alto risco ou com recidivas. A seleção adequada do paciente candidato ao transplante é fundamental para garantir resultados ideais, devido à intensa combinação de radioterapia/quimioterapia preparativa frente aos efeitos contra a doença do enxerto do hospedeiro. Além disso, a importância da avaliação da doença residual mínima (DRM) antes e após o transplante com emprego de intervenções a fim de melhorar ainda mais a sobrevida livre de leucemia após alo-TCTH (Algeri; Merli; Locatelli; Pagliara, 2021). Tradicionalmente, o alo-TCTH tem sido reservado para pacientes com LLA com cromossoma Ph<sup>+</sup> ou em pacientes considerados de alto risco (idade >35 anos, linhagem B com contagem de leucócitos  $\geq 100 \times 10^9/L$ , linhagem T com contagem de leucócitos  $\geq 30 \times 10^9/L$ ) (Jabbour; Fullmer; Faderl, 2011).

Os avanços no tratamento de adultos com LLA são grandes, como o uso das imunoterapias direcionadas a transcritos específicos ou direcionadas à antígenos de superfície das células leucêmicas. Como por exemplo, os inibidores da tirosina quinase (TKI) direcionados à tirosina quinase BCR-ABL1 e os imunoconjugados que são direcionados à antígenos específicos da superfície de células leucêmicas tais como: o anti-CD22 ligado a calicheamicina, o anticorpo biespecífico anti-CD3 e anti-CD19 e a terapia das células T, geneticamente modificadas, com receptor de antígeno quimérico (CAR) anti-CD19 (Jabbour; Pui; Kantarjian, 2018; Rafei; Kantarjian; Jabbour, 2019; Seber; De Castro Junior; Kerbauy; Hirayama *et al.*, 2021).

## 2.2 Leucemia Mieloide Aguda

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica dos precursores da linhagem mieloide (hemácias, plaquetas e leucócitos) (Pelcovits; Niroula, 2020). É uma doença mieloproliferativa clonal, geneticamente heterogênea definida por o acúmulo de alterações genéticas adquiridas (somáticas) nas células progenitoras hematopoiéticas que alteram os mecanismos normais de



autorrenovação, proliferação e diferenciação (Döhner; Döhner, 2008). Caracterizada pela expansão clonal de "células blásticas" imaturas no sangue periférico e na medula óssea, com consequente substituição do tecido hematopoiético normal, resultando em eritropoiese ineficaz e falência medular (Vakiti A, Mewawalla P., 2022). A doença, representa a fase final de uma série de danos às células progenitoras da hematopoiese, que levam à proliferação e ao bloqueio da maturação da diferenciação, como resultado, os leucócitos, as hemácias e as plaquetas que são a reserva medular normal, diminuem ou se extinguem (Figueiredo, MS; Kerbauy J; Lourenço, DM, 2011).

A doença pode ocorrer em qualquer faixa etária, mas principalmente em indivíduos adultos. Nos Estados Unidos da América (EUA), dados baseados entre os anos de 2011–2016 mostram a idade mediana no diagnóstico de LMA aos 68 anos. No Reino Unido, Canadá, Austrália e Suécia, a idade mediana relatada no diagnóstico de LMA varia de 63 a 71 anos (Shallis; Wang; Davidoff; MA *et al.*, 2019). No entanto, na Índia, Brasil (Capra; Vilella; Pereira; Coser *et al.*, 2007) e Argélia, a idade mediana no diagnóstico da LMA foi de 40, 42 e 45 anos, respectivamente, que podem ser atribuídos a esses países populações em geral mais jovens ou as diferenças dos métodos para obtenção dos dados que podem tornar o diagnóstico de pacientes idosos com LMA menos provável (Shallis; Wang; Davidoff; MA *et al.*, 2019). Em todas as faixas etárias, a incidência de LMA é maior em homens do que em mulheres (Heuser; Ofran; Boissel; Mauri *et al.*, 2020).

A LMA é a leucemia aguda mais comum em adultos, respondendo por aproximadamente 80% dos casos neste grupo (De Kouchkovsky; Abdul-Hay, 2016) e representando uma pequena fração de 15 a 20% de todas as leucemias agudas da infância (Morais; Souza; Silva; Santiago *et al.*, 2021). Estudo realizado por MORAIS, Rahuany Velleda de *et al.* no estado do Rio Grande do Sul encontrou uma incidência de 13,2 ocorrências de LMA por 1.000.000 crianças com idade <18 anos, com idade mediana de 10,5 anos, o que contrasta com a literatura que relata uma idade média de 5 anos no diagnóstico. Nos EUA, a incidência é de aproximadamente 8,9 ocorrências por 1.000.000 crianças (Morais; Souza; Silva; Santiago *et al.*, 2021).

Atualmente existem dois sistemas para diagnosticar e classificar a LMA: a classificação do grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) e a classificação preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A classificação da FAB usa principalmente critérios de morfologia e imunofenótipo/citoquímicos para definir oito principais subtipos de LMA (M0 a M7), apresentados no Quadro 2. Essa forma de

organização não fornece informações prognósticas adicionais, mas é importante para sistematizar a leucemia promielocítica aguda (LPA), uma variante biológica e clínica da LMA, classificada como LMA M3 no sistema FAB, atualmente denominada leucemia promielocítica aguda com t (15,17) (q24.1,q21.1), e PML-RARA, no sistema de classificação da OMS. O subtipo M3 é uma forma muito peculiar de leucemia e pode ser considerada uma doença particular, tanto pelas características clínicas como pelo bom prognóstico (Padilha; Souza; Matos; Domino, 2015).

Quadro 2 – Sistema de classificação da LMA de acordo com o grupo FAB

| Tipo | Descrição                                                                                                              | Frequência (%) |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| M0   | LMA sem diferenciação morfológica                                                                                      | 5              |
| M1   | LMA com mínima diferenciação morfológica                                                                               | 15             |
| M2   | LMA com diferenciação (componente monocítico < 20%)                                                                    | 25             |
| M3   | LMA promielocítica hipergranular M3 variante hipogranular;                                                             | 10             |
| M4   | LMA mielomonocítica (células monocíticas ≥ 20%)                                                                        | 20             |
|      | M4 variante com eosinofilia                                                                                            | 5              |
| M5   | LMA monocítica                                                                                                         | 10             |
|      | M5a – LMA monoblástica (sem diferenciação, blastos ≥ 80%);<br>M5b – LMA monocítica (com diferenciação, blastos < 80%); |                |
| M6   | Eritroleucemia e variante                                                                                              | 5              |
| M7   | LMA megacarioblástica                                                                                                  | 5              |

**Fonte:** Adaptado de (Kumar, 2011; Silva; Pilger; Castro; Wagner, 2006).

Em maio de 2022 foi publicada a 5ª edição da OMS para classificação dos tumores Hematolinfoides: Mieloides e neoplasias de células histiocíticas e dendríticas apresentando novas recomendações, valorizando múltiplos parâmetros clínico-patológicos, moleculares/genéticos e com refinamento nos critérios de diagnóstico com ênfase na terapêutica e/ou em biomarcadores que auxiliam no prognóstico (Khoury *et al.*, 2022). Resumidamente a 5ª edição da OMS, organiza a doença em duas famílias: LMA com anormalidades genéticas definidas e a LMA definida por diferenciação (Quadro 3). Importante critério revisado foi que a maioria das LMA com anormalidades genéticas definidas pode ser diagnosticada com menos de 20% de blastos (Khoury; Solary; Abla; Akkari *et al.*, 2022).

Quadro 3 – Sistemas de classificação da OMS para leucemias mieloides agudas

|                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------|
| <b>- Leucemia mieloide aguda com anormalidades genéticas definidas</b> |
| Leucemia promielocítica aguda com fusão PML::RARA                      |
| Leucemia mieloide aguda com fusão RUNX1::RUNX1T1                       |
| Leucemia mieloide aguda com fusão CBFβ::MYH11                          |
| Leucemia mieloide aguda com fusão DEK::NUP214                          |
| Leucemia mieloide aguda com fusão RBM15::MRTFA                         |
| Leucemia mieloide aguda com fusão BCR::ABL1                            |
| Leucemia mieloide aguda com rearranjo KMT2A                            |
| Leucemia mieloide aguda com rearranjo MECOM                            |
| Leucemia mieloide aguda com rearranjo NUP98                            |
| Leucemia mieloide aguda com mutação NPM1                               |
| Leucemia mieloide aguda com mutação CEBPA                              |
| Leucemia mieloide aguda, relacionada com mielodisplasia                |
| Leucemia mieloide aguda com outras alterações genéticas definidas      |
| <b>- Leucemia mieloide aguda, definida por diferenciação</b>           |
| Leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima                       |
| Leucemia mieloide aguda sem maturação                                  |
| Leucemia mieloide aguda com maturação                                  |
| Leucemia basofílica aguda                                              |
| Leucemia mielomonocítica aguda                                         |
| Leucemia monocítica aguda                                              |
| Leucemia eritroide aguda                                               |
| Leucemia megacarioblástica aguda                                       |

**Legenda:** PML::RARA (fusão dos genes Leucemia Promielocítica) e *Retinoic Acid Receptor* (Receptor alfa do ácido retinóico). RUNX1::RUNX1T1: gene RUNX1 (fator de transcrição 1 da família RUNX) funde-se com o gene RUNX1T1 (co-repressor transcricional 1 do parceiro RUNX1). CBFβ::MYH11 fusão dos genes CBFβ (subunidade beta do fator de ligação ao núcleo) e o gene MYH11 (cadeia pesada da miosina 11). DEK::NUP214: fusão dos genes DEK (DEK proto-oncogene) e NUP214 (*nucleoporin* 214kDa). RBM15: MRTFA: fusão genes RBM15 (*RNA Binding Motif Protein* 15) e gene MRTFA (*Myocardin Related Transcription Factor A*). BCR::ABL1: fusão dos genes ABL (*Abelson murine leukemia*) e BCR (*breakpoint cluster region*). KMT2A: rearranjo do gene KMT2A (lisina metiltransferase 2A). MECOM: rearranjo do oncogene MECOM. NUP98:rearranjo do gene Nucleoporin; NPM1: mutação gene nucleofosfomina 1. CEBPA:mutação CCAAT *Enhancer Binding Protein* Alpha.

**Fonte:** Adaptado de Khoury; Solary; Abla; Akkari *et al.*, (2022, p. 1709).

### 2.2.1 Patogênese

O desenvolvimento da LMA tem sido associado a vários fatores gerais de risco, estes incluem idade, antecedentes de doenças hematológicas como a Síndrome Mielodisplásica, distúrbios genéticos como a Síndrome de Down, bem como exposição a vírus, radiação, produtos químicos ou outros riscos ocupacionais (Shaikh; Haider; Memon; Rahool *et al.*, 2020). O desenvolvimento da leucemia é um processo

que consiste em múltiplas etapas, que requer a suscetibilidade de uma célula progenitora hematopoiética a agentes indutores da leucemogênese, em vários estágios desse processo (Deschler; Lübbert, 2008). No entanto, na maioria dos casos, a LMA aparece como uma malignidade ‘nova’ em indivíduos previamente saudáveis (De Kouchkovsky; Abdul-Hay, 2016).

A descrição da patogênese molecular das LMAs teve um progresso nos últimos anos. Foram descritos dois tipos principais de eventos genéticos que são cruciais para a transformação leucêmica: alterações nos fatores de transcrição mieloide que controlam a diferenciação e as mutações em moléculas de transdução de sinal que induzem as alterações na atividade e na expressão de vários fatores de transcrição que são cruciais para a diferenciação mieloide normal (Steffen *et al.*, 2005).

Na análise citogenética é possível identificar alterações a nível de cromossomo como inversões, deleções e translocações. As anormalidades citogenéticas mais comuns da LMA são: t (8;21) (q22; q22), inv (16) (p13; q22) e t(15;17) (q22;q12), correspondentes a fusão dos genes RUNX1/RUNX1T1, CBFB/MYH11 e PML/RARA, respectivamente, apresentam prognóstico favorável por resultar uma boa resposta terapêutica (Dos Santos, 2022). Enquanto, nos pacientes com mutações nos genes NPM1 e FLT3-ITD apresentam prognóstico intermediário. E em caso de alterações t (6;9) (p23; q34), inv (3) (q21; q26.2) o prognóstico é adverso, a chance de recaída é alta e a sobrevida desses pacientes é menor, caracterizando-os como prognóstico ruim (Dos Santos, 2022).

Embora a incidência de cariótipos anormais relatados na LMA tem sido de 55% a 78% em adultos e de 77% a 85% em crianças, uma proporção substancial de pacientes com LMA não apresentam anormalidades cromossômicas (Schoch; Haferlach, 2002). As mutações genéticas são mais frequentes e identificadas em mais de 97% dos casos, muitas vezes na ausência de qualquer grande anormalidade cromossômica (De Kouchkovsky; Abdul-Hay, 2016).

A maioria das alterações cromossômicas típicas da LMA gera genes de fusão envolvidos em fatores de transcrição, estes importantes para a diferenciação mieloide, as proteínas de fusão resultante interferem em sua função, mostrando que é uma doença de desordem do controle transcricional (Steffen *et al.*, 2005). De acordo com as anormalidades citogenéticas e moleculares os pacientes com LMA podem ser divididos em três grupos de risco: favoráveis, grupo intermediário e desfavoráveis, apresentado no Quadro 4 (Pelcovits; Niroula, 2020).

Quadro 4 – Categorias do perfil de risco conforme determinado por anormalidades citogenéticas e moleculares

| Perfil de risco | Anormalidades                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Favorável       | t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1<br>inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11<br>NPM1 mutante sem FLT3-ITD/low FLT3-ITD<br>CEBPA mutante bialélico (cariótipo normal)                                                                                                                                                                 |
| Intermediário   | NPM1 e FLT3-ITD mutantes (alto)<br>NPM1 de tipo selvagem sem FLT3-ITD/ baixo FLT3-ITD (cariótipo normal)<br>t(9;11)(p21.3;q23.3)MLLT3-KMT2A<br>Anormalidades citogenéticas não classificadas como favoráveis ou adversas                                                                                                                         |
| Desfavorável    | t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214<br>t(v;11q23.3); KMT2A rearranjo<br>t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1<br>inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2);<br>GATA2,MECOM(EVI1)<br>-5 or del(5q); -7; -17/abn(17p)<br>cariótipo complexo<br>cariótipo monossômico<br>NPM1 de tipo selvagem e alto FLT3-ITD<br>RUNX1 mutante<br>ASXL1 mutante<br>TP53 mutante |

**Fonte:** Adaptado de (Pelcovits; Niroula, 2020).

Dados emergentes obtidos com o uso de novas técnicas genômicas, em particular o sequenciamento de nova geração (do inglês *Next Generation Sequencing* - NGS), estão fornecendo uma visão abrangente da doença com descobertas importantes reveladas, tendo como exemplo, o padrão de aquisição das mutações e a existência de células-tronco pré-leucêmicas, com o envolvimento dos genes DNMT3A, ASXL1, IDH2 e TET2 associados a padrões de prognósticos e a expansão clonal da hematopoiese (Döhner; Weisdorf; Bloomfield, 2015).

A aplicação do NGS tem revelado um substancial complexidade e heterogeneidade genômica da LMA, aumentando o conhecimento da diversidade de genes mutantes e do número de mutações por paciente (Khwaja; Bjorkholm; Gale; Levine *et al.*, 2016). Até recentemente, três grandes categorias eram descritas de acordo com a classificação funcional de mutações envolvidas na LMA, sendo elas: 1) mutações em genes que codificam fatores de transcrição, que estão envolvidos na

regulação da diferenciação e autorrenovação celular; 2) ativação de vias de sinalização celular que regulam a proliferação e sobrevivência celular e 3) as modificações epigenéticas que regulam a expressão de vários genes. Com os avanços no sequenciamento do genoma apontam para inclusão de outras categorias, apresentadas no Quadro 5, como as mutações em *spliceossomo* (Khwaja; Bjorkholm; Gale; Levine *et al.*, 2016).

Quadro 5 – Alterações genéticas na LMA categorizadas em agrupamentos funcionais

| Função                          | Exemplos de genes mutados na LMA                          | Frequência (%) |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------|
| Vias de sinalização             | FLT3, KIT, KRAS, NRAS e Proteína serina-treonina quinases | 59             |
| Metilação do DNA                | DNMT3A, TET2, IDH1 e IDH2                                 | 44             |
| Modificadores cromatina         | Fusão do MLL (conhecido como KMT2A) ASXL1 e EZH2          | 30             |
| Nucleofosmina                   | NPM1                                                      | 27             |
| Fatores de transcrição mieloide | RUNX1 e CEBPA                                             | 22             |
| Fatores de transcrição          | PML–RARA, MYH11–CBFB e RUNX1–RUNX1T1                      | 18             |
| Supressores de tumor            | TP53, WT1 e PHF6                                          | 16             |
| Complexo de spliceossoma        | SRSF2 e U2AF1                                             | 14             |

**Fonte:** Adaptado de (Khwaja; Bjorkholm; Gale; Levine *et al.*, 2016).

As principais anormalidades moleculares têm sido identificadas e agora são usadas para prever resultados e ajudar na orientação do tratamento dos pacientes com LMA. As mutações genéticas mais relevantes são em: 1) Nucleofosmina 1 (NPM1); as mutações do NPM1 resultam na expressão aberrante da proteína NPM1 no citoplasma, e não no núcleo, estimulando a proliferação mieloide e o desenvolvimento da leucemia. 2) Mutações no gene DNMT3A o qual codifica uma das enzimas responsáveis pela metilação do DNA. 3) Mutações no gene do receptor tirosina quinase 3 (FLT3) com importante regulação na sobrevivência e proliferação celular dos progenitores hematopoiéticos. 4) As mutações do gene isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e 2 são mutações de ganho de função, que produzem enzimas deficientes para sua função fisiológica. 5) Mutações em TET2 (*Ten–Eleven Translocation 2*) com papel importante na desmetilação do DNA. 6) Mutações no gene

RUNX, o fator de transcrição relacionado ao RUNX1 demonstrou ser essencial na hematopoiese normal. 7) O gene CEBPA é responsável pela codificação da proteína CEBPA que é um fator de transcrição para o processo de diferenciação e maturação dos granulócitos. 8) Mutações em ASXL1 envolvida na regulação epigenética (modificações de DNA e/ou histonas). 9) Mutações no gene MLL o qual codifica uma proteína que possui atividade de histona metiltransferase que coordena a modificação da cromatina. 10) Mutações no gene TP53 o qual codifica a proteína p53 envolvida em pontos de parada do ciclo celular como mecanismo de regulação e apoptose. 11) Mutações em KIT (receptor de tirosina quinase) participa do mecanismo de proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas 12) Mutações genéticas do fator de *splicing* e mutações em membros do complexo coesina (Cruz, 2021; Saultz; Garzon, 2016).

### 2.2.2 Diagnóstico

O diagnóstico da LMA inicia-se a partir da suspeita clínica. Os sintomas clínicos podem ser vagos e inespecíficos, como a febre, fraqueza e letargia. Outros sintomas podem ser dor óssea devido à expansão clonal na MO, hipertrofia gengival e implicações metabólicas devido ao alto catabolismo celular, como hiperuricemia, que pode levar à insuficiência renal (Figueiredo, MS; Kerbaux J; Lourenço, DM, 2011). Outros sintomas mais frequentes são: a anemia, palidez, manchas e equimoses decorrentes da diminuição da produção de glóbulos vermelhos e plaquetas; febres decorrentes da própria doença ou de infecções secundárias ocasionadas pela diminuição de glóbulos brancos; cefaleia, paralisia de nervos e vômitos, devido ao acúmulo de células leucêmicas no líquido cefalorraquidiano; alterações articulares e hipertrofia gengival (Lopes *et al.*, 2022).

Nos pacientes com a variante M3, a leucemia promielocítica aguda (LPA) caracteristicamente apresentam coagulação intravascular disseminada (CIVD) associada a eventos trombóticos e sangramentos, podendo ser fatal se for um sangramento maior ou preocupante se for um sangramento em área ou órgão crítico (Libourel; Klerk; Van Norden; De Maat *et al.*, 2016). Por isso, é vital diferenciar urgentemente a LPA dos outros subtipos de LMA (Heuser; Ofran; Boissel; Mauri *et al.*, 2020).

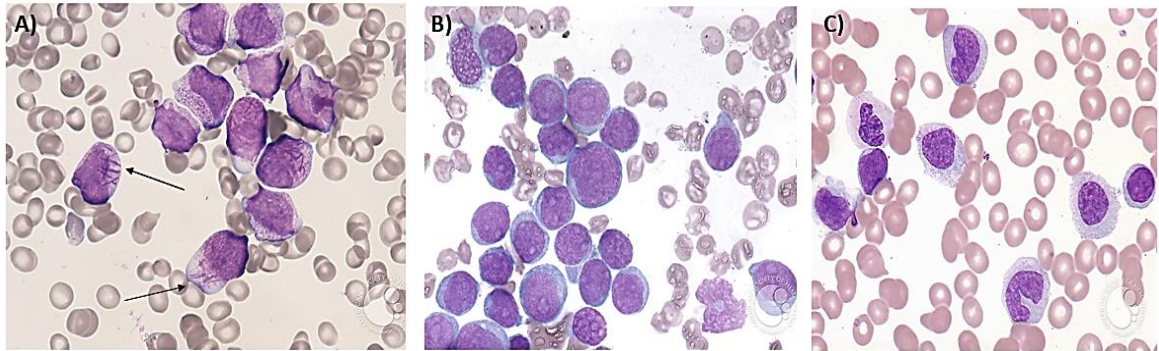
O diagnóstico laboratorial se baseia na avaliação do sangue periférico e da medula óssea, além do emprego de técnicas adicionais, incluindo imunofenotipagem, biópsia da medula óssea, avaliação citogenética (FISH), estudos de genética molecular (por reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações), tornaram-se ferramentas essenciais e obrigatórias (Silva; Pilger; Castro; Wagner, 2006). Outros exames laboratoriais também são realizados como o exame hemograma, dosagens séricas das enzimas, por exemplo a lactato desidrogenase (LDH) e o ácido úrico. Uma alta contagem de leucócitos no sangue periférico ou um nível sérico elevado de LDH no momento do diagnóstico foram associados a pior prognóstico, porém, os níveis de corte não são uniformemente definidos (Liersch; Müller-Tidow; Berdel; Krug, 2014).

Pacientes com hiperleucocitose, definida como uma contagem de leucócitos  $>100 \times 10^9/L$ , pode levar à leucostase devido à oclusão dos capilares, e, finalmente, à falência de múltiplos órgãos e morte. A lise espontânea do tumor pode ocorrer em raros casos de LMA com alta carga tumoral, dando origem a hipocalcemia, hipercalemia, hiperuricemia, hiperfosfatemia, aumento dos níveis plasmáticos de LDH e mesmo insuficiência renal. Os achados mais comuns no hemograma são anemia e trombocitopenia frequentemente presentes e a contagem de leucócitos, embora geralmente elevada, pode ser normal ou baixa. A presença de  $>20\%$  de mieloblastos no sangue periférico é a evidência de uma leucemia aguda, contudo uma contagem mais baixa de blastos não exclui esse diagnóstico (Khwaja; Bjorkholm; Gale; Levine *et al.*, 2016). Embora a LMA, seja por definição, uma neoplasia de blastos mieloides, em alguns subtipos, o fenótipo do blasto pode ser pró-monocítico/monoblástico, eritróide, ou de natureza megacarioblástica (Narayanan; Weinberg, 2020), apresentados na Figura 3.

Outros exames que visam o controle das coagulopatias, principalmente na LPA, igualmente são solicitados, como a quantificação de Dímero-D, fibrinogênio, determinação do Tempo de Protrombina e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada, objetivando manter o fibrinogênio acima de 150 mg/dL. Pacientes que apresentam sangramento ativo ou risco hemorrágico elevado (idosos, creatinina elevada e hiperleucocitose) devem ser acompanhados com maior atenção (Jácomo; Figueiredo-Pontes; Rego, 2008).



Figura 3 – Exemplos de morfologias da LMA em esfregaço de sangue periférico



**Legenda:** A) LMA promielocítica hipergranular com bastonete Auer (seta). Autor: Marco Gambassi. Ano 2011, número da imagem: 00005911. B) LMA sem diferenciação morfológica; sangue periférico (blastos não possuem grânulos azurófilos ou bastonetes de Auer. Autor: Peter Maslak. Ano: 2010, número da imagem: 00001273. C) LMA mielomonocítica, esfregaço periférico apresentando células monócitos anormais com alguns blastos. Autor: Peter Maslak. Ano: 2010, número da imagem: 00001217.

**Fonte:** Banco de Imagens ASH. Sociedade Americana de Hematologia. <https://imagebank.hematology.org/>

### 2.2.3 Prognóstico e tratamento

Os fatores de prognóstico podem ser subdivididos naqueles relacionados ao paciente como a idade e condições clínicas pré-existentes e aqueles que são relacionados à doença como a contagem de leucócitos, alterações genéticas envolvidas, leucemia secundária e a remissão completa após a primeira indução de quimioterapia (Padilha; Souza; Matos; Domino, 2015) Döhner; Weisdorf; Bloomfield, 2015; Padilha *et al.*, 2015).

A LMA tem um curso clínico agressivo, mas houve um progresso na taxa de sobrevida dos pacientes jovens e adultos especialmente na última década, com a aprovação de novos medicamentos pelo FDA (*Food and Drug Administration*) conforme estudos realizados no MD *Anderson Cancer Center*, nos EUA, ao longo de cinco décadas. Até o ano 2000 a probabilidade de sobrevivência em até 5 anos, para pacientes jovens era de 18%, aumentando para 41% no período de 2010 a 2020. Ao mesmo tempo, para os pacientes mais velhos a probabilidade de sobreviver foi 6% (até ano 2000) para 11% no período de 2010 a 2020 (Kantarjian; Kadia; Dinardo; Welch *et al.*, 2021). As taxas de cura com os protocolos atuais de tratamento, para crianças e adolescentes variam de 60% a 70% (Morais; Souza; Silva; Santiago *et al.*, 2021).

A estratégia terapêutica geralmente usada em pacientes com LMA consiste na avaliação inicial que determina se o paciente é elegível para quimioterapia de indução

intensiva. Se a remissão completa (RC) for alcançada após terapia intensiva, uma terapia pós-remissão é essencial (Döhner; Weisdorf; Bloomfield, 2015).

O tratamento da LMA envolve duas fases principais: quimioterapia inicial de indução e quimioterapia pós-remissão (consolidação). O objetivo da terapia de indução é alcançar a remissão completa preferencialmente sem doença residual mínima (DRM) mensurável. A escolha do tratamento de indução inicial depende do estado funcional do paciente, estado biológico da doença (medido por grupos de risco de prognóstico e o perfil molecular) e objetivos do paciente. As duas terapias de indução comumente usadas incluem: 1) quimioterapia citotóxica e 2) agentes hipometilantes (Pelcovits; Niroula, 2020).

Na primeira fase da terapia (fase de indução) tanto para adultos jovens (idade < 60 anos) e pacientes idosos ( $\geq 60$  anos) o regime padrão de tratamento aceito é daunorrubicina e citarabina conhecido coloquialmente como esquema “3+7” (3 dias de daunorrubicina + 7 dias de citarabina), alcançando uma remissão da doença em cerca de 65% a 85% nos pacientes mais jovens, mas em menos de 50% nos pacientes com mais de 60 anos de idade. Essa abordagem terapêutica resulta em uma sobrevida livre da doença a longo prazo de aproximadamente 30%, com mortalidade relacionada ao tratamento de 5% a 10% (Kumar, 2011). Pacientes classificados como de risco favorável levam à resposta completa da doença em 80% e naqueles, de risco intermediário e adverso em 50-60% de resposta completa (Pelcovits; Niroula, 2020). O objetivo da quimioterapia de indução é atingir a remissão morfológica completa, que é definida como: (1) <5% de blastos na amostra de aspirado de medula óssea; (2) contagem absoluta de neutrófilos  $>1.000/L$  e (3) plaquetas  $\geq 100.000/L$  (Kumar, 2011; Saultz; Garzon, 2016).

Outros medicamentos podem ser associados na quimioterapia de indução como o gentuzumabe ozogamicina (GO) que é um anticorpo monoclonal contra o CD-33 (uma proteína que é expressa em células da leucemia mieloide) e o midostaurina que é um inibidor da tirosina quinase em pacientes com uma mutação FLT3 (Pelcovits; Niroula, 2020).

Pacientes que são do grupo de risco adverso tem uma sobrevida global mediana na faixa de 12 a 18 meses. Mesmo com transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas quase metade dos pacientes têm recaída da doença. Os pacientes desse grupo são, portanto, geralmente encaminhados para ensaios clínicos, se houver disponível, devido às taxas mais baixas de sobrevida. Recentemente, duas

terapias com agentes hipometilantes, CPX351 (que é uma formulação lipossomal de citarabina e daunorrubicina) e o venetoclax (bloqueio da proteína anti-apoptótica BCL-2), têm mostrado melhores resultados do que a terapia padrão em pacientes com doença de risco adverso (Pelcovits; Niroula, 2020). Embora a quimioterapia de indução possa resultar em remissão na maioria dos pacientes com LMA, a taxa de recaída ainda é alta e varia de acordo com a idade, perfil citogenético, perfil molecular subjacente da leucemia e a quantidade de detecção da doença residual mínima (Khwaja *et al.*, 2016).

Na segunda fase do tratamento, fase de pós-remissão (ou também chamada consolidação) existem três modalidades terapêuticas que podem ser administradas nos pacientes: quimioterapia em doses convencionais, quimioterapia em altas doses de citarabina seguidas de resgate com células-tronco hematopoiéticas autólogas e o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (Helman *et al.*, 2011). Na fase de consolidação também é feito o monitoramento da doença residual mínima, com o uso de um ensaio de RT-PCR quantitativo para direcionar a terapia nesses pacientes (Döhner; Weisdorf; Bloomfield, 2015). Dos pacientes que recidivam, apenas uma pequena fração consegue uma segunda remissão bem-sucedida usando quimioterapia, por isso o transplante alogênico de células-tronco é usado com intenção curativa (Saultz; Garzon, 2016).

Como a LMA não é uma entidade única, mas sim compreende vários subtipos da doença, com diferentes prognósticos e, assim podendo ser tratada de forma eficaz com terapias seletivas e direcionadas, como por exemplo, no tratamento sem quimioterapia usado na leucemia promielocítica aguda. Na qual é usado o regime do ácido *all-trans*-retinóico (ATRA), que induz a diferenciação terminal das células mieloides seguida de apoptose das células leucêmicas e o trióxido de arsênico (ATO), produzindo taxa de cura estimada em torno de 80% na leucemia promielocítica aguda (Kantarjian; Kadia; Dinardo; Welch *et al.*, 2021). O ATO em altas doses leva à apoptose, enquanto baixas doses promovem a diferenciação celular. O tratamento com ATRA deve ser iniciado imediatamente diante da suspeita morfológica de LPA, mesmo antes da confirmação genética do diagnóstico, pois leva à melhora da coagulopatia e diminuição do risco de sangramento grave (Jácomo; Figueiredo-Pontes; Rego, 2008).

Embora a terapia por transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) reduza fortemente a recaída é assunto de debate contínuo, tanto em pacientes mais

jovens como em pacientes mais velhos, devido à necessidade de contrabalançar a morbimortalidade relacionada ao tratamento, que pode comprometer um efeito favorável na sobrevida global. O TCTH alogênico é geralmente aplicado em pacientes com LMA de risco intermediário e risco adverso, mas não é indicado para pacientes com risco favorável (Khwaja; Bjorkholm; Gale; Levine *et al.*, 2016). O uso de transplante de células-tronco hematopoiéticas é menos comum em pacientes com mais de 60 anos devido ao risco aumentado de morbidade e mortalidade relacionadas ao transplante (Kumar, 2011).

Além disso, o tratamento da LMA incluiu desde 2017, novos medicamentos aprovados pelo FDA direcionados contra mutações genéticas específicas como o midostaurina (FLT3), ivosidenib (IDH 1), enasidenib (IDH 2), gentuzumabe ozogamicina (CD33), CPX-351 (citarabina-daunorrubicina lipossomal), o venetoclax (inibidor BCL 2) e o glasdegib (bloqueador do receptor SMO), inclusive em combinações com ensaios clínicos (Kansal, 2020).

### 2.3 Metabolismo

O metabolismo consiste em uma série de reações bioquímicas que produzem ou consomem energia e ocorrem dentro das células dos organismos vivos para sustentar a vida (Deberardinis; Thompson, 2012). A completude dessas reações é chamada de metabolismo e os precursores, intermediários e produtos químicos envolvidos no metabolismo são chamados de metabólitos (Villas-Boas; Nielsen; Smedsgaard; Hansen *et al.*, 2007).

O processo do metabolismo envolve muitas vias celulares interconectadas para, em última análise, fornecer às células a energia necessária para realizar sua função. Em eucariotos, as vias metabólicas ocorrem dentro do citosol e nas mitocôndrias das células com a utilização de glicose ou de ácidos graxos proporcionando a maior parte da energia celular em animais (Judge; Dodd, 2020). De forma mais visual, o metabolismo pode ser retratado como uma máquina com engrenagens metabólicas que se entrelaçam com a atividade de genes e proteínas (Rinschen; Ivanisevic; Giera; Siuzdak, 2019).

O metabolismo pode ser dividido em catabolismo ou anabolismo. O catabolismo é a degradação de macromoléculas complexas em moléculas mais simples, como o dióxido de carbono, água e a amônia. O anabolismo são as vias

biossintéticas às quais geram complexos de macromoléculas como os ácidos nucleicos, proteínas, polissacarídeos e lipídios (Judge; Dodd, 2020).

O metabolismo é essencial para a vida, interrupções ou desregulações nos processos metabólicos podem ser prejudiciais. Perturbações metabólicas são a base de muitas doenças humanas, como nos erros inatos do metabolismo e no desenvolvimento do câncer (Judge; Dodd, 2020). A alteração do metabolismo celular é uma característica do câncer, contribuindo desde a iniciação à transformação maligna, no seu crescimento e na manutenção de tumores. A desregulação do metabolismo celular está incluída como uma marca emergente como um impulsionador da progressão do câncer (Hanahan; Weinberg, 2011).

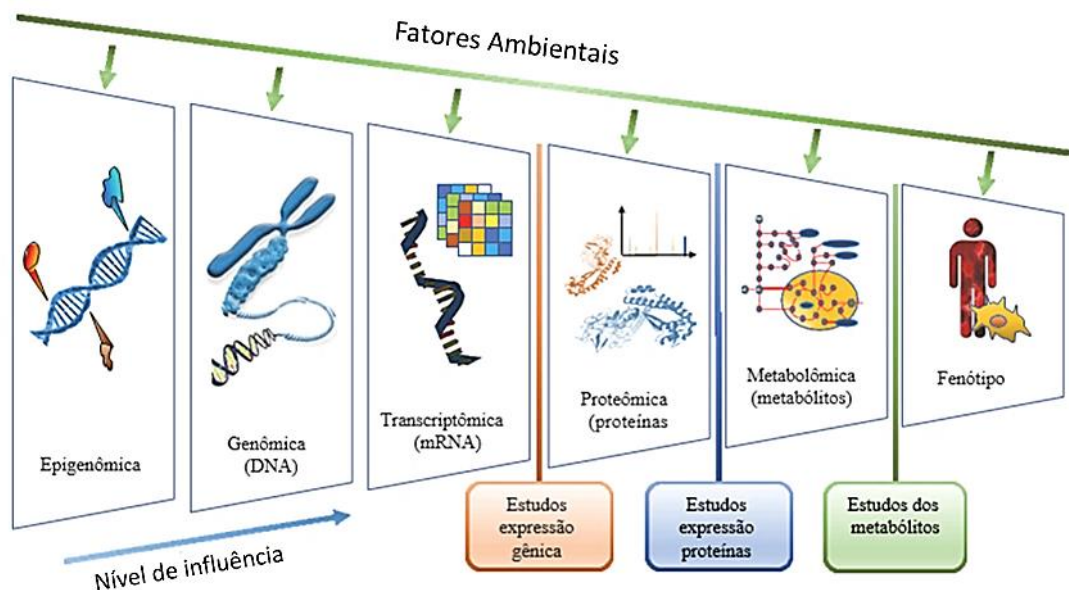
Estudos sobre uma variedade de problemas biológicos, desde o ritmo circadiano até crescimento das células cancerígenas, começaram a dar evidências de que o estado fisiológico das células e dos tecidos refletem tanto os sistemas regulatórios da célula quanto seu estado de metabolismo. Isto é, o estado regulatório de uma célula ou de um tecido, que é conduzido por fatores de transcrição e vias de sinalização, pode se impor sobre a dinâmica do estado metabólico (Mcknight, 2010).

Nos últimos anos, estudos revelaram uma série de funções para os metabólitos e vias metabólicas. Com isso, não é mais possível ver o metabolismo apenas como uma rede autorreguladora operando independentemente de outros sistemas biológicos. Em vez disso, o metabolismo impacta ou é impactado por praticamente todos os outros processos celulares. A variação metabólica também causa fenótipos humanos (Deberardinis; Thompson, 2012).

## 2.4 Metabolômica

O termo metabolômica (do inglês, *metabolomics*) foi introduzido nos anos 2.000 por Dr. Oliver Fiehn e colaboradores (Fiehn; Kopka; Dormann; Altmann *et al.*, 2000). Com objetivo de investigar o conjunto de metabólitos presentes em um sistema biológico, a metabolômica é uma nova e promissora disciplina do campo das 'ciências ômicas' na biologia dos sistemas, apresentado na Figura 4. Consiste numa abordagem analítica para detectar metabólitos e determinar suas concentrações (Liesenfeld; Habermann; Owen; Scalbert *et al.*, 2013).

Figura 4 – Organização biológica das ciências ‘ômicas’



**Legenda:** O fenótipo observável de uma célula é resultado de interações complexas e ciclos de *feedback* entre os vários níveis 'ômicos', cada um influenciado por perturbações ambientais. **Fonte:** (Angione, 2019).

Metabólitos são pequenas moléculas que têm um papel importante em sistemas biológicos e representam candidatos atraentes para entender os fenótipos das doenças. Os metabólitos representam um grupo diversificado de estruturas de baixo peso molecular (< 1500 Da), incluindo lipídios, aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, cosméticos, poluentes e outras substâncias que ingerimos, metabolizamos, catabolizamos ou entramos em contato, o que torna a análise global um desafio (Wishart; Feunang; Marcu; Guo *et al.*, 2018; Zhang; Sun; Wang; Han *et al.*, 2012). Metabólitos podem ser precursores, intermediários e produtos dos processos celulares (Duncan; Fyrestam; Lanekoff, 2019). Por isso, essas moléculas que são quimicamente transformadas durante o metabolismo fornecem uma leitura direta da atividade bioquímica do estado de uma célula (Patti; Yanes; Siuzdak, 2012).

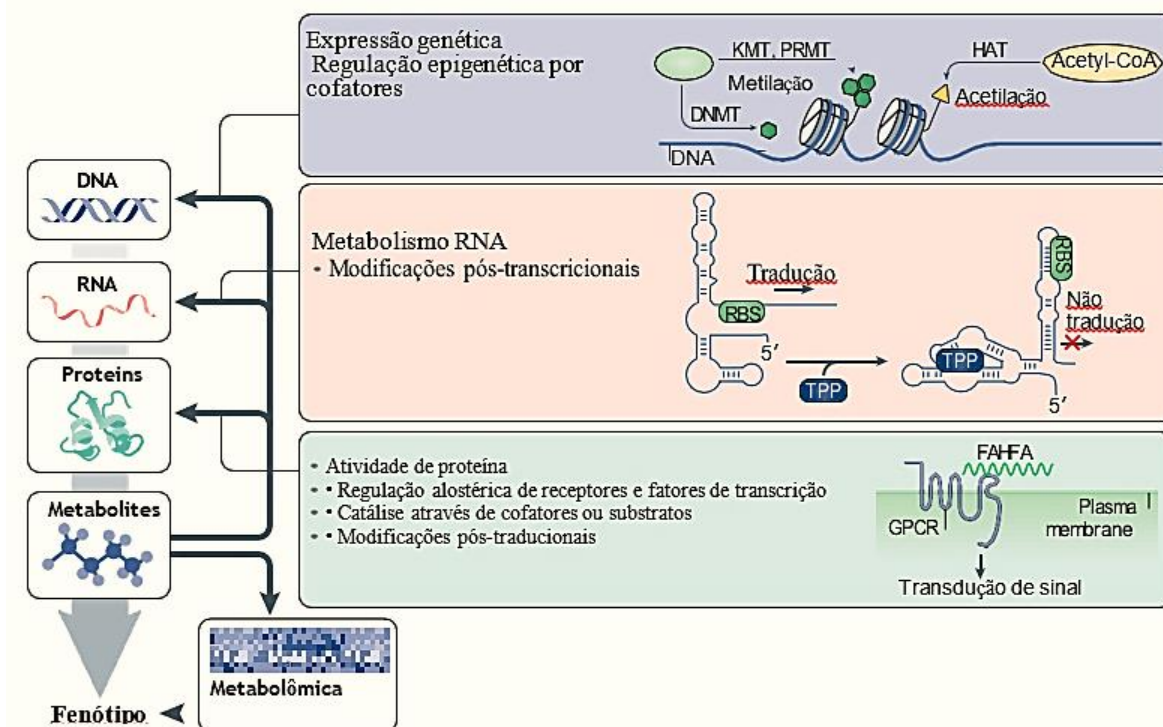
A metabolômica é uma área interdisciplinar conduzida pelas ciências da química analítica, bioquímica, estatística, quimiometria, bioinformática juntamente com epidemiologia e pesquisa clínica (Liesenfeld *et al.*, 2013). Várias áreas podem ser beneficiadas com a pesquisa metabolômica, como nas aplicações das áreas da saúde, incluindo a farmacologia, toxicologia, os erros inatos do metabolismo, a

pesquisa clínica, as pesquisas do câncer, a nutrição e na área da agricultura (Lindon; Nicholson; Holmes, 2011).

O termo '*metaboloma*' foi introduzido em 1998 em um artigo de *Oliver et al.* para indicar o conjunto dos metabólitos de um organismo. Estes metabólitos derivam da interação do genoma, do transcriptoma e do proteoma de um organismo com o meio ambiente, dando origem ao seu fenótipo (Moreira, 2015). Sendo assim, os níveis dos metabólitos podem ser considerados como a resposta final de um organismo frente aos diversos fatores do meio ambiente, modificações genéticas, alterações da microflora intestinal e alterações na atividade de enzimas. Logo, os metabólitos servem como assinaturas diretas da atividade bioquímica e, portanto, se correlacionam com o fenótipo observado (Patti; Yanes; Siuzdak, 2012; Zhang; Sun; Xu; Qiu *et al.*, 2013) Klupczynska; Derezinski; Kokot, 2015).

A análise do *metaboloma* (através da metabolômica) pode ser utilizada como uma ferramenta de identificação de biomarcadores, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos de desenvolvimento de diversos processos biológicos. O entendimento dos metabólitos principalmente como produtos da atividade de genes e proteínas foi revisado. Sua atividade regulatória de longo alcance afeta a fisiologia celular através da modulação de outros níveis 'ômicos', incluindo o genoma, epigenoma, transcriptoma e proteoma (Rinschen; Ivanisevic; Giera; Siuzdak, 2019), conforme esquematizado na Figura 5.

Figura 5 – Metabólitos como moduladores ativos da atividade de genes e proteínas



**Legenda:** Os metabólitos controlam ativamente a atividade das proteínas via regulação alostérica de receptores transmembrana e fatores de transcrição, como cofatores ou substratos enzimáticos na catálise de reações bioquímicas, via modificações pós-traducionais e como reguladores da multimerização de proteínas. Eles também influenciam o metabolismo do RNA regulando modificações pós-transcricionais. Finalmente, como cofatores e co-substratos de enzimas modificadoras da cromatina, os metabólitos estão ativamente envolvidos na regulação epigenética. Assim, por meio da triagem de atividade baseada na metabolômica, é possível revelar os papéis e mecanismos dos metabólitos na regulação de um fenótipo. DNMT (DNA metiltransferase); KMT (lisina metiltransferase); PRMT (peptidil-arginine metiltransferase); HAT (histona acetiltransferase); RBS (Sítios de ligação ao ribossomo); TPP (pirofosfato de tiamina); GPCR (receptores acoplados a proteínas G); FAHFA (ésteres de ácidos graxos ramificados de ácidos graxos hidroxilados). **Fonte:** Adaptado de (Rinschen; Ivanisevic; Giera; Siuzdak, 2019).

Nos últimos 15 anos usando abordagens *in silico*, juntamente com a ampliação das bibliotecas de dados espectrais e com o desenvolvimento de instrumentos utilizados nas análises metabolômicas, foi possível expandir o número de metabólitos humanos conhecidos. Isto é, passíveis de serem detectados e identificados com as técnicas instrumentais disponíveis e agrupá-los em bancos de dados públicos *online* como por exemplo, o denominado Human Metabolome Database (HMDB) (<https://hmdb.ca>), METLIN Metabolite and Chemical Entity Database (<https://metlin.scripps.edu>) e MassBank (<https://massbank.eu>), entre outros. No ano de 2022, a versão do HMDB 5.0 tinha 217.920 entradas de metabólitos, incluindo metabólitos endógenos, compostos derivados de alimentos, metabólitos humanos



recém-identificados, drogas recém-aprovadas e vários metabólitos microbianos ou derivados do intestino (Wishart; Guo; Oler; Wang *et al.*, 2022).

Duas abordagens analíticas podem ser utilizadas na análise metabolômica: a metabolômica alvo (do inglês, *targeted metabolomics*) e a metabolômica global (do inglês, *untargeted metabolomics*). A metabolômica alvo refere-se à detecção e quantificação precisa de um pequeno conjunto de compostos conhecidos. É direcionada para um conjunto específico de metabólitos, com uso de padrões que foram claramente identificados e estão disponíveis para processo de calibração. Enquanto a abordagem analítica global faz uma análise geral de metabólitos, não direcionada, para detectar nas amostras uma ampla gama de metabólitos, sem requerer conhecimento prévio dos compostos da investigação (Cambiaghi; Ferrario; Masseroli, 2017).

Vários tipos de amostras biológicas podem ser utilizadas nos estudos metabolômicos envolvendo humanos e animais como, soro, plasma, urina, líquido, tecidos tumorais, saliva, fezes, ar expirado e amostras de pele (Liesenfeld; Habermann; Owen; Scalbert *et al.*, 2013). Na metabolômica também podem ser utilizadas amostras de micro-organismos, como fungos e bactérias, plantas, amostras de solo, águas de rios entre outros (Belinato; Bazioli; Sussulini; Augusto *et al.*, 2019; Canuto; Costa; Cruz; Souza *et al.*, 2018).

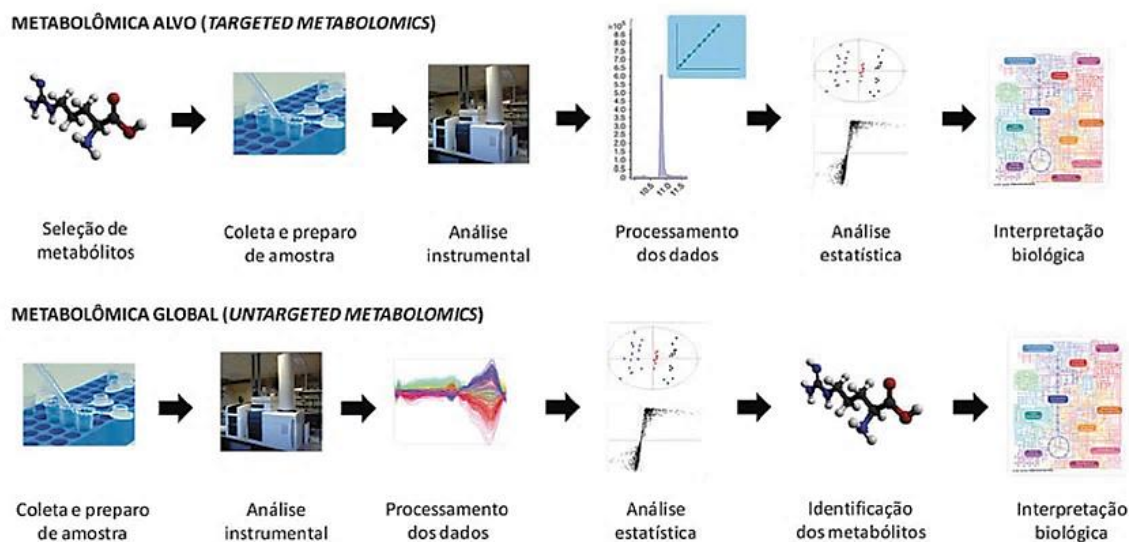
Resumidamente, o fluxo de análise da metabolômica pode ser agrupado em quatro etapas: 1) preparação da amostra, 2) aquisição dos dados utilizando diferentes técnicas analíticas 3) Processamento dos dados e 4) interpretação biológica.

O preparo da amostra é uma das etapas cruciais para análise metabolômica. O primeiro passo é a interrupção rápida do metabolismo celular, o que no inglês é chamado de “*quenching*” metabólico, a fim de garantir a representatividade do estado metabólico da amostra. Embora a meia-vida dos metabólitos extracelulares seja maior do que dos metabólitos intracelulares, é importante interromper qualquer atividade bioquímica (através da inibição de enzimas endógenas) das amostras evitando assim qualquer variação nos níveis dos metabólitos. As estratégias comuns para “*quenching*” metabólico são baseadas em modificação rápida das condições da amostra, geralmente alteração de pH ou de temperatura. Na modificação da temperatura, o “*quenching*” metabólico é realizado principalmente por resfriamento a valores geralmente inferiores a -20°C, assumindo que a integridade da amostra não é

prejudicada pelo choque frio (Villas-Bôas; Gombert, 2006; Álvarez-Sánchez; Priego-Capote; De Castro, 2010).

Para a aquisição dos dados podem ser usadas técnicas para separar e caracterizar quimicamente diversos metabólitos. Como por exemplo, técnicas de separação (cromatografia gasosa (CG); cromatografia líquida (LC), eletroforese capilar (CE)) combinadas com técnicas de detecção de compostos, como a espectrometria de massas (MS) ou ressonância magnética nuclear (RMN). No processamento dos dados os sinais brutos (cromatogramas, espectros de massas ou de RMN) são pré-processados por *softwares* específicos, podendo ser comerciais como os *Compound Discoverer®* da Thermo Scientific, *MassHunter Data Analysis* da Agilent Technologies® ou alguns disponíveis gratuitamente como XCMS Online. O pré-processamento dos dados envolve etapas como correção de tempo de retenção, redução de ruídos, detecção de pico, integração e alinhamento dos cromatogramas (Cambiaghi; Ferrario; Masseroli, 2017). Um esquema do fluxo de análise encontra-se representado na Figura 6.

Figura 6 – Fluxo de análise em metabolômica



**Legenda:** O fluxo de trabalho pode variar dependendo da abordagem (*targeted* ou *untargeted*), mas sempre apresentando etapas de preparo da amostra, aquisição dos dados, processamento dos dados e interpretação biológica. **Fonte:** (Canuto; Costa; Cruz; Souza *et al.*, 2018).

#### 2.4.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS)

Embora existam várias plataformas analíticas que possam ser usadas na metabolômica global, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

(LC-MS), especialmente no modo de fase reversa, tem sido a técnica de escolha na maioria dos estudos, pois permite a cobertura de uma ampla gama de tipos de metabólitos com alta sensibilidade (Burgos; De Macedo; Da Cruz; Júnior *et al.*, 2021).

Na cromatografia, os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de eluição entre os componentes da fase móvel. A fase estacionária em cromatografia é imobilizada em uma coluna ou sobre uma superfície plana, enquanto a fase móvel movimenta-se através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos. A fase móvel pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico (Skoog; West; Holler; Crouch, 2006). Na cromatografia líquida (LC), a fase móvel é um solvente líquido, sendo que no caso da metabolômica global normalmente são empregados metanol ou acetonitrila e água, além de aditivos voláteis, como ácido fórmico ou ácido acético (Rojo; Barbas; Rupérez, 2012). Em relação à fase estacionária, a seleção da coluna influencia na eficiência e seletividade da separação. Em estudos metabolômicos geralmente são usadas colunas de fase reversa ou colunas HILIC (*Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography* - em português, cromatografia líquida com interação hidrofílica) (Dudzik; Barbas-Bernardos; García; Barbas, 2018).

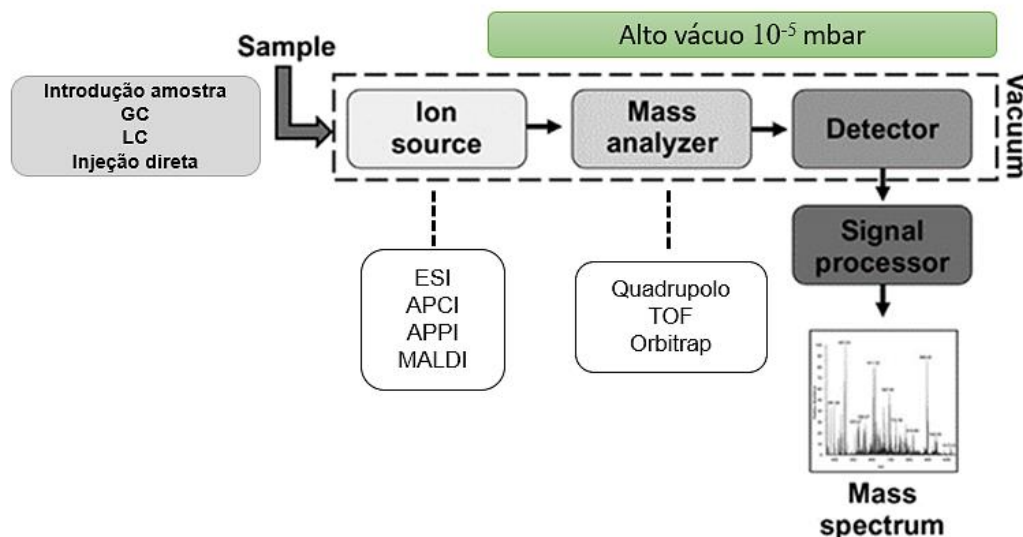
A LC é capaz de separar eficientemente compostos altamente polares (hidrofílicos), semi-polares, não voláteis e/ou termicamente instáveis. É uma técnica analítica que apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade (Lanças, 2009; Rojo; Barbas; Rupérez, 2012).

O acoplamento entre LC e MS dá origem a uma ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa, que é a LC-MS (Lanças, 2009). A LC-MS é comumente usada no campo da metabolômica, para caracterizar metabólitos endógenos, desconhecidos ou metabólitos exógenos presentes em amostras biológicas complexas (Zhang; Sun; Wang; Han *et al.*, 2012).

As análises por MS podem ser realizadas por meio de sistemas com diversas configurações de instrumentos; no entanto, a maioria dos sistemas MS compreendem quatro componentes principais: (1) uma fonte de ionização (para atribuir cargas às espécies químicas da amostra); (2) um analisador de massas (responsável pela separação dos íons com base na sua razão massa/carga ( $m/z$ )); (3) um detector (sensível aos íons que o alcançam); e (4) um processador (interface computacional que permite que o usuário interaja com o equipamento, além de

armazenar e processar os dados das análises) (Clarke; Marzinke, 2020; Segalin, 2015; Thomas, 2019), conforme esquematizado na Figura 7.

Figura 7 – Visão geral dos componentes de um instrumento de espectrometria de massas



**Legenda:** A Figura mostra exemplos de configurações de funcionamento de um espectrômetro de massas, listando alguns exemplos de entrada de amostra: GC (Cromatografia gasosa); LC (Cromatografia líquida); injeção direta. *Ion source* (fonte de ionização); Exemplos de ionização: ESI (ionização electrospray); APCI (Ionização química à pressão atmosférica); APPI (Fotoionização à pressão atmosférica); MALDI (Ionização e dessorção por laser assistida por matriz); Exemplos de analisador de massas - *mass analyzer* (analisador de massas), quadrupolo, TOF (tempo de voo); Orbitrap *Signal processor* (processador do sinal), *vacuum system* (sistema de vácuo), *mass spectrum* (espectro de massas). **Fonte:** Adaptado de Thomas (2019).

O efluente da coluna cromatográfica, após ser ionizado, é direcionado para o analisador de massas. Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão  $m/z$  e, então, detectados. Os picos cromatográficos gerados pela separação dos componentes da amostra são individualmente introduzidos na fonte de ionização do MS para gerar os íons a serem posteriormente separados no analisador de massas e encaminhados para detecção e quantificação. Um software apropriado instalado efetua os cálculos e gera os espectros de massas (Lanças, 2009). O espectro de massas será gerado a partir do sinal produzido no detector durante uma varredura em função da razão  $m/z$ . Onde no eixo x temos a relação  $m/z$  e no eixo y temos abundância (%) (Colby; Thoren, 2020).

A ionização do tipo *electrospray* (*electrospray ionization* - ESI) é a técnica de ionização mais útil para a análise de metabólitos quando combinado com separação

por LC. Vários tipos de metabólitos polares são facilmente ionizados por ESI (Mizuno *et al.*, 2017). A ESI é uma técnica de ionização branda que gera pouquíssima fragmentação. O processo de ionização ocorre à pressão atmosférica, aplicando-se uma alta diferença de potencial entre a porção terminal do capilar pelo qual flui a amostra e o dispositivo de entrada (normalmente um cone) do espectrômetro. Essa fonte de ionização pode gerar íons carregados positivamente, protonados (geralmente  $[M+H]^+$ ) ou negativamente, desprotonados (geralmente  $[M-H]^-$ ), dependendo especialmente dos grupos funcionais da molécula, do modo de análise e dos aditivos empregados. Para análises em modo positivo, isto é, que detectam espécies positivamente carregadas, emprega-se como aditivo o ácido fórmico e o ácido acético em baixas concentrações (em torno de 0,1 %). Para o modo negativo, um dos principais aditivos é o hidróxido de amônio, pois ele favorece a desprotonação dos analitos em solução (Segalin, 2015). A natureza do solvente utilizado e o pH são igualmente importantes na geração de íons positivos e negativos (Crotti; Vessecchi; Lopes; Lopes, 2006).

Nos sistemas MS nos quais o analisador de massas é do tipo Q-TOF (do inglês *quadrupole – time of flight* - analisador de massas do tipo quadrupolo e tempo de voo) esses equipamentos possuem alta resolução e sensibilidade, sua aplicação é bastante ampla, especialmente quando alta resolução é necessária. O quadrupolo é composto de quatro barras, usualmente feitas de metal dispostas em dois pares. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro a um potencial negativo. Somente os íons que apresentarem determinada  $m/z$ , a qual esteja em conformidade com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Nos analisadores de massas do tipo TOF, os íons formados na fonte de ionização são extraídos e acelerados em alta velocidade por um campo elétrico em um tubo longo denominado usualmente “*drift tube*”, após o qual atingem o detector. O princípio de operação do TOF baseia-se na medida do “tempo de voo” de um íon dentro do espectrômetro de massas, que depende da  $m/z$  do íon. O quadrupolo serve de guia para os íons no modo TOF e também para fazer experimentos de fragmentação quando o instrumento é utilizado nesse modo de aquisição de dados (Lanças, 2009; Thomas, 2019; Zhang; Sun; Wang; Han *et al.*, 2012).

A LC-MS é uma técnica analítica abrangente gerando um conjunto de dados complexo com milhares de ‘*features* metabólicos’, ou seja, picos correspondentes a íons individuais com uma relação  $m/z$  e um tempo de retenção (RT), podendo ser

detectados em amostras biológicas. Além disso, cada *feature* no conjunto de dados está associado com um valor de intensidade (ou área sob o pico), que indica sua abundância relativa na amostra (Vinaixa; Samino; Saez; Duran *et al.*, 2012). A identificação e quantificação de um “*feature* metabólico” não se traduz necessariamente em uma entidade de metabólito, devido por exemplo, à presença de isótopos, adutos, dímeros etc. (Vinaixa *et al.*, 2012).

#### 2.4.2 Processamento dos dados

Os dados gerados a partir das análises metabolômicas são abundantes e de alta complexidade e, por isso, ferramentas adequadas ao tratamento de dados devem ser empregadas a fim de evitar erros de interpretação dos resultados e manter a integridade das variações biológicas inspecionadas. Dessa maneira, um dos maiores desafios da metabolômica envolve o processamento e a análise estatística de dados, sendo necessárias amplas opções de *softwares* e estratégias para transformar dados brutos em resultados biológicos úteis. As estratégias estatísticas mais utilizadas se baseiam nas análises quimiométricas (Belinato; Bazioli; Sussulini; Augusto *et al.*, 2019; Katajamaa; Orešič, 2005).

O processamento de dados é um passo intermediário entre a aquisição direta e a análise estatística dos dados. A maioria dos *softwares* de processamento compartilham as funções gerais de detecção dos *features*, detecção e alinhamento de picos cromatográficos e preenchimento de lacunas (*gap filling*). As funções do processamento dos dados são desempenhadas automaticamente com o auxílio de diferentes *softwares* e plataformas *online*, como por exemplo o *MassProfiler* (Agilent), *XCMS-online* (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) (Smith; Want; O'maille; Abagyan *et al.*, 2006), *MZmine* (<http://sourceforge.net/projects/mzmine/>) e vários outros disponíveis (Belinato; Bazioli; Sussulini; Augusto *et al.*, 2019; Smith; Want; O'maille; Abagyan *et al.*, 2006). Outro exemplo de ferramenta que é utilizada para otimizar os parâmetros que serão utilizados no *XCMS* é o pacote do R chamado *IPO (Isotopologue Parameter Optimization)* (Libiseller; Dvorzak; Kleb; Gander *et al.*, 2015).

A Quimiometria é a aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química para extrair informações relevantes, através de métodos de análise multivariada e univariada (Ferreira, 2015), sendo um campo bem estabelecido nas

análises estatísticas dos dados ‘ômicos’ devido produção de um conjunto de dados complexos (Lindon; Nicholson; Holmes, 2011).

Nas análises multivariadas, a classificação e discriminação de entidades ou metabólitos responsáveis por diferenciar os grupos de amostras são realizadas através da avaliação da matriz de dados. Normalmente são empregados métodos não supervisionados e supervisionados (Canuto *et al.*, 2018).

O uso de métodos não supervisionados, como a análise de componentes principais (PCA - do inglês, *principal component analysis*), é útil para reconhecimento de padrões, tendências e agrupamentos das amostras podendo ser visualizados nos gráficos de *score plot*, ao passo que os gráficos de *loading plot* descrevem a influência das variáveis e a relação entre elas (Trygg; Holmes; Lundstedt, 2007). O PCA é um método baseado em uma projeção que reduz a dimensionalidade dos dados criando componentes principais (Souza; Poppi, 2012). Para os métodos supervisionados, são frequentemente utilizados a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares discriminant analysis*), e projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês, *orthogonal partial least squares discriminant analysis*) (Gromski *et al.*, 2014). Os modelos estatísticos resultantes da análise multivariada (e.g., PCA, PLS-DA e OPLS-DA) são validados utilizando parâmetros estatísticos  $R^2$  e  $Q^2$ , os quais são ferramentas importantes para avaliar o desempenho dos modelos multivariados. O parâmetro  $R^2$  indica a qualidade do ajuste do modelo. Já o parâmetro  $Q^2$  é conhecido como *goodness of prediction*, traduzido como “qualidade de predição”. Assim temos:  $R^2$  varia entre 0 e 1, em que 1 indica um modelo perfeito e 0 indica nenhum ajuste do modelo.  $Q^2$  representa um indicador de desempenho mais efetivo e útil, uma vez que estima o poder preditivo do modelo. Igualmente como  $R^2$ , o  $Q^2$  tem limite superior em 1. Dessa forma, para que um modelo seja considerado como um bom modelo estatístico, tanto  $R^2$  como  $Q^2$  devem ser altos. De forma geral,  $Q^2 > 0,5$  pode ser considerado como bom modelo (Eriksson *et al.*, 2008). Os valores usuais para  $R^2$  e  $Q^2$  obtidos em experimentos biológicos são  $Q^2 \geq 0,4$  e  $R^2 \geq 0,7$  (Jiménez-Contreras *et al.*, 2009). Já na análise estatística univariada, que avalia as variáveis separadamente e despreza as relações entre elas, os testes estatísticos frequentemente usados são ANOVA, teste t de *Student*, ou de *Mann-Whitney* (Canuto *et al.*, 2018).

Brevemente as etapas de análise univariada incluem: 1) Verificar o desempenho do controle de qualidade (QC) para eliminar os *features* moleculares que

tiveram grande variabilidade associada à aquisição dos dados (comumente aceita-se valores de coeficiente de variação,  $CV < 20\%$  nos QCs). 2) Verificar se a distribuição de dados é relativamente normal. 3) Escolher o uso de testes paramétricos ou não-paramétricos. 4) Realizar a correção de FDR (*false discovery rate*), para minimizar a ocorrência de falsos positivos por múltiplas comparações, sendo que o consenso geral aceito é 5% de FDR. 5) Calcular o *fold change* (FC), utilizando média ou mediana das áreas de pico dos grupos do estudo, dependendo do teste utilizado (paramétrico ou não-paramétrico). Há a recomendação de usar um valor de corte arbitrário de  $FC = 1,5$  que significa um mínimo de 50% de variação nos dois grupos comparados (Vinaixa *et al.*, 2012).



### 3 JUSTIFICATIVA

O acúmulo contínuo de conhecimento aumenta a esperança de que a compreensão do metabolismo dos tumores forneça novas maneiras de prever, diagnosticar e até mesmo tratar o câncer. A metabolômica está emergindo como uma ferramenta para caracterizar e analisar processos metabólicos em pacientes com câncer, fazer a estratificação de risco, identificar biomarcadores por meio da reconstrução de vias metabólicas perturbadas, como também apontar alvos viáveis para o desenvolvimento de medicamentos (Allegra; Innao; Gerace; Bianco *et al.*, 2016; Wojcicki; Kasowski; Sakamoto; Lacayo, 2020). Dessa forma, a metabolômica permite determinar a 'impressão digital química' de um organismo em determinado ponto no tempo (Cambiaghi; Ferrario; Masseroli, 2017). O metabolismo é considerado o diagnóstico do fenótipo e, portanto, um bom indicador do estado funcional de uma célula (Angione, 2019).

Várias especialidades médicas já começaram a revisar suas patologias e condições clínicas a partir de uma perspectiva da metabolômica, como por exemplo a oncologia, cardiologia, endocrinologia, neurologia, nefrologia, no transplante de órgãos e em doenças hematológicas (Allegra; Innao; Gerace; Bianco *et al.*, 2016; Liesenfeld; Habermann; Owen; Scalbert *et al.*, 2013; Varma; Oommen; Varma; Casanova *et al.*, 2018; Wishart, 2005; Zhong; Zhang; Cui, 2015). A integração de dados obtidos das ciências 'ômicas' permite a compreensão e sucessivamente a validação de biomarcadores na medicina de precisão, onde os resultados adquiridos conduzem a previsões nas análises e nos alvos terapêuticos (Angione, 2019).

Um dos estudos pioneiros de metabolômica em leucemias foi realizado por Blankenberg *et al.* (Blankenberg; Katsikis; Storrs; Beaulieu *et al.*, 1997), quando foi estimado o percentual de apoptose de linfoblastos na leucemia linfoblástica aguda por meio da técnica RMN. Estudos recentes utilizaram a metabolômica para explorar biomarcadores nas leucemias, como o estudo realizado por Musharraf *et al.* (Musharraf; Siddiqui; Shamsi; Naz, 2017) no soro de pacientes com LLA e LMA, revelando que o metabolismo dos ácidos graxos está desregulado em pacientes com leucemias agudas. Em outro estudo realizado por Piszcz *et al.* (Piszcz; Armitage; Ferrarini; Ruperez *et al.*, 2016) a metabolômica sérica revelou biomarcadores da classe das acilcarnitinas e dos ácidos graxos para diferenciação entre a forma agressiva e indolente da leucemia linfocítica crônica. Já o estudo realizado por Bai

*et al.* (Bai; Zhang; Sun; Sun *et al.*, 2014), apontou a desregulação no metabolismo de glicerofosfolipídeos em pacientes com LLA. Outro importante estudo foi realizado por *Wen-Lian Chen et al.* (Chen; Wang; Zhao; Xu *et al.*, 2014), o qual identificou um painel de 6 metabólitos biomarcadores envolvidos no metabolismo da glicose e com valor no prognóstico dos pacientes de LMA com citogenética normal. Entre esses 6 metabólitos, glicerol-3-fosfato, lactato e citrato estavam diminuídos, enquanto piruvato, 2-oxoglutarato e 2-hidroxiglutarato estavam aumentados no soro de LMA em comparação com o grupo controle. E por fim, o uso da metabolômica tem levado a avanços no desenvolvimento terapêutico da LMA, como o uso dos inibidores de Isocitrato Desidrogenase (IDH) *enasidenib* e *ivosidenib*, fornecendo prova de recentes trabalhos que exploram as vulnerabilidades metabólicas das células cancerígenas (Wojcicki; Kasowski; Sakamoto; Lacayo, 2020).

Diante do exposto, a utilização da metabolômica, pode ser útil para a compreensão das vias bioquímicas relacionadas às leucemias. No futuro, esses padrões metabólicos podem informar o desenvolvimento de biomarcadores não invasivos e atuar como modelos para o diagnóstico precoce, melhorar a detecção de pacientes com recaída e identificar pacientes com maior probabilidade de responder ao tratamento.

### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi caracterizar, por meio de uma abordagem analítica da metabolômica global, diferenças nas assinaturas metabólicas dos pacientes com as leucemias agudas estudadas em relação ao grupo controle.

#### 3.1.1 Objetivos específicos

I) Identificar padrões metabólicos diferenciadores entre os grupos: LLA vs. grupo controle; LMA vs. grupo controle, como também entre os dois grupos das leucemias agudas (LLA vs. LMA).

II) Buscar a sua identidade molecular.

III) Relacionar os metabólitos apontados com as vias biológicas envolvidas na leucemogênese ou nas vias do câncer.

IV) Realizar avaliação longitudinal prospectiva dos metabólitos encontrados em diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2, T3) para os dois grupos de pacientes estudados (LLA e LMA).

### 3.2 Materiais e métodos

Este estudo está vinculado ao projeto de pesquisa intitulado “Análise celular, molecular e plasmática, de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação em vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias mieloides, linfoides e mielodisplasia”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP, Projeto CAAE Nº 02177612.0.0000.5149. Em anexo constam a carta de aprovação do comitê de ética (ANEXO A) e carta de acesso à dados clínicos em formato eletrônico para fins de pesquisa (ANEXO B).

Foi obtido a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO C) de todos os participantes do estudo após o devido esclarecimento dos objetivos propostos pela pesquisa, enfatizando a participação voluntária, gratuita e a livre decisão de interromperem a participação no estudo.

O presente estudo é composto por duas fases de análise:

1) Estudo do tipo comparativo (caso-controle), no qual a comparação se faz entre o grupo doente (LLA e LMA) e um grupo controle (sem as doenças estudadas).

2) Estudo longitudinal no qual a coleta dos dados é feita em determinado tempo. O corte no tempo (T0) foi considerado o momento do diagnóstico da doença. Seguido pelas coletas das amostras nos tempos T1, T2 e T3 que correspondem à aproximadamente 7, 14, 21 dias respectivamente, após diagnóstico (T0).

As análises instrumentais deste estudo foram realizadas no Laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria do Professor Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira na Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

#### 3.2.1 Delineamento experimental

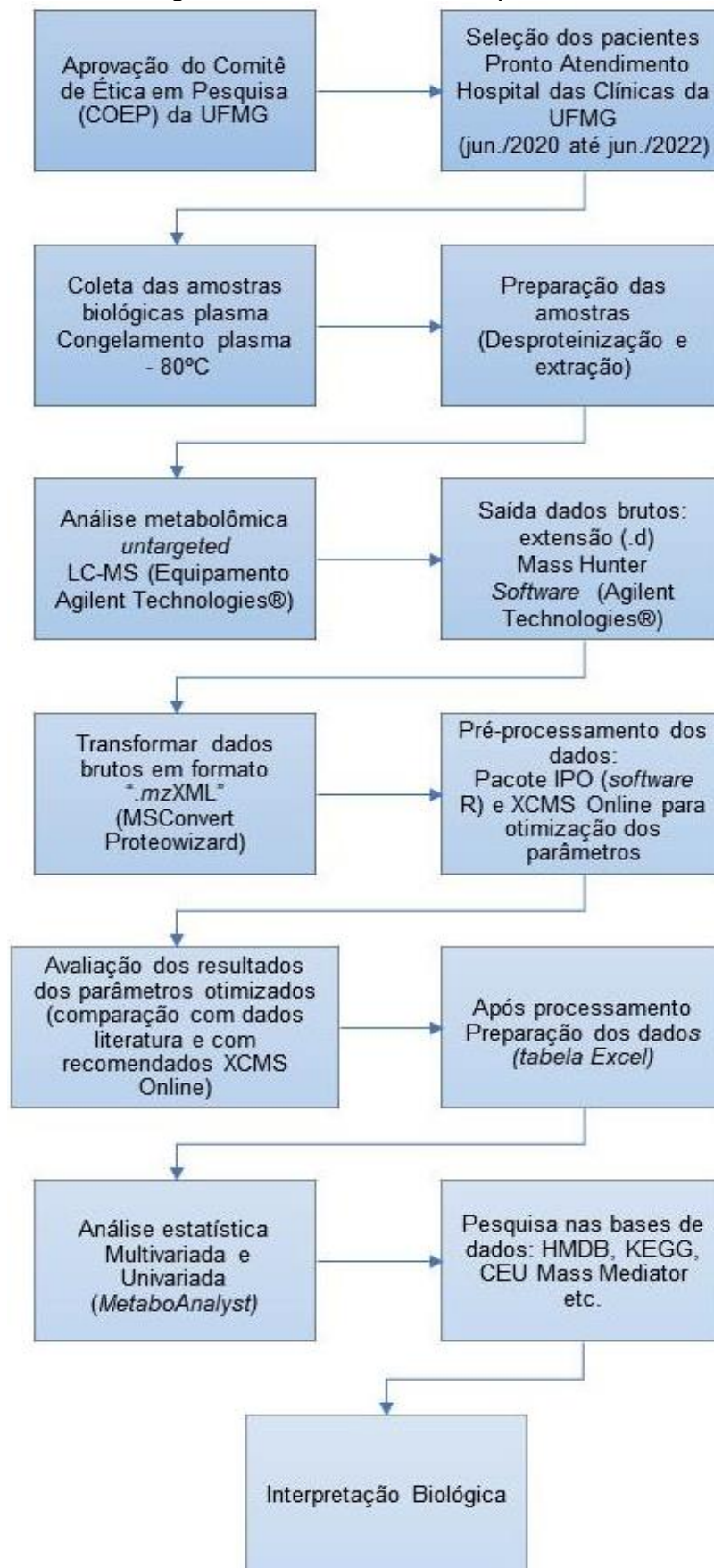
Para um melhor entendimento, encontra-se abaixo um fluxograma apresentando as etapas do presente estudo, Figura 8.

### 3.2.2 Critérios de inclusão/exclusão

Os critérios de inclusão dos pacientes com LLA e LMA neste estudo foram ter o diagnóstico confirmado tanto laboratorialmente (hemograma e imunofenotipagem), como pela avaliação clínica, para as respectivas doenças estudadas, pelos médicos hematologistas do Serviço Hematológico do Hospital das Clínicas da UFMG. Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outros distúrbios linfoproliferativos como leucemia prolinfocítica, leucemia de células pilosas, linfoma esplênico com linfócitos pilosos, leucemia plasmocítica, além dos linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Estes dados foram obtidos a partir da consulta aos prontuários dos pacientes.

Os critérios de inclusão dos indivíduos que compõem o grupo controle foram: ser voluntários, saudáveis, ter ausência de câncer (qualquer tipo), não ter histórico pregresso das doenças estudadas, como também não apresentar sintomas de infecção aguda ou outros sintomas gerais inespecíficos como febre, calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza e fraqueza no momento da coleta.

Figura 8 – Delineamento experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.3 População estudada

A população estudada foi composta por 27 indivíduos pertencentes ao grupo doente com LLA e 26 indivíduos do grupo doente com LMA, selecionados a partir da confirmação do diagnóstico clínico e laboratorial.

A faixa etária dos pacientes com LLA foi de zero a 67 anos (média = 15 anos e mediana = 12 anos), 18 homens e 09 mulheres. Os subtipos com LLA obtidos a partir da classificação da imunofenotipagem foram: subtipo LLA-B (n=24); e subtipo LLA-T (n=3).

Para o grupo dos pacientes com LMA, a faixa etária foi de um até 85 anos (média = 42 anos e mediana = 38 anos), 11 homens e 15 mulheres. Os subtipos classificados segundo resultado da imunofenotipagem foram: M0=02; M1=01; M2=05; M3 (LPA)=06; M4=02; M5=09; e M7=01.

Os 32 indivíduos participantes do grupo controle foram voluntários com faixa etária de 16 até 66 anos (média e mediana = 40 anos), 12 homens e 20 mulheres. Os participantes do grupo controle foram, na sua grande maioria, trabalhadores da área da saúde do Hospital das Clínicas da UFMG o resumo da população estudada apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Resumo da população estudada

| Grupo                | n  | sexo         | Faixa etária (anos) | Mediana (anos) |
|----------------------|----|--------------|---------------------|----------------|
| LLA*                 |    |              |                     |                |
| Subtipos:            |    |              |                     |                |
| LLA-B=24             | 27 | 18 M         | 00 a 67             | 12             |
| LLA-T=03             |    | 09 F         |                     |                |
|                      |    |              |                     | (7- 20)        |
| LMA**                |    |              |                     |                |
| Subtipos:            |    |              |                     |                |
| LMA M0 =02           | 26 | 11 M<br>15 F | 00 a 85             | 38             |
| LMA-M1 =01           |    |              |                     |                |
| LMA-M2 =05           |    |              |                     |                |
| LMA-M3= 06           |    |              |                     |                |
| LMA-M4= 02           |    |              |                     |                |
| LMA-M5= 09           |    |              |                     |                |
| LMA-M7= 01           |    |              |                     |                |
|                      |    |              |                     | (22-66)        |
| Indivíduos controles | 32 | 12 M<br>20 F | 16 a 66             | 40             |
|                      |    |              |                     | (33-45)        |

**Legenda:** teste Qui-quadrado \*valor-p<0,02 para idade entre grupo LLA vs. grupo controle. \*\*valor-p 0,56 para idade entre grupo LMA vs. grupo controle. M(masculino), F(feminino). Mediana idade representada no intervalo percentil 25 e 75. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2.3.1 Protocolo do tratamento

Tratamento da LLA, conforme protocolo setorial do HC-UFMG nº 274 1ª Versão: junho de 2021. A partir dos resultados dos exames laboratoriais como por exemplo, valor da global de leucócitos, contagem de blastos, marcadores de citogenética e biologia molecular (BCR/ABL, MLL-AF4, ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1) e a idade do paciente é feita a estratificação do grupo de risco (baixo risco, risco intermediário e alto risco). Alguns exemplos das principais drogas utilizadas em pacientes de baixo risco são: Fase de indução prednisona, vincristina, daunoblastina, L-asparaginase. Na fase de intensificação: ciclofosfamida, citarabina, 6-mercaptopurina. Fase de consolidação: 6-mercaptopurina, metotrexate, leucovorin. O tratamento total compreende 104 semanas.

As principais drogas utilizadas para a LMA: Fase indução metotrexate, citarabina, tioguanina, etoposida e doxorrubicina. Para a LMA-M3, na fase de indução ATRA (ácido all-trans-retinóico) e daunoblastina.

### 3.2.4 Coleta das amostras

As amostras biológicas de pacientes participantes desse estudo foram coletadas entre junho de 2020 até junho de 2022. Foram coletadas do mesmo paciente, amostras seriadas de sangue periférico durante um período de tempo (~3 semanas). No qual foi considerado o ponto T0 amostra colhida no diagnóstico da doença, T1 (~7 dias após diagnóstico), T2 (~14 dias após diagnóstico) e T3 (~21 após diagnóstico), para ambas as doenças estudadas. O número de amostras obtidas para cada tempo e para cada doença está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 – Período e número de amostras coletas para cada doença

| Período          | LLA | LMA | Total |
|------------------|-----|-----|-------|
| T0 (diagnóstico) | 27  | 26  | 53    |
| T1 (~ 7 dias)    | 21  | 19  | 40    |
| T2 (~14 dias)    | 20  | 18  | 38    |
| T3 (~ 21 dias)   | 17  | 14  | 31    |

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Não foi possível conseguir o mesmo número de amostras para todos os tempos de cada doença, devido algumas circunstâncias, como: em razão da pandemia alguns pacientes não permaneceram hospitalizados durante todo tratamento, alguns tiveram intercorrências graves no qual o acesso venoso foi prejudicado, outros estavam em unidade de tratamento intensivo, quando o volume de amostra biológica coletada foi de favorecimento para o exame hemograma em detrimento para a alíquota da pesquisa e alguns foram à óbito.

#### Coleta do Sangue:

As amostras de sangue venoso foram coletadas com sistema VACUETTE® (Greiner Bio-One), sendo 4,0 mL (adultos) e 0,5 mL (crianças) em EDTA K3. As amostras foram coletadas com tempo de jejum variado em função da dinâmica do horário de alimentação dos pacientes dentro do ambiente hospitalar. As amostras de sangue foram centrifugadas a 1000g, por 10 minutos à temperatura ambiente para retirada do plasma sobrenadante. Alíquotas de 200 µL foram congeladas em tubo do tipo eppendorf durante uma semana em freezer -20°C e posteriormente, transferidas para um freezer -80°C até o momento do seu processamento.

#### 3.2.5 Reagentes químicos e consumíveis

- Metanol (álcool metílico absoluto HPLC, BIOGRADE®).
- Etanol grade gradiente LiChrosolv® (Merck®).
- Acetonitrila HPLC-S (hypergrade for LC-MS LiChrosolv®, Merck®)
- Ácido fórmico para LC-MS LiChropur® (Merck®)
- Padrão interno (F-Phe: *p*-Fluoro-*DL*-phenylalanine Sigma-Aldrich®), 240 mg/L em metanol
- Água ultrapura Tipo I (Ultra Purificador de água Master System MS3000-Gehaka®).
- Vials de vidro, fechamento com rosca 9-425, 12 x 32 mm, 2 mL, transparente, sem tarja (Chromastore Comércio e Importação Ltda).
- Insert de vidro, volume 150 µL, fundo cônico, com mola de polipropileno (Analítica).
- Coluna cromatográfica: Kinetex® 5 µm F5 100 Å, 150 x 4,6 mm (modo separação fase reserva).



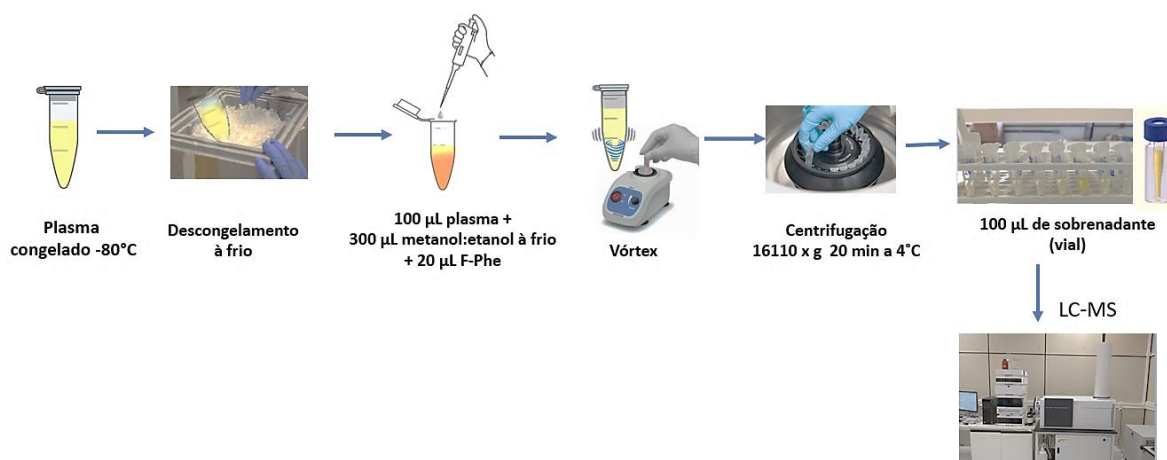
### 3.2.6 Preparo das amostras

Foi utilizado o protocolo de preparo de amostras, conforme reportado por Delgado *et al.* (Delgado-Dolset; Obeso; Rodríguez-Coira; Tarin *et al.*, 2022).

Primeiramente, as amostras foram descongeladas à frio (em banho de gelo) por aproximadamente 2 horas. Após completo descongelamento, foram homogeneizadas em agitador vórtex. Em um tubo do tipo eppendorf foi colocado 100  $\mu$ L de plasma com 300  $\mu$ L de metanol:etanol (1:1, v/v) à frio (-20°C) e 20  $\mu$ L do padrão interno. O padrão interno utilizado foi a F-Phe, que foi adicionada em cada amostra na mesma concentração para monitorar variações durante a análise, incluindo a etapa de preparo da amostra. Em seguida, as amostras foram misturadas em vórtex (30 segundos), mantidas em gelo por 5 minutos e centrifugadas a 16110 x g por 20 min a 4°C. Após a centrifugação foi transferido 100  $\mu$ L de sobrenadante para *insert*, dentro do *vial*, fechado com tampa de rosca e mantidas congeladas a -80°C até o momento da realização da análise no LC-MS.

O preparo e análise das amostras foram realizados em ordem aleatória, conforme definido pela função de geração de números aleatórios no Excel (Microsoft Office 365), com objetivo de não dar preferência ou escolha intencional em nenhuma amostra na hora do preparo e na sua análise instrumental. O fluxograma de trabalho da etapa de preparo de amostra está representado na Figura 9.

Figura 9 – Fluxo de trabalho da etapa de preparo das amostras de plasma



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.2.7 Preparo do branco e dos controles de qualidade (QC)

Para preparar o branco foi utilizado 100 µL água ultrapura com 300 µL metanol:etanol (1:1, v/v) à frio (-20°C) e 20 µL do padrão interno (F-Phe). Um *pool* de todas as amostras reunindo volumes iguais (5 µL) de plasma foi feito com a finalidade de preparar alíquotas do controle de qualidade (QC). As amostras dos QC foram preparadas igualmente como a dos pacientes. O objetivo de preparar os QC foi para medir a estabilidade e desempenho analítico do sistema durante todas as corridas.

### 3.3 Análise instrumental

As amostras de plasma foram analisadas usando um sistema Agilent HPLC (série 1260 *Infinity* II) acoplado a um sistema analisador de massas tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-ToF - MS 6530) (Agilent Technologies®), equipado com uma fonte de íons do tipo *electrospray* de jato duplo (dual AJS ESI) com tecnologia de funil de íons (Agilent Technologies®, EUA).

Para a separação cromatográfica, foi injetado 8 µL de cada amostra na coluna de fase reversa Kinetex® 5 µm F5 100 Å, 150 x 4.6 mm, Phenomenex Inc., EUA), a 40°C com eluição gradiente. A taxa de fluxo foi ajustada em 0,6 mL/min, com parada da corrida em 24 min. O gradiente de eluição envolveu uma fase móvel consistindo numa mistura das soluções: (A) água com 0,1% v/v de ácido fórmico e (B) acetonitrila com 0,1% v/v de ácido fórmico. O gradiente utilizado na separação cromatográfica encontra-se descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Programação da eluição gradiente utilizada na separação cromatográfica

| <b>Tempo<br/>(minutos)</b> | <b>% Fase A</b> | <b>% Fase B</b> |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| 0,00 min                   | 99,0            | 1,0             |
| 15,00 min                  | 1,0             | 99,0            |
| 19,00 min                  | 1,0             | 99,0            |
| 19,50 min                  | 99,0            | 1,0             |
| 24,00 min                  | 99,0            | 1,0             |

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

As amostras foram analisadas nos modos positivo e negativo em injeções separadas, para cobrir metabólitos catiônicos e aniônicos.

A voltagem do capilar ( $V_{cap}$ ) foi ajustada em 3500 V para ESI (+) e 4000 V para ESI (-), a voltagem *nozzle* foi ajustada para 500 V no modo negativo. A vazão do gás de secagem ( $N_2$ ) foi de 10 L/min a 330°C e o nebulizador de gás a 50 psi; a voltagem do fragmentador foi de 175 V. As voltagens de radiofrequência do *skimmer* e *octopole* foram ajustadas para 65 e 750 V, respectivamente. Os espectros de MS foram coletados no modo centroide a uma taxa de varredura de 1,2 Hz. A janela de detecção de MS foi realizada em varredura íons (*full scan*) na faixa entre 50 a 1500  $m/z$  para ambos os modos.

O espectrômetro de massas sistema Q-TOF foi calibrado usando soluções calibrantes de acordo com as especificações do fabricante. As massas de referência para ESI (-) foram  $m/z = 68.99575800 / 112.98558700 / 119.03632000 / 301.99813900$  e para ESI (+) foram  $m/z = 121.05087300 / 922.00979800$ .

Com objetivo de medir a estabilidade do sistema analítico ao longo da sequência analítica (modos positivo e negativo), as alíquotas de QCs foram injetadas a cada 10 amostras. A sequência analítica para cada modo de aquisição foi de 243 injeções, incluindo: 02 amostras branco (início e no final); 32 QCs (injetados no início da sequência e após cada 10 amostras do estudo); 177 injeções referentes ao grupo doente (LLA e LMA nos seus respectivos tempos de coleta) e 32 corridas referentes ao grupo controle. O controle do sistema LC-MS e a aquisição de dados foram realizados usando o software Mass HunterMassHunter Workstation (versão B.07.01, Agilent Tecnologias, 2014)

### 3.4 Processamento dos dados e análises estatísticas

Os dados de LC-MS utilizados foram previamente convertidos ao formato .mzXML com o software MSConvert (Chambers; Maclean; Burke; Amodéi *et al.*, 2012), antes de serem submetidos ao processamento de dados. Foi realizada a otimização dos parâmetros (detecção dos *features*, agrupamento e alinhamento de tempos de retenção) através do pacote IPO (software estatístico R® versão 4.2.1).

Esses arquivos .mzXML foram então importados para a plataforma XCMS Online, para detecção de picos, agrupamento e alinhamento de tempos de retenção (Smith; Want; O'maille; Abagyan *et al.*, 2006), utilizando os parâmetros otimizados no

pacote IPO, a fim de obter a matriz de dados a ser utilizada na análise estatística. Os parâmetros utilizados no pré-processamento para identificar os *molecular features* por LC-MS no plasma foram os seguintes: 1) Modo de aquisição negativo: detecção de *features*: método: *centwave*, ppm = 48; *peakwidth* = 9 a 106; *prefilter peaks* = 3, *prefilter intensity* = 100, *noise* = 0. Correção do tempo de retenção: método *obiwarp*; alinhamento: bw = 1; *mzwid* = 0.04; *minfrac* = 1,0; 2) Modo de aquisição positivo: detecção de *features*: método: *centwave*, ppm = 40; *snthresh* = 10, *peakwidth* = 10.4 a 94.6; *mzwid* = -0.045, *prefilter peaks* = 3; *prefilter intensity* = 270; *noise* = 0. Correção do tempo de retenção: método *obiwarp*; alinhamento: bw = 1; *mzwid* = 0.04; *minfrac* = 1,0.

A matriz de dados obtida foi submetida a análises estatísticas multivariadas e univariada com auxílio da plataforma MetaboAnalyst® versão 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>).

Inicialmente os dados foram submetidos à análise estatística multivariada, por meio de métodos quimiométricos não supervisionados como PCA e métodos supervisionados como PLS-DA e OPLS-DA. Posteriormente foi realizada análise univariada por teste *t de Student* e *fold-change*, combinados através do gráfico de *Volcano*. A análise de *cluster* foi realizada através do agrupamento hierárquico do *heatmap*. Foram selecionados os *features* moleculares discriminantes entre os grupos utilizando a classificação de *Variable Importance Projection* (VIP) e *Volcano plot*.

Para analisar as variáveis quantitativas, obtidas a partir do exame hemograma e das dosagens séricas dos parâmetros bioquímicos, na sua distribuição de normalidade (teste Anderson-Darling; teste Shapiro-Wilk; teste Kolmogorov-Smirnov) e análise descritiva (média, mediana, amplitude, ANOVA, teste Kruskal-Wallis e Teste de Dunn) foi utilizado o *software* Graphpad Prism® versão 9.0.0.

### 3.5 Identificação das entidades moleculares

A anotação da identidade dos *features* foi construída através da busca do *m/z* na base de dados da ferramenta online CEU Mass Mediator (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) juntamente com a plausibilidade biológica e sua distribuição isotópica (Agilent MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis version 10.0). Outras plataformas de busca também foram utilizadas como o HMDB

(<https://hmdb.ca>); PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes- <https://www.genome.jp/kegg/>).

Para considerar os metabólitos como isótopos foi realizado teste de correlação de *Pearson* entre as intensidades dos *features*, através da ferramenta no Excel (Microsoft Office 365). Foi considerado como forte correlação quando o valor do coeficiente de correlação linear fosse  $R^2 > 0,90$ , avaliado através do gráfico de dispersão.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características laboratoriais da população de estudo

Com o objetivo de comparar o comportamento das variáveis (parâmetros do exame hemograma e dos exames bioquímicos) ao longo do tempo como também estudar a correlação com os *features* discriminadores obtidos do LC-MS, foi feita a análise dos dados de cada grupo estudado (LLA e LMA), com seus respectivos tempos de coleta. Os resultados do exame hemograma e dos exames bioquímicos, foram obtidos através da consulta ao prontuário do paciente. As dosagens séricas avaliadas do perfil renal foram: ureia, creatinina e ácido úrico; do perfil hepático: ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); fosfatase alcalina e GGT (gama-glutamil transferase) e a LDH (desidrogenase láctica) para avaliar dano celular.

#### 4.1.1 Características laboratoriais do grupo LLA

As comparações realizadas para os parâmetros do exame hemograma mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre os tempos avaliados (T0, T1, T2, T3) para os parâmetros: global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e blastos, conforme apresentado na Tabela 4. Essa diferença é mais observada quando comparado o T0 (diagnóstico) com os demais tempos (T0 vs. T1; T0 vs. T2; T0 vs. T3) e pode ser explicada em função do tratamento de quimioterapia na qual a fase de indução visa eliminar o maior número possível de células neoplásicas e, portanto, esperado a diminuição no valor desses parâmetros.

Tabela 4 – Comparação das variáveis do exame hemograma do grupo LLA

| Parâmetros                                      | T0                      | T1                     | T2                      | T3                    | Valor-p             |
|-------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|---------------------|
| Global de leucócitos<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) | 80,21<br>(10,52-197,00) | 2,90<br>(1,48 -5,21)   | 1,36<br>(0,88 - 2,87)   | 2,20<br>(0,80 - 3,47) | < 0,05 <sup>a</sup> |
| Neutrófilos<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)          | 3,33<br>(0,80 - 8,82)   | 0,87<br>(0,41-1,52)    | 0,53<br>(0,32 - 1,09)   | 0,81<br>(0,47 - 1,92) | < 0,05 <sup>b</sup> |
| Linfócitos<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)           | 4,92<br>(2,56 - 9,00)   | 1,03<br>(0,69 - 3,16)  | 0,66<br>(0,38 - 1,18)   | 0,72<br>(0,51-1,51)   | < 0,05 <sup>c</sup> |
| Blastos<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL)              | 54,54<br>(7,93 -157,80) | 2,18<br>(0,28 - 24,86) | 19,87<br>(0,11 - 39,63) | -                     | <0,05 <sup>d</sup>  |
| Hemácias<br>(x 10 <sup>6</sup> /μL)             | 2,82 ± 0,81             | 2,93 ± 0,52            | 2,88 ± 0,31             | 2,76 ± 0,39           | (ns) <sup>e</sup>   |

|                                      |                       |                       |                       |                       |                   |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|
| Hemoglobina (g/dL)                   | 8,47 ± 2,22           | 8,42 ± 1,44           | 8,47 ± 1,12           | 8,33± 1,15            | (ns) <sup>e</sup> |
| Hematócrito (%)                      | 24,1<br>(18,3 - 29,0) | 24,8<br>(22,0 - 28,9) | 25,7<br>(22,8 - 27,2) | 24,2<br>(22,9 - 26,9) | (ns) <sup>e</sup> |
| Plaquetas<br>(x 10 <sup>3</sup> /μL) | 46<br>(31 - 91)       | 49<br>(19 - 119)      | 105<br>(43 -149)      | 91<br>(30 -214)       | (ns) <sup>d</sup> |

**Legenda:** Os valores entre parênteses são amplitude percentil 25% a 75% da mediana; valor sem parênteses são as médias ± SD. <sup>a,b,c,d</sup> Teste de Dunn, estatisticamente significativo com valor-p<0,05.

<sup>a</sup> T0 vs. T1; T0 vs. T2; T0 vs. T3; <sup>b</sup> T0 vs. T2; <sup>c</sup> T0 vs. T1; T0 vs. T2; T0 vs. T3; <sup>d</sup> T0 vs. T1. <sup>e</sup> Teste ANOVA (ns) não significativo; (-) não constam dados. **Fonte:** Dados da consulta ao prontuário do paciente, elaborado pelo autor.

A diminuição dos valores da global de leucócitos, neutrófilos, linfócitos e blastos é esperado em função da quimioterapia. Podemos observar que no T3 (~ 21 dias) a contagem das células blásticas não aparece no exame hemograma, sinalizando sucesso na primeira etapa do tratamento (fase de indução) a qual visa eliminar o maior número possível de células neoplásicas presentes. A duração da fase de indução tem duração de 4 semanas conforme protocolo do GBTLI = Grupo Brasileiro de Tratamento da Leucemia na Infância (Cazé; Bueno; Santos, 2010). Na análise do parâmetro contagem de neutrófilos, os pacientes do estudo apresentaram valores próximos de neutropenia, principalmente nos tempos (T1, T2 e T3). Neutropenia é definida com uma contagem de neutrófilos <500/mm<sup>3</sup> ou se estiver entre 500 e 1.000/mm<sup>3</sup> com tendência à queda, sendo uma complicação significativa e com risco de vida, principalmente quando for acompanhada de febre. O tratamento da neutropenia febril que é uma emergência oncológica com terapia precoce e eficiente diminui significativamente a morbidade e mortalidade (Özdemir; Tüysüz; Çelik; Yantrı *et al.*, 2016).

Em relação ao comportamento dos exames bioquímicos para o grupo LLA foi verificado que houve mudança estatisticamente significativa (p<0,05) para os analitos: ácido úrico, LDH, ALT, AST e a fosfatase alcalina, especialmente quando comprado o T0 vs. T1; T0 vs. T2; T0 vs. T3, conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação das dosagens séricas do grupo LLA

| Analito Bioquímico    | T0                  | T1                  | T2                  | T3                  | Valor-p |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------|
| Uréia<br>(mg/dL)      | 28<br>(19-36)       | 31<br>(24-44)       | 35<br>(27-58)       | 39<br>(33-50)       | (ns)*   |
| Creatinina<br>(mg/dL) | 0,61<br>(0,47-0,81) | 0,58<br>(0,30-0,70) | 0,56<br>(0,38-0,68) | 0,38<br>(0,35-0,63) | (ns)*   |

|                          |                    |                   |                  |                  |                      |
|--------------------------|--------------------|-------------------|------------------|------------------|----------------------|
| Ácido úrico (mg/dL)      | 5,2<br>(3,9-7,7)   | 2,3<br>(1,5-3,1)  | 2,6<br>(1,9-4,1) | 2,0<br>(1,7-2,8) | <0,05 <sup>a</sup>   |
| LDH (U/L)                | 1707<br>(657-3598) | 461<br>(284-1331) | –                | –                | 0,0209 <sup>**</sup> |
| ALT (U/L)                | 19<br>(14-45)      | 58<br>(30-69)     | 54<br>(33-120)   | 62<br>(34-91)    | <0,05 <sup>a</sup>   |
| AST (U/L)                | 43<br>(34-74)      | 40<br>(26-50)     | 32<br>(23-41)    | 24<br>(18-39)    | <0,05 <sup>b</sup>   |
| Fosfatase Alcalina (U/L) | 151<br>(96-298)    | 102<br>(94-157)   | 97<br>(63-137)   | 79<br>(57-110)   | <0,05 <sup>b</sup>   |
| GGT (U/L)                | 50<br>(26-142)     | 60<br>(28-95)     | 57<br>(39-66)    | 74<br>(49-102)   | (ns) <sup>*</sup>    |

**Legenda:** Os valores entre parênteses são amplitude percentil 25% a 75% da mediana. \*Teste Kruskal-Wallis e Teste Dunn; estatisticamente não significativo (ns). \*\* Teste Kruskal-Wallis estatisticamente significativo valor-p <0.05. <sup>a, b, c</sup> Teste de Dunn, estatisticamente significativo valor-p <0,05: <sup>a</sup>T0 vs. T1; T0 vs. T2; T02; T0 vs. T3; <sup>b</sup> T0 vs. T3. <sup>c</sup> T0 vs. T3. (-) não constam dados. **Fonte:** Dados da consulta ao prontuário do paciente, elaborado pelo autor.

O ácido úrico é produzido principalmente no fígado e é o produto final do metabolismo das purinas. Células malignas contêm uma carga pesada de produtos de ácido nucléico por causa de sua alta atividade celular e duplicação. A liberação no espaço intracelular de purinas dos ácidos nucléicos e sua subsequente transformação em ácido úrico levarão à quadro de hiperuricemia, definida por uma concentração sérica de ácido úrico igual ou superior a 6,8 mg/dL (Akkineni *et al.*, 2014; Darmon *et al.*, 2008). O ácido úrico no soro é produzido pela quebra dos ácidos nucléicos celulares das células leucêmicas e pode ser um marcador da agressividade da doença (Yamauchi *et al.*, 2013). Apesar da diferença estatística observada, em nenhum dos tempos avaliados houve aumento na concentração no sangue, acima do valor de referência utilizado para ácido úrico, que é 3,5 a 8,5 mg/dL.

A enzima LDH é uma enzima da via glicolítica responsável pela aceleração de conversão do piruvato em lactato para produção de energia. Devido a rápida proliferação e imaturidade das células tumorais, a LDH é liberada devido à atividade de múltiplas citocinas e danos à membrana celular. Qualquer alteração no nível de lactato desidrogenase no sangue é um reflexo da presença de dano celular. A elevação da lactato desidrogenase encontrada em pacientes com leucemia linfoblástica aguda está relacionada com aumento da proliferação e renovação celular (Walaa Fikry, 2017). Nossos achados para valores de LDH (mediana no T0 = 1707 U/L e T1 = 461 U/L) estão acima do valor de referência (V.R: 120 a 246 U/L), confirmando que há um dano celular nesses pacientes do grupo da LLA.



Para as enzimas que avaliam a função hepática (ALT, AST e fosfatase alcalina), somente a ALT apresentou pequena elevação em relação ao valor de referência (ALT V.R.: < 50 U/L). AAST (V. R: 15 a 46 U/L) e a fosfatase alcalina (V.R.: 0 a 9 anos: 55 a 425 U/L; 10 a 15 anos: 130 a 560 U/L; adultos: 38 a 126 U/L) ficaram dentro do intervalo de referência, demonstrando assim que não ocorreram lesões maiores nas células hepáticas nos tempos avaliados.

#### 4.1.2 Características laboratoriais do grupo LMA

A comparação dos parâmetros do exame hemograma para o grupo LMA nos tempos T0, T1, T2 e T3 demonstrou que houve diferença estatisticamente significativa para os parâmetros: global de leucócitos, neutrófilos, promielócitos, monócitos, linfócitos, hemácias e hemoglobina, nos correspondentes tempos, de acordo com os dados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Comparação das variáveis do exame hemograma do grupo LMA

| Parâmetros                                  | T0                    | T1                  | T2                   | T3                  | Valor-p            |
|---------------------------------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|
| Global de Leucócitos (x10 <sup>3</sup> /μL) | 21,06<br>(6,19-77,41) | 1,59<br>(0,53-4,97) | 1,52<br>(0,53-3,82)  | 1,19<br>(0,54-5,38) | <0,05 <sup>a</sup> |
| Neutrófilos (x10 <sup>3</sup> /μL)          | 1,69<br>(0,50- 9,46)  | 0,29<br>(0,11-1,18) | 0,45<br>(0,02-1,18)  | 0,69<br>(0,34-1,32) | <0,05 <sup>b</sup> |
| Promielócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)        | 7,51<br>(2,10-18,62)  | 1,09<br>(0,02-2,98) | —                    | —                   | 0,0020*            |
| Monócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)            | 1,27<br>(0,12-11,19)  | 0,17<br>(0,03-0,71) | 0,09<br>(0,02-0,32)  | 0,12<br>(0,05-0,66) | <0,05 <sup>c</sup> |
| Linfócitos (x10 <sup>3</sup> /μL)           | 2,25<br>(0,72-5,03)   | 0,85<br>(0,40-1,72) | 0,74<br>(0,39-1,15)  | 0,54<br>(0,21-0,93) | <0,05 <sup>d</sup> |
| Blastos (x10 <sup>3</sup> /μL)              | 7,25<br>(1,61-33,07)  | 1,55<br>(1,46-6,37) | 6,39<br>(2,54-58,23) | 0,51<br>(0,15-5,81) | (ns)               |
| Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)             | 2,33<br>(2,05-2,77)   | 2,79<br>(2,36-3,17) | 2,90<br>(2,58-3,10)  | 2,85<br>(2,46-3,21) | <0,05 <sup>c</sup> |
| Hemoglobina (g/dL)                          | 6,9<br>(6,0-7,9)      | 7,8<br>(7,0-9,2)    | 8,2<br>(7,5-8,9)     | 8,5<br>(7,3-8,9)    | <0,05 <sup>e</sup> |
| Hematócrito (%)                             | 20,6<br>(18,7-23,9)   | 24,7<br>(20,4-27,6) | 24,5<br>(21,9-26,7)  | 24,7<br>(21,2-26,9) | (ns)               |
| Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)            | 32<br>(19-46)         | 49<br>(24-70)       | 32<br>(13-108)       | 97<br>(22-189)      | (ns)               |

**Legenda:** Os valores entre parênteses são amplitude percentil 25% a 75% da mediana. <sup>a,b,c,d,e</sup> Teste de Dunn, com valor-p<0,05: <sup>a</sup> T0 vs. T1; T0 vs. T2; T0 vs. T3; <sup>b</sup> T0 vs. T1; T0 vs. T2; T2; <sup>d</sup> T0 vs. T3; <sup>e</sup> T0 vs. T2; T0 vs. T3. \*Teste Wilcoxon. (ns) estatisticamente não significativo (-) não constam dados. **Fonte:** Dados da consulta ao prontuário do paciente, elaborado pelo autor.

A diminuição quantitativa dos parâmetros global de leucócitos, neutrófilos, promielócitos, monócitos, linfócitos, hemácias e hemoglobina nos tempos avaliados é esperado no contexto hematológico da LMA em função da quimioterapia, especialmente na fase inicial do tratamento (fase de indução), na qual altas doses de quimioterápicos são utilizados com o objetivo de atingir a remissão morfológica completa das células “doentes” e como consequência clínica há a presença de citopenias devido à mielossupressão hematológica. Diferentemente da LLA, foi observado na LMA uma severa neutropenia (contagem de neutrófilos  $<500/\text{mm}^3$ ) nos tempos T1 e T2, induzida pelos diferentes quimioterápicos administrados em ciclos consecutivos para obter um resultado favorável. Além disso, a presença de neutropenia predispor os pacientes à infecções graves na corrente sanguínea por bactérias gram-negativas e cocos gram-positivos (Syrjälä; Ohtonen; Kinnunen; Rätty *et al.*, 2010). A presença de anemia (observada pela diminuição de hemácias e hemoglobina) é uma frequente complicação observada nos pacientes com câncer e em tratamento quimioterápico. A causa da anemia nesses pacientes é multifatorial, e para muitos deles a deficiência de ferro é o mecanismo dominante (Naoum, 2016).

Em relação a comparação das dosagens bioquímicas, somente o analito sérico ácido úrico apresentou diferença estatisticamente significativa entre os tempos avaliados, como apresentado na Tabela 7. Mesmo assim, em nenhum dos tempos avaliados, verificou-se um quadro de hiperuricemia.

Tabela 7 – Comparação das dosagens séricas do grupo LMA

| Analito bioquímico       | T0                  | T1                  | T2                  | T3                  | Valor-p   |
|--------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| Uréia (mg/dL)            | 33<br>(25-44)       | 27<br>(17-38)       | 28<br>(18-41)       | 22<br>(15-41)       | (ns)      |
| Creatinina (mg/dL)       | 0,68<br>(0,52-0,82) | 0,52<br>(0,38-0,67) | 0,53<br>(0,41-0,64) | 0,61<br>(0,34-0,80) | (ns)      |
| Ácido úrico (mg/dL)      | 4,4<br>(2,8-5,7)    | 2,4<br>(1,4-3,6)    | 1,9<br>(0,9-3,7)    | 3,2<br>(2,9-3,5)    | $<0,05^a$ |
| LDH (U/L)                | 844<br>(509-1864)   | 440<br>(230-2751)   | 865<br>(635-1912)   | NC                  | (ns)      |
| ALT (U/L)                | 24<br>(17-35)       | 32<br>(15-60)       | 30<br>(20-67)       | 27<br>(16-52)       | (ns)      |
| AST (U/L)                | 38<br>(26-47)       | 32<br>(26-43)       | 32<br>(22-54)       | 31<br>(19-55)       | (ns)      |
| Fosfatase Alcalina (U/L) | 92<br>(74-160)      | 100<br>(72-155)     | 126<br>(91-200)     | 112<br>(74-154)     | (ns)      |

|           |                |                 |                 |                 |      |
|-----------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| GGT (U/L) | 73<br>(47-224) | 218<br>(48-271) | 122<br>(54-287) | 131<br>(45-170) | (ns) |
|-----------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|

**Legenda:** Teste de Dunn estatisticamente significativo valor- $p < 0,05$ . <sup>a</sup>T0 vs. T1; (ns) estatisticamente não significativo). **Fonte:** Dados da consulta ao prontuário do paciente, elaborado pelo autor.

#### 4.2 Análise metabolômica global

A partir da análise metabolômica global por LC-MS e após etapas de tratamento dos dados, foram geradas na plataforma do XCMS Online, duas matrizes de dados, sendo uma para cada modo de aquisição (negativo e positivo). A aquisição dos dados no modo negativo gerou 4.241 *features* e no modo positivo gerou 6.688 *features*.

Com a finalidade de explorar os dados e buscar respostas para os objetivos do estudo, foram realizadas análises estatísticas dos dados em três grupos, conforme abaixo:

1º Grupo: LLA T0 (n=27) vs. CTRL (grupo controle n= 32)

2º Grupo: LMA T0 (n= 26) vs. CTRL (grupo controle n=32)

3º Grupo: LLA T0 (n=27) vs. LMA T0 (n=26)

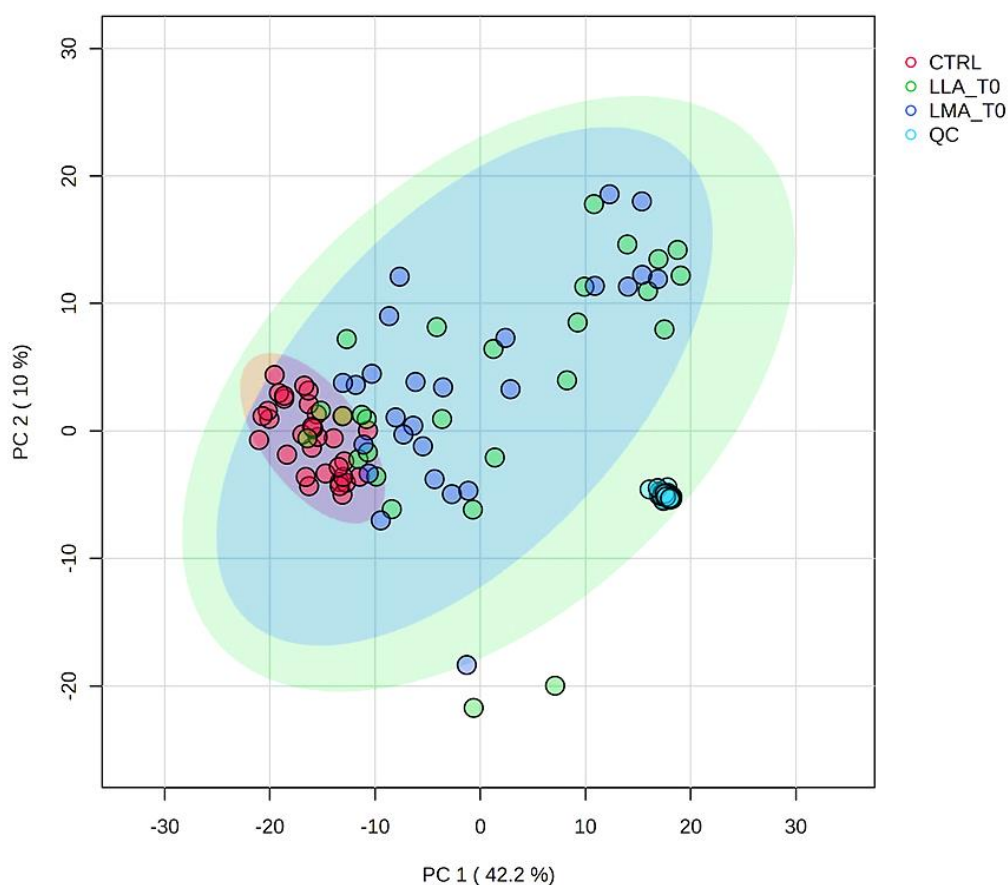
Inicialmente na matriz original dos dados foram detectados 3,7% de *missing values* (valores ausentes). Na sequência foram removidos os *features* com valores ausentes em >50% das amostras, sendo que os demais valores faltantes foram substituídos por 1/5 do menor valor positivo de cada variável. Posteriormente, foram removidos os *features* com CV > 25% em relação aos valores de área de pico nos QCs. Com isso, foram removidos 8.884 *features*, portanto as análises estatísticas foram realizadas com os 2.025 *features* restantes. O objetivo da filtragem de dados é identificar e remover variáveis que provavelmente não serão úteis ou confiáveis ao modelar os dados. A normalização das amostras foi feita pela mediana, a fim de minimizar o erro sistemático nos dados (Mastrangelo; Ferrarini; Rey-Stolle; Garcia *et al.*, 2015). Em seguida, foi aplicada a transformação logarítmica (base 10) para corrigir a heterocedasticidade, reduzir o impacto de *outliers* e converter os dados em uma distribuição mais normal (Van Den Berg; Hoefsloot; Westerhuis; Smilde *et al.*, 2006). O escalonamento utilizado foi por Pareto, onde os valores das variáveis são centrados na média e divididos pela raiz quadrada do desvio padrão.

O objetivo da normalização de dados é reduzir qualquer viés sistemático dentro de um determinado conjunto de dados e melhorar a consistência geral dos dados para

que comparações biológicas significativas possam ser feitas. A transformação dos dados é um método para alterar variáveis para que exibam uma distribuição mais normal ou Gaussiana. O escalonamento dos dados visa tornar as variáveis comparáveis entre si sendo útil quando as variáveis são de ordens de magnitude muito diferentes (Xia; Wishart, 2016).

A análise exploratória inicial dos dados foi realizada através do gráfico de escores da PCA, com todas as amostras do conjunto de dados, apresentado no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Gráfico de escores por PCA construído com amostras dos grupos doentes (LLA (T0) e LMA (T0)), grupo controle e amostras do controle de qualidade  
Scores Plot



**Legenda:** CTRL: grupo controle; LLA\_T0: grupo com leucemia linfoblástica aguda; LMA\_T0: grupo com leucemia mieloide aguda; QC: controle de qualidade. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

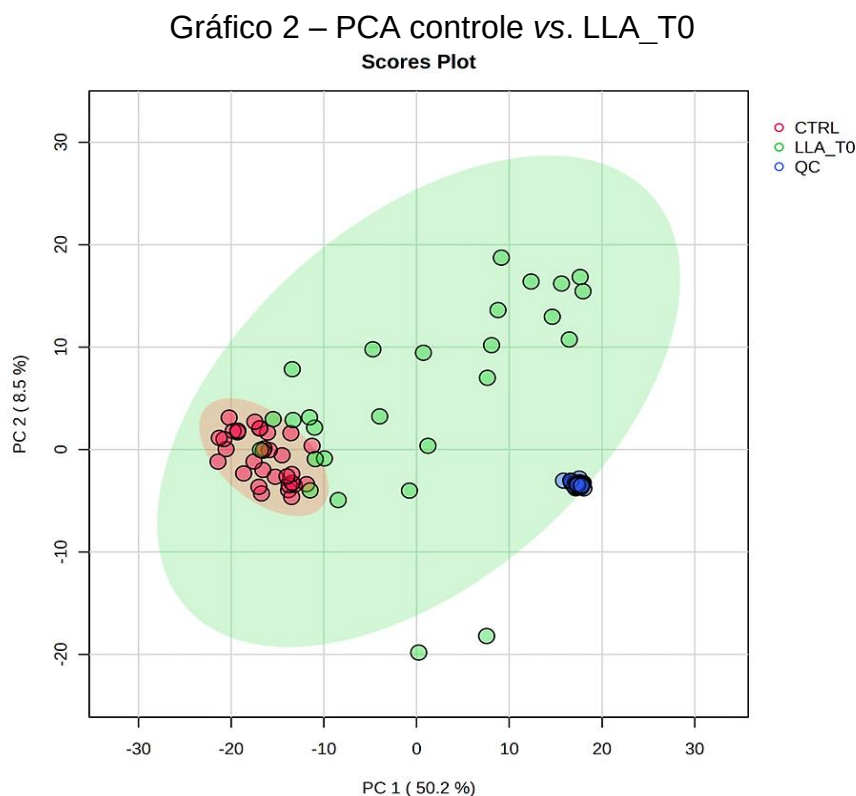
O resultado dessa análise por PCA mostra que existe separação entre o grupo controle (CTRL), o grupo doente (LLA e LMA) e amostras de QC. Também é possível visualizar a estabilidade analítica do equipamento através do forte agrupamento do QC, que possui informações representativas de todas as amostras. Não é possível

verificar na análise do PCA uma clara separação entre as duas leucemias estudadas, LLA e LMA, e há sobreposição de algumas amostras de leucemias com o grupo controle. O objetivo desse modelo foi mostrar uma análise geral, exploratória dos dados. Faz-se necessário a utilização de modelos de análise supervisionados como o PLS-DA e OPLS-DA, além de outras estratégias estatísticas, como a separação dos grupos, para melhor classificação das amostras e dos *features* diferenciadores.

### 4.3 Grupo pacientes LLA

#### 4.3.1 Análises Estatísticas do grupo: LLA vs. controle

O resultado do PCA demonstrou uma maior separação do grupo controle (CTRL) e uma sobreposição parcial de algumas amostras de LLA (T0), demonstrando assim que há uma variabilidade dentro do grupo doente.

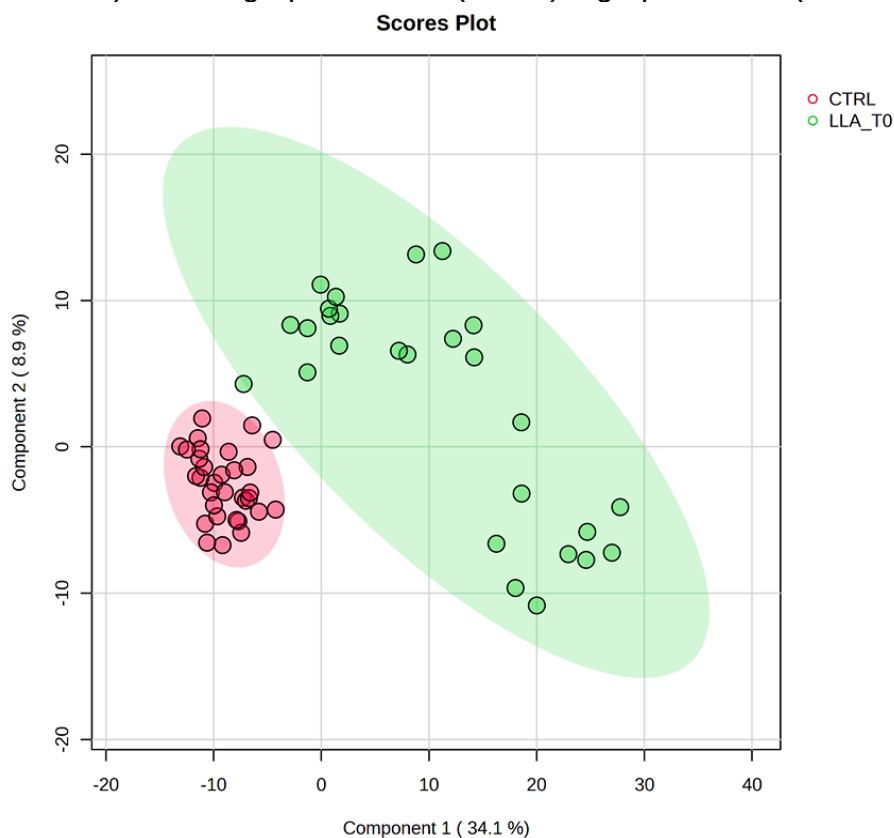


**Legenda:** CTRL: grupo controle; LLA\_T0: grupo com leucemia linfoblástica aguda no tempo zero de coleta; QC: controle de qualidade. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Na sequência de análise, os resultados foram avaliados pelo método multivariado supervisionado PLS-DA (Gráfico 3), onde foi possível visualizar uma separação satisfatória entre o grupo controle e o grupo doente. Para testar a validade do modelo construído foi utilizado o teste de validação cruzada, apesar da análise da

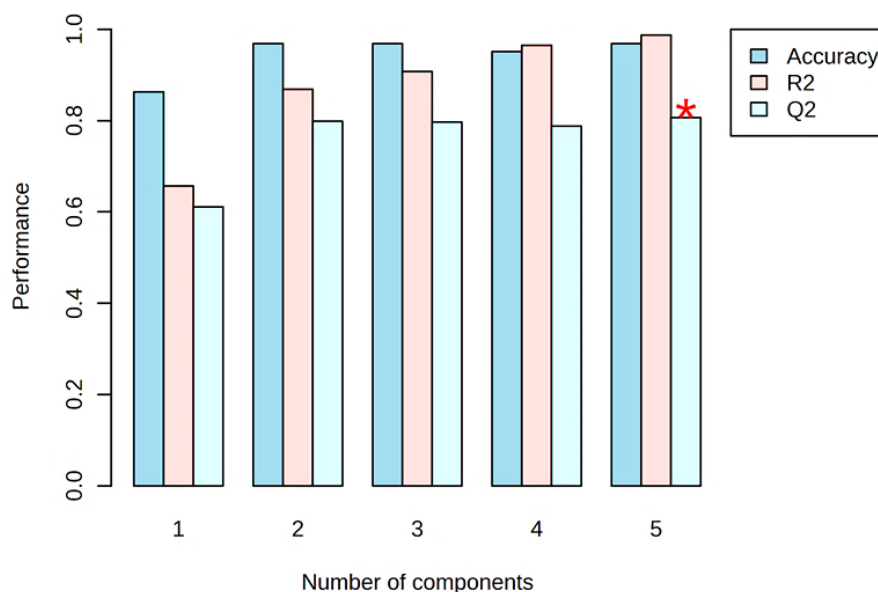
plataforma do MetaboAnalyst sugerir 05 componentes, já é possível com 03 componentes principais obter um modelo altamente preditivo com os valores dos parâmetros de  $R^2 = 0,90$  e  $Q^2 = 0,79$ , conforme demonstrado na validação cruzada no Gráfico 4.

Gráfico 3 – Modelo de Análise Discriminante de Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) entre o grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0)



**Legenda:** CTRL: grupo controle; LLA\_T0: grupo com leucemia linfoblástica aguda no tempo zero de coleta. **Fonte:** Elaborado pelo autor

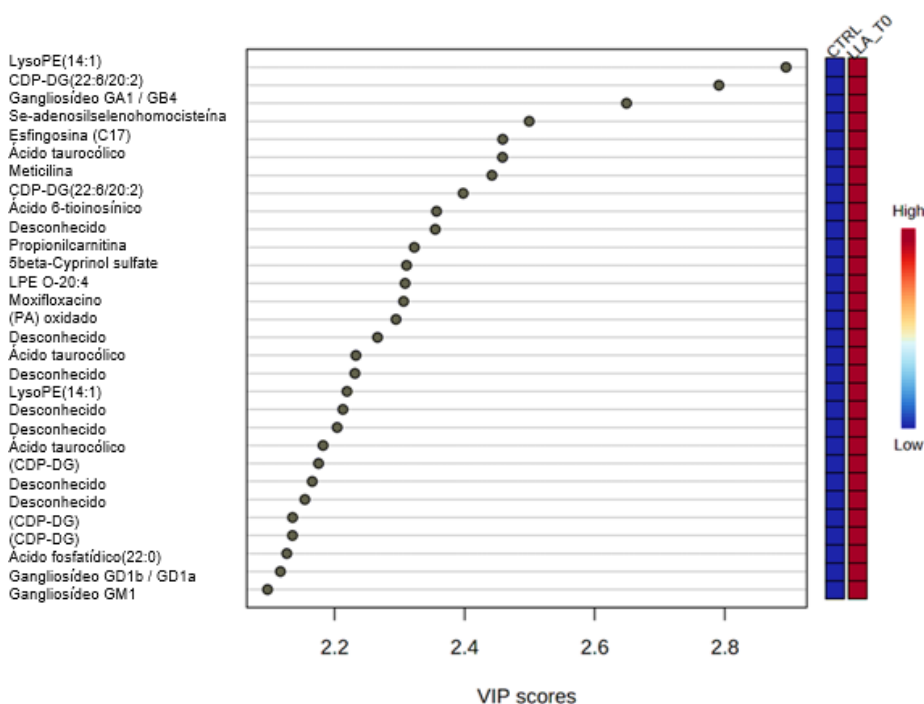
Gráfico 4 – Classificação do modelo PLS-DA pela validação cruzada



**Legenda:** Parâmetros de qualidade obtidos a partir da validação do modelo, com 03 componentes principais (\*)  $R^2 = 0,90$  (variação explicada pelo modelo) e  $Q^2 = 0,79$  (previsibilidade do modelo de predição). **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A partir do modelo de PLS-DA foram selecionados 30 features com valores de VIP >2.0, responsáveis pela separação e discriminação entre os dois grupos, sendo 08 do modo aquisição negativo e 22 do modo aquisição positivo, todos com intensidade aumentada no grupo LLA (T0), demonstrado no Gráfico 5.

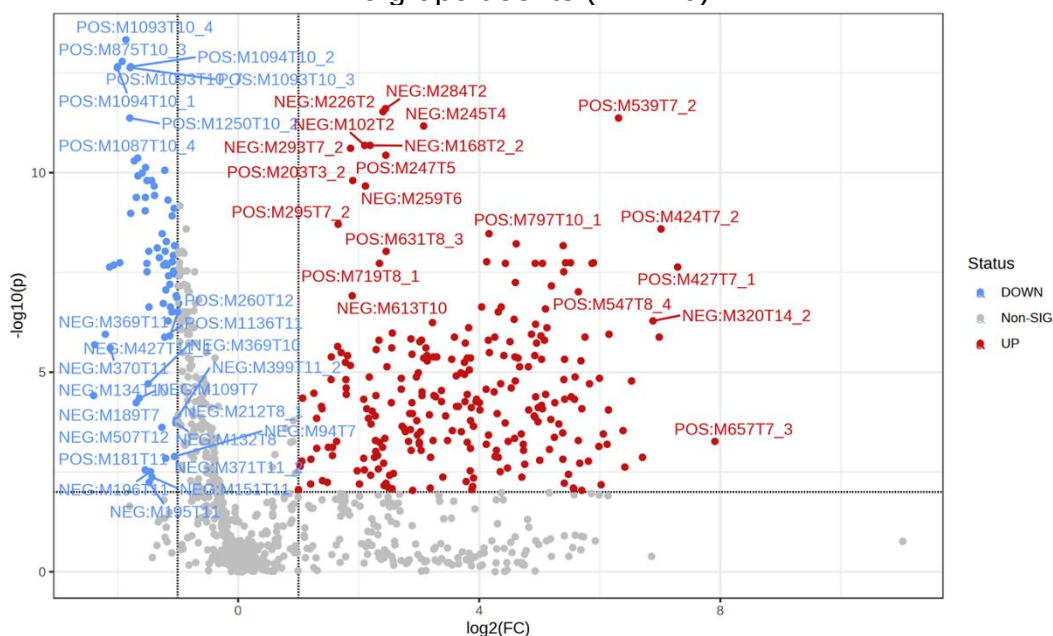
Gráfico 5 – Valores dos 30 metabólitos como maiores VIPs identificados no modelo de PLS-DA para o grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0)



**Legenda:** CTRL: grupo controle; em azul menor intensidade dos *metabólitos*. LLA\_T0: grupo com leucemia linfoblástica aguda tempo zero de coleta; em vermelho metabólitos com maior intensidade. Abreviaturas: LysoPE(14:1):lisofosfatidiletanolamina(14:1); LPEO-20:4:2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerphosphoethanolamine; CDP-DG(22:6/20:2): citidina difosfato diacilglicerol; PA: ácido fosfatídico. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Outro resultado obtido a partir da análise estatística univariada foi o *Volcano Plot* que combina resultados da análise do *Fold Change* (FC) e Teste T em um único gráfico. O *fold change* tem o objetivo de comparar os valores absolutos de alterações entre as médias dos dois grupos (grupo controle e grupo doente). O valor de *fold change* foi considerado acima do *threshold* de 2 e *valor-p* menor que 0,01 com correção para *False Discovery Rate* (FDR). Foram obtidos 76 *features* com intensidade diminuída e 259 com intensidade aumentada, apresentados no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Volcano plot aplicado aos dados das amostras do grupo controle (CTRL) e grupo doente (LLA T0)



**Legenda:** Cada ponto no gráfico representa um *molecular feature*. Os pontos vermelhos indicam intensidade aumentada e os pontos azuis intensidade diminuída. Os pontos cinzas representam a não distinção entre os grupos. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Verificamos que os 30 metabólitos classificados pelo modelo PLS-DA ( $VIP > 2,0$ ) estavam igualmente destacados como discriminantes na análise univariada do *Volcano Plot*, conforme análise realizada através do diagrama de Venn, Gráfico 7.



Gráfico 7 – Diagrama de Venn para os features moleculares discriminantes obtidos pelo PLS-DA e pelo Volcano plot para LLA (T0) vs. CTRL



Legenda: User\_list1: são os 30 metabólitos com índice VIP (>2.0) apontados pelo modelo PLS-DA. User\_list2: são os 335 metabólitos classificados no *Volcano Plot*. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

A anotação da identidade dos features foi construída através da busca do  $m/z$  na base de dados da ferramenta online CEU Mass Mediator (CMM, <http://ceumass.eps.uspceu.es>) juntamente com a plausibilidade biológica e sua distribuição isotópica (Agilent MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis version 10.0). As características dos 30 principais metabólitos diferencialmente abundantes no modo de polaridade negativa e positiva são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8 – Caracterização dos 30 metabólitos plasmáticos diferenciadores entre o grupo doente LLA (T0) e grupo controle

| N.º | Identidade Postulada                  | Classe química            | m/z experimental | Massa exata (Da) | Erro ppm | RT (min) | Fórmula molecular                                                             | Íon aduto               | Índice VIP | FC     | p-valor  | Intensidade |
|-----|---------------------------------------|---------------------------|------------------|------------------|----------|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------|--------|----------|-------------|
| 1   | Ácido 6-tioinosínico                  | Imunossupressor           | 283.0399         | 284.0579         | 38       | 7.50     | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S               | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.3569     | 42.718 | 4.75E-05 | ↑           |
| 2   | Esfingosina (C17)                     | Esfingolípídios           | 320.2303         | 285.2668         | 21       | 13.91    | C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>                               | [M+Cl] <sup>-</sup>     | 2.4586     | 117.88 | 5.18E-07 | ↑           |
| 3   | Meticilina                            | Antibióticos β-lactâmicos | 379.1150         | 380.1042         | 48       | 7.61     | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S               | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.4421     | 38.161 | 5.81E-05 | ↑           |
| 4   | Se-adenosil-seleno homocisteína       | Nucleosídeo               | 431.0770         | 432.066          | 42       | 6.96     | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> Se              | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.4993     | 46.051 | 4.14E-05 | ↑           |
| 5   | Fluoroquinolona (moxifloxacino)       | Quinolonas e derivados    | 436.1364         | 401.1751         | 20       | 7.36     | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                | [M+Cl] <sup>-</sup>     | 2.3062     | 14.471 | 0.000807 | ↑           |
| 6   | Ácido taurocólico                     | Ácidos biliares           | 514.2826         | 515.2917         | 3        | 9.99     | C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S                             | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.1824     | 45.67  | 1.81E-08 | ↑           |
| 7   | Ácido taurocólico                     | Ácidos biliares           | 515.2856         | 515.2917         | 3        | 9.99     | C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S                             | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.2329     | 42.262 | 3.04E-08 | ↑           |
| 8   | Ácido taurocólico                     | Ácidos biliares           | 516.2841         | 515.2917         | 3        | 9.99     | C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S                             | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.4583     | 59.472 | 1.81E-08 | ↑           |
| 9   | Propionilcarnitina                    | Acil lipídio              | 218.1307         | 217.1314         | 37       | 6.41     | C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>                               | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.3227     | 12.028 | 1.32E-06 | ↑           |
| 10  | LysoPE(14:1)                          | Glicerofosfolípídios      | 424.2324         | 423.2386         | 32       | 7.10     | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>7</sub> P                             | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.8942     | 129.3  | 2.58E-09 | ↑           |
| 11  | Gangliosídeo GA1/<br>Gangliosídeo GB4 | Esfingolípídios           | 426.5791         | 1254.7812        | 38       | 7.49     | C <sub>62</sub> H <sub>114</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>               | [M+2H+Na] <sup>3+</sup> | 2.649      | 156.54 | 2.31E-08 | ↑           |
| 12  | LPE O-20:4                            | Glicerofosfolípídios      | 488.3213         | 487.3063         | 16       | 7.67     | C <sub>25</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>6</sub> P                             | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.3085     | 33.087 | 1.88E-08 | ↑           |
| 13  | Ácido fosfatídico (22:0)              | Glicerofosfolípídios      | 531.2930         | 508.3165         | 25       | 7.27     | C <sub>25</sub> H <sub>49</sub> O <sub>8</sub> P                              | [M+Na] <sup>+</sup>     | 2.1266     | 30.917 | 1.86E-06 | ↑           |
| 14  | CDP-diacilglicerol (CDP-DG)           | Glicerofosfolípídios      | 539.2902         | 1077.5456        | 21       | 7.09     | C <sub>54</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>15</sub> P <sub>2</sub> | [M+2H] <sup>2+</sup>    | 2.791      | 79.41  | 4.28E-12 | ↑           |
| 15  | CDP-diacilglicerol (CDP-DG)           | Glicerofosfolípídios      | 539.7913         | 1077.5456        | 21       | 7.09     | C <sub>54</sub> H <sub>85</sub> N <sub>3</sub> O <sub>15</sub> P <sub>2</sub> | [M+2H] <sup>2+</sup>    | 2.3978     | 43.126 | 1.81E-08 | ↑           |
| 16  | Desconhecido                          |                           | 547.2854         |                  |          | 7.61     |                                                                               |                         | 2.204      | 50.024 | 9.66E-08 | ↑           |
| 17  | 5β-Cyprinol sulfate                   | Ácidos biliares           | 555.3063         | 532.307          | 19       | 7.27     | C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub> S                              | [M+Na] <sup>+</sup>     | 2.3108     | 29.187 | 1.12E-06 | ↑           |
| 18  | LysoPE(14:1)                          | Glicerofosfolípídios      | 571.3018         |                  |          | 7.10     | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>7</sub> P                             | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.2192     | 32.521 | 1.23E-06 | ↑           |

|    |                                                                 |                      |          |           |    |      |                                                                                |                                      |        |        |          |   |
|----|-----------------------------------------------------------------|----------------------|----------|-----------|----|------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------|--------|----------|---|
| 19 | CDP-diacilglicerol oxidado (CDP-DG)                             | Glicerofosfolipídios | 606.3336 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.1353 | 30.436 | 1.88E-08 | ↑ |
| 20 | CDP-diacilglicerol oxidado (CDP-DG)                             | Glicerofosfolipídios | 607.3363 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.1355 | 32.75  | 4.76E-06 | ↑ |
| 21 | Ácido fosfatídico oxidado                                       | Glicerofosfolipídios | 613.2779 | 574.3271  | 20 | 7.07 | C <sub>29</sub> H <sub>51</sub> O <sub>9</sub> P                               | [M+K] <sup>+</sup>                   | 2.2945 | 58.523 | 1.88E-08 | ↑ |
| 22 | CDP-diacilglicerol oxidado (CDP-DG)                             | Glicerofosfolipídios | 653.3077 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.1754 | 34.259 | 2.59E-07 | ↑ |
| 23 | Gangliosídeo GD1b (d18:1/26:0) / Gangliosídeo GD1a (d18:1/26:0) | Glicosfingolipídios  | 658.0236 | 1948.102  | 18 | 9.18 | C <sub>93</sub> H <sub>165</sub> N <sub>3</sub> O <sub>39</sub>                | [M+2H+Na] <sup>3+</sup>              | 2.1168 | 19.908 | 3.08E-07 | ↑ |
| 24 | Gangliosídeo GM1 (d18:0/12:0)                                   | Glicosfingolipídios  | 743.3894 | 1462.8032 | 14 | 7.30 | C <sub>68</sub> H <sub>122</sub> N <sub>2</sub> O <sub>31</sub>                | [M+H+Na] <sup>2+</sup>               | 2.097  | 21.608 | 1.88E-08 | ↑ |
| 25 | Desconhecido                                                    |                      | 763.9821 |           |    | 7.65 |                                                                                |                                      | 2.1657 | 36.668 | 6.87E-08 | ↑ |
| 26 | Desconhecido                                                    |                      | 774.0005 |           |    | 7.90 |                                                                                |                                      | 2.2314 | 24.462 | 6.07E-09 | ↑ |
| 27 | Desconhecido                                                    |                      | 774.2006 |           |    | 7.90 |                                                                                |                                      | 2.3549 | 42.002 | 6.75E-09 | ↑ |
| 28 | Desconhecido                                                    |                      | 823.0230 |           |    | 7.68 |                                                                                |                                      | 2.2661 | 71.128 | 1.12E-06 | ↑ |
| 29 | Desconhecido                                                    |                      | 823.2234 |           |    | 7.68 |                                                                                |                                      | 2.2129 | 92.205 | 1.66E-05 | ↑ |
| 30 | Desconhecido                                                    |                      | 861.1902 |           |    | 7.65 |                                                                                |                                      | 2.1545 | 17.424 | 1.71E-08 | ↑ |

**Legenda:** RT: tempo de retenção; VIP: *variable importance for the projection*; FC: *fold change*. ↑ intensidade aumentada no grupo LLA (T0). **Abreviaturas:** LysoPE(14:1): Lisofosfatidiletanolamina(14:1); LPEO-20:4:2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycerphosphoethanolamine; CDP-DG, citidina difosfato diacilglicerol. Os compostos nº 07 e 08 são isótopos do composto nº06, confirmados no teste de correlação Pearson R<sup>2</sup>>0,90. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

O percentual de distribuição das classes foi de 50% de lipídios que se enquadram em quatro categorias (ácil lipídio, esfingolipídios, glicerofosfolipídios e glicoesfingolipídios), 13% de ácidos biliares; 10% de medicamentos, 3% de nucleosídeo e 24% de 'desconhecidos'. Os *features* moleculares que permaneceram desconhecidos foram espécies para as quais as buscas nos bancos de dados metabolômicos não retornaram nenhum resultado com plausibilidade biológica que fosse compatível com o  $m/z$  de alta resolução e com o padrão de distribuição isotópica. Nesse estudo os seguintes lipídios apresentaram-se elevados nos pacientes com LLA quando comparado com o grupo controle: propionilcarnitina; esfingosina; LysoPE(14:1); CDP-DG(22:6/20:2); LPE O-20:4; ácido fosfatídico (22:0); ácido fosfatídico oxidado (PA); CDP-diacilglicerol oxidado (CDP-DG) e gangliosídeo GA1/GB4; Gangliosídeo GD1b/GD1a e gangliosídeo GM1. O plasma contém milhares de espécies moleculares lipídicas distintas que se enquadram em seis categorias principais, incluindo acil lipídios, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis e prenóis. A ligação entre os lipídios e as várias doenças têm provocado um crescente aumento na compreensão das diversas funções dos lipídios em muitas vias metabólicas celulares. Além de seu papel como blocos de construção de membranas de células e organelas e como entidades de armazenamento de energia, os lipídios desempenham funções importantes na sinalização celular e na regulação metabólica (Quehenberger; Armando; Brown; Milne *et al.*, 2010). Nas leucemias agudas nas quais proliferam na medula óssea um grande número de células imaturas (blastos) há um envolvimento maior do número de ácidos nucléicos, proteínas e lipídios. Células cancerígenas apresentam alterações específicas em diferentes aspectos do metabolismo dos lipídios, especialmente dos ácidos graxos. Os ácidos graxos, sendo o bloco de construção dos lipídios, além da função de armazenamento e sinalização de lipídios, funcionam como recurso energético. A oxidação de ácidos graxos tem sido descrita como um mecanismo usado pelas células leucêmicas para gerar energia e sobreviver sob condições de estresse metabólico, sugerindo que a alta demanda metabólica de proliferação celular requer o uso de múltiplos substratos nos processos metabólicos (Musharraf; Siddiqui; Shamsi; Naz, 2017). Alguns tipos de câncer, incluindo o de mama e de próstata mostraram aumento na expressão da enzima ácido graxo-sintase (FASN) o que sugere que a síntese de ácidos graxos desempenha um papel importante na patogênese do câncer. Assim como, existem vários estudos que relacionam a  $\beta$ -oxidação com câncer. A oxidação de ácidos graxos é uma via

dominante para geração de energia no câncer de próstata e tem sido associada à promoção de tumores no câncer de pâncreas (Santos; Schulze, 2012). Além disso, também foi demonstrado que as células leucêmicas oxidam os ácidos graxos, promovendo uma mudança na produção de ATP (adenosina trifosfato) pela preferência metabólica da glicólise, mudando da oxidação do piruvato para a oxidação dos ácidos graxos. A ativação da  $\beta$ -oxidação pode ser crucial para apoiar a viabilidade das células cancerígenas durante períodos de estresse energético (Samudio; Harmancey; Fiegl; Kantarjian *et al.*, 2010). No entanto, quando as células hematopoiéticas são estimuladas a proliferar, comprometem-se com a síntese lipídica, suprimindo a oxidação. A capacidade de suprimir a oxidação é necessária para que estas células atinjam taxas máximas de proliferação (Deberardinis; Lum; Thompson, 2006). Nos nossos achados encontramos os lipídios ácido fosfatídico oxidado e CDP-diacilglicerol oxidados com intensidade aumentada nos pacientes com LLA.

Outro metabólito com intensidade aumentada foi o ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico (PA) é um lipídio segundo mensageiro que participa de vários processos intracelulares e eventos de sinalização, sendo gerado pela fosfolipase D (PLD) que catalisa a hidrólise da fosfatidilcolina em PA e colina. O PA contribui para a ativação do mTOR (do inglês-*mammalian target of rapamycin*) sua ativação permite que as células continuem a proliferar e evitem apoptose (Foster, 2009).

Mudanças no metabolismo lipídico que desequilibram os níveis de saturação dos ácidos graxos da membrana influenciam na sua estrutura e fluidez, de onde se originam muitas cascatas de sinalização celular. Como consequência, a transdução de sinal aberrante pode aumentar a proliferação e sobrevivência de células progenitoras hematopoiéticas. Por exemplo, a hidrólise da ceramida produz esfingosina, cuja fosforilação produz esfingosina-1-fosfato que regula o crescimento celular e suprime a morte celular programada (Stefanko; Thiede; Ehninger; Simons *et al.*, 2017). Nosso estudo demonstrou aumento da intensidade de esfingosina no plasma dos pacientes.

Gangliosídeos são glicoesfingolipídios (GSLs) contendo ácido siálico e fornecem uma parte significativa dos glicanos constituintes das membranas celulares (Kolter, 2012). Estes metabólitos estão localizados principalmente na camada externa da membrana plasmática das células dos vertebrados. Essas moléculas sialiladas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos, incluindo crescimento, diferenciação, migração e apoptose, através da modulação de processos de

sinalização celular e interações célula-célula (Vilcaes; Garbarino-Pico; Torres Demichelis; Daniotti, 2020). Mudanças na expressão de certas espécies de gangliosídeos ocorrem durante a proliferação, diferenciação e ontogênese celular (Daniotti; Lardone; Vilcaes, 2016). Altas concentrações de GD1a estão presentes em tecidos extraneurais, como nos eritrócitos, camada leucocitária, medula óssea, testículos, baço e fígado, enquanto diferentes GSLs estão em quantidades elevadas em outros tecidos, como por exemplo, GM4 no rim, GM2 na medula óssea, GM1 nos eritrócitos e GM3 no intestino (Xu; Barnes; Sun; Grabowski, 2010). No entanto, a expressão aberrante e elevada de gangliosídeos também foi observada em diferentes tipos de células cancerígenas, promovendo assim a sobrevivência do tumor. Tumores, como melanoma, câncer de pulmão, sarcoma e neuroblastoma, expressam gangliosídeos GD3, GM2 e GD2 em níveis mais elevados do que o tecido normal correspondente. Os tumores liberam gangliosídeos para o meio extracelular, povoam o microambiente juntamente com outros GSLs biologicamente ativos. Eles têm o potencial de se transferir para diferentes células do sistema imunológico, modificar a composição de sua membrana e induzir modificações que modulam a imunidade inata e adaptativa, favorecendo assim, o escape do tumor (Daniotti; Lardone; Vilcaes, 2016).

Outra classe de metabólitos identificada aumentada no plasma dos pacientes com LLA foram os ácidos biliares: ácido taurocólico e *5beta-Cyprinol sulfate*. Os ácidos biliares são originalmente conhecidos como detergentes para facilitar a digestão e absorção de lipídios. O conhecimento sobre sua função foi estendido, considerando que sinais diferenciais emitidos por vários perfis de ácidos biliares podem produzir características fisiopatológicas distintas, participando assim na ocorrência e desenvolvimento de tumores. Isso ocorre, por exemplo, na angiogênese do câncer de fígado e na metástase do câncer colorretal, gástrico e câncer de mama. Alguns tipos de ácidos biliares são moléculas pró-inflamatórias devido à sua capacidade de estimular a secreção de uma variedade de citocinas e quimiocinas, mostrando que a desregulação dos ácidos biliares está envolvida na regulação da inflamação e da imunidade (Fu; Yu; Xu; Yu, 2022).

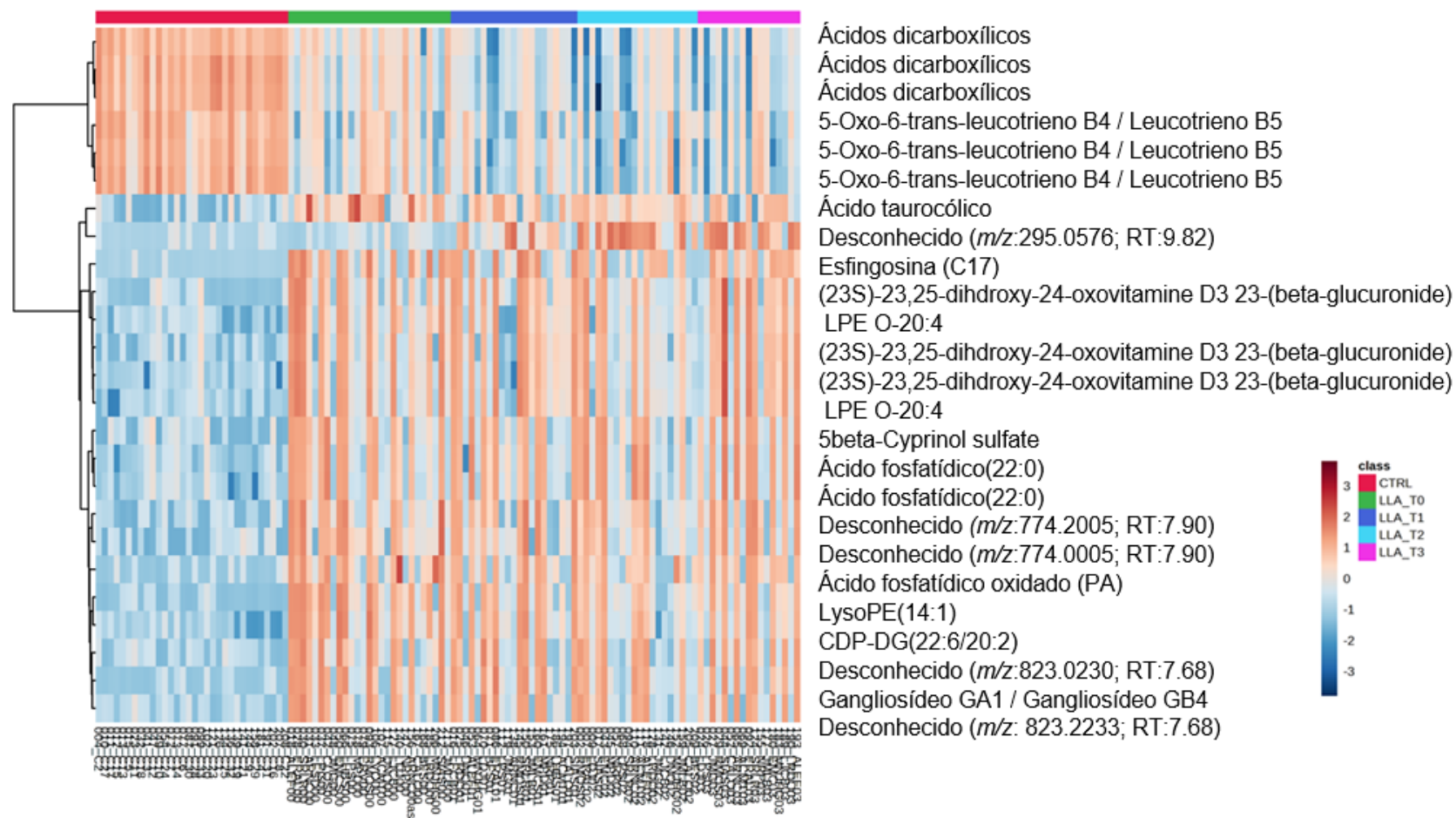
Outro metabólito aumentado na LLA foi o nucleosídeo Se-adenosilselenohomocisteína. Em humanos, o Se-adenosilselenohomocisteína participa de diversas reações enzimáticas. Em particular, o Se-adenosilselenohomocisteína pode ser convertido em selenohomocisteína e adenosina

através da sua interação com a enzima adenosilhomocisteinase, que está envolvida no metabolismo do selenoaminoácido (Wishart; Guo; Oler; Wang *et al.*, 2022). Em razão dos pacientes estarem hospitalizados para tratamento da leucemia e suas complicações clínicas, foram detectados alguns medicamentos no plasma desses pacientes pertencentes a classe dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e um medicamento imunossupressor análogo da purina (ácido 6-tioinosínico). Provavelmente sua detecção foi devido ao uso de algum medicamento análogo ou metabólitos de purina utilizado no tratamento da LLA, como por exemplo a citarabina. Não conseguimos determinar a identidade química de 7 features (24%), nomeados como 'desconhecidos', com seus respectivos valores de  $m/z$  e RT descritos na Tabela 8.

#### 4.3.2 *Análises Estatísticas para os diferentes tempos de coleta do grupo LLA (T0, T1, T2, T3)*

Foi construído um gráfico de Heatmap com a finalidade de identificar visualmente possíveis tendências nos níveis dos metabólitos ao longo do tempo de coleta (T0, T1, T2 e T3) das amostras do grupo doente de LLA. O resultado dessa análise está demonstrado no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Mapa de calor (heatmap) dos 25 metabólitos mais relevantes selecionados a partir do PLS-DA para o grupo LLA nos tempos T0, T1, T2 e T3



Legenda: A cor vermelha está associada com maior intensidade e a cor azul associada com menor intensidade dos metabólitos. No lado direito do mapa nas linhas, está a relação dos metabólitos. No lado esquerdo está o dendrograma e na parte inferior do mapa a identificação das amostras. Abreviaturas: LPEO-20:4:2-(8-[3]-ladderane-octanyl)-sn-glycero-3-phosphoethanolamine; LysoPE(14:1):lisofosfatidiletanolamina(14:1); CDP-DG(22:6/20:2): citidina difosfato diacilglicerol. **Fonte:** Elaborado pelo autor.



#### 4.4 Grupo pacientes LMA – artigo submetido

### **ABORDAGEM ATRAVÉS DA METABOLÔMICA GLOBAL PARA ESTUDO DE METABÓLITOS PLASMÁTICOS EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Flávia Favretto<sup>1</sup>, Danila Felix Coutinho<sup>1</sup>, Olivia Brito de Oliveira Moreira<sup>3</sup>, Marcone Augusto Leal de Oliveira<sup>3</sup>, Adriana Nori de Macedo<sup>2</sup>, Adriano de Paula Sabino<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG) Brasil

<sup>3</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora (MG) Brasil

#### **Resumo**

**Objetivo:** A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença maligna agressiva e heterogênea das células progenitoras hematopoéticas. O fenótipo da LMA resulta de uma combinação de mutações oncogênicas, modificações epigenéticas e distúrbios metabólicos.

**Materiais e métodos:** Realizamos o estudo do perfil metabolômico no plasma de pacientes com LMA (n=26) comparado a um grupo de controles saudáveis (n=32), utilizando abordagem da metabolômica untargeted através da cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (LC-MS). Análises estatísticas quimiométricas (PCA e PLS-DA) e análise univariada Volcano plot foram utilizadas para selecionar os metabólitos discriminadores entre os grupos. Adicionalmente, realizamos coletas seriadas durante intervalo de tempo (~3 semanas) para avaliar perfil metabólico durante o curso da doença, o que foi feito utilizando análise de agrupamento combinada com heatmap. **Resultados:** Os achados demonstraram 30 principais metabólitos com intensidade aumentada no grupo LMA quando comparado ao grupo controle. Pertencentes a classe dos lipídios (esfingolipídios; ácidos graxos e glicerofosfolipídios), ácidos biliares, aminoácidos, nucleosídeos, medicamentos e alguns ainda desconhecidos. A partir do heatmap 25 principais metabólitos apresentando intensidade diminuída nos pacientes com LMA relacionados à classe dos ácidos dicarboxílicos e leucotrienos (leucotrienos B4 / B5) e com intensidade aumentada ácido taurocólico; esfingosina C17; derivados da vitamina D e ácido fosfatídico. **Conclusão:** O estudo mostrou evidências da relação desses metabólitos

com as vias biológicas relacionadas nos processos da regulação imunológica como a inflamação, atuação nas cascatas de sinalização RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, (mTOR), na angiogênese, processos de sinalização celular, metabolismo energético celular e da microbiota intestinal.

Palavras-chaves: metabolômica, cromatografia líquida-espectrometria de massas; leucemia mieloide aguda; vias metabólicas.

## 1 INTRODUÇÃO

A leucemia mieloide aguda (LMA) é uma doença maligna agressiva e heterogênea das células progenitoras hematopoéticas que resulta em alterações quantitativas e qualitativas das células sanguíneas, como hemácias, plaquetas e leucócitos, impulsionadas pelo acúmulo de anormalidades genéticas e epigenéticas (1). Essas alterações genéticas perturbam a diferenciação normal e/ou causam a proliferação excessiva de células leucêmicas imaturas anormais conhecidas como blastos ou (mieloblastos). À medida que a doença progride, as células blásticas acumulam-se na medula óssea, no sangue e nos órgãos interferindo na produção de células sanguíneas normais (2). A doença pode ocorrer em todas as idades, mas ocorre predominantemente em adultos (>60 anos de idade). A LMA normalmente se apresenta com um início rápido de sintomas, como fadiga, anemia, febre, infecções recorrentes, hematomas e sangramentos atribuíveis à insuficiência da medula óssea e pode ser fatal dentro de semanas ou meses quando não tratada (3). O fenótipo da LMA resulta de uma combinação de mutações oncogênicas, modificações epigenéticas e distúrbios metabólicos (4). Como exemplo, temos a identificação de mutações genéticas recorrentes em FLT3-ITD, NPM1 e CEBPA, envolvidas na ativação constitutiva de vias de sinalização, no crescimento e proliferação, que tem ajudado a refinar o prognóstico individual e orientar o manejo no tratamento (5). As alterações em genes envolvidos na regulação epigenética incluem mutações nos genes relacionados à metilação do DNA como o DNMT3A, TET2 e IDH-1 e IDH-2 (5) e os distúrbios em vias metabólicas mitocondriais importantes na biologia da LMA (6) e na rápida plasticidade metabólica das células da LMA para a sobrevivência e proliferação (7).

As mudanças no metabolismo celular e adaptação metabólica são características marcantes de muitos tipos de câncer, incluindo as leucemias (6). A

metabolômica que compreende a detecção e quantificação abrangente de metabólitos em sistemas biológicos oferece uma nova abordagem para interrogar a bioquímica dos processos, como a saúde e a doença (8). Metabólitos representam um grupo diversificado de estruturas de baixo peso molecular ( $< 1500$  Da), incluindo lipídios, aminoácidos, peptídeos, ácidos nucleicos, ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, aditivos alimentares, drogas, cosméticos, poluentes e outras substâncias que ingerimos, metabolizamos, catabolizamos ou entramos em contato, o que torna a análise global um desafio (9, 10). Metabólitos podem ser precursores, intermediários ou produtos dos processos celulares (11). Por isso, essas pequenas moléculas que são o produto final da expressão genética e proteica, que é o metaboloma, fornecem uma leitura direta da atividade bioquímica do estado de uma célula ou organismo e, portanto, podem fornecer informações vitais sobre o estado biológico de um sistema (12) (13). Em estudos metabolômicos untargeted que têm como objetivo determinar simultaneamente um grande número de metabólitos, embora existam várias plataformas analíticas que possam ser usadas, a técnica analítica cromatografia líquida seguida de espectrometria de massas (LC-MS) tem sido a técnica de escolha na maioria dos estudos, pois permite a cobertura de uma ampla gama de tipos de metabólitos com alta sensibilidade (13). Na LMA as células malignas estão dispersas na circulação interagindo com os órgãos e assim, exercendo uma influência na fisiologia de todo corpo. Em razão disso, mais estudos com diferentes abordagens são favoráveis para melhorar a compreensão da biologia da LMA (14). Por isso, a metabolômica está emergindo como uma ferramenta para caracterizar e analisar processos metabólicos em pacientes com câncer, ajudando na estratificação de risco, em identificar biomarcadores por meio da reconstrução de vias metabólicas perturbadas, como também apontar alvos viáveis para o desenvolvimento de medicamentos(15).

Nesse estudo, o perfil metabólico do plasma de paciente com LMA foi comparado com o de indivíduos saudáveis, utilizando abordagem da metabolômica untargeted baseada na LC-MS. Nosso objetivo foi identificar metabólitos diferenciadores entre o grupo doente e grupo saudável, fornecendo novos insights sobre as relações com as vias metabólicas, especialmente na LMA, como também avaliar o potencial desses metabólitos no diagnóstico, prognóstico ou no tratamento da doença.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Grupo de estudo

Este estudo incluiu 26 participantes (média= 42 anos e mediana= 38 anos, 11 homens e 15 mulheres) com LMA recrutados do Serviço Hematológico do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Geras no período de junho de 2020 até junho de 2022, com diagnóstico clínico-laboratorial confirmado baseado nas determinações laboratoriais do hemograma, imunofenotipagem e mielograma. A classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) dos pacientes com LMA (Material suplementar Tabela 1). Foram excluídos do estudo pacientes com diagnóstico de outros distúrbios linfoproliferativos, como leucemia prolinfocítica, leucemia de células pilosas, linfoma esplênico com linfócitos pilosos, leucemia plasmocítica, além dos linfomas Hodgkin e não-Hodgkin. Estes dados foram obtidos a partir da consulta aos prontuários dos pacientes.

O grupo controle foi constituído de 32 voluntários saudáveis (média e mediana = 40 anos, 12 homens e 20 mulheres). Os critérios de inclusão foram não ter histórico médico precedente para qualquer tipo câncer, como também não apresentar sintomas como febre, calafrios, dor de garganta, dor de cabeça, tosse, coriza e fraqueza no momento da coleta. A permissão de coleta foi concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais - COEP, Projeto CAAE Nº 02177612.0.0000.5149 e o termo de consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes.

### 2.2 Coleta de amostras e planejamento experimental

As amostras de plasma foram coletadas com sistema VACUETTE® (Greiner Bio-One), sendo 4,0 mL (adultos) e 0,5 mL (crianças) em EDTA K3. As amostras foram coletas com tempo de jejum variado em função da dinâmica do horário de alimentação dos pacientes dentro do ambiente hospitalar. As amostras foram centrifugadas a 1000g, por 10 minutos à temperatura ambiente para retirada imediata do plasma sobrenadante. Alíquotas de 200 µL foram congeladas em tubo do tipo eppendorf durante uma semana em freezer -20°C e posteriormente, transferidas para um freezer -80°C até o momento do seu processamento.

Foram coletadas do mesmo paciente amostras seriadas de sangue periférico durante um intervalo de tempo (~3 semanas), sendo considerado como tempo T0 amostra coletada no período próximo ao diagnóstico da doença, T1 (~7 dias após diagnóstico), T2 (~ 14 dias após diagnóstico) e T3 (~21 após diagnóstico).

### 2.3 Parâmetros séricos e do hemograma

As contagens do hemograma foram realizadas usando o equipamento HORIBA Yumizen H2500. As concentrações séricas de ureia, creatinina, ácido úrico, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamyl transferase (GGT) e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas usando o método de química seca analisador VITROS® XT 7600 (Ortho Clinical Diagnostics, Johnson and Johnson, Raritan, NJ, USA). Os resultados dos exames laboratoriais foram obtidos através da consulta ao prontuário médico.

### 2.4 Análise metabolômica global: produtos químicos e reagentes

Metanol (álcool metílico absoluto HPLC, da BIOGRADE®), etanol grade gradiente da LiChrosolv® (Merck®), acetonitrila HPLC-S (Acetonitrile hypergrade for LC-MS LiChrosolv®, Merck®) e o ácido fórmico para LC-MS LiChropur® foi da (Merck®). Foi utilizado um padrão interno (F-Phe: p-Fluoro-DL-phenylalanine da Sigma-Aldrich®), 240 mg/L em metanol. A água utilizada foi ultrapura Tipo I (Ultra Purificador de água Master System MS3000-Gehaka®).

### 2.5 Preparo da amostra

Foi utilizado o protocolo de preparo das amostras, conforme reportado por Delgado *et al.*(16), que consistiu basicamente em uma etapa de desproteinização com solvente orgânico seguida de centrifugação. Primeiramente, as amostras foram descongeladas à frio (em banho de gelo) por aproximadamente 2 horas. Após completo descongelamento, foram homogeneizadas em agitador vórtex. Em um tubo do tipo *ependorf* foi colocado 100 µL de plasma com 300 µL de metanol:etanol (1:1, v/v) à frio (-20°C) e 20 µL da solução a 240 mg/L do padrão interno. O padrão interno utilizado foi a p-fluoro-DL-fenilalanina (F-Phe), que foi adicionado em cada amostra

para monitorar as variações durante a análise, incluindo a etapa de preparo da amostra. O padrão F-Phe ( $C_9H_{10}FNO_2$ ) aparece no modo positivo como  $[M+H]^+$  com  $m/z = 184.0768$  e no modo negativo como  $[M-H]^-$  com  $m/z = 182.0623$ . O padrão interno utilizado teve como objetivo ter uma substância de referência, presente em todas as corridas na mesma concentração. Em seguida as amostras foram misturadas em vórtex (30 segundos), mantidas em gelo por 5 min e centrifugadas a  $16110 \times g$  por 20 min a  $4^\circ C$ . Após a centrifugação foi transferido 100  $\mu L$  de sobrenadante para um insert de vidro, dentro do vial, fechado com tampa de rosca e mantidas congeladas a  $-80^\circ C$  até o momento da realização da análise no LC-MS.

O preparo e análise das amostras foram realizados em ordem aleatória, conforme definido pela função de geração de números aleatórios no Excel (Microsoft Office 365), com objetivo de não dar preferência ou escolha intencional em nenhuma amostra na hora do preparo e na sua análise instrumental.

## 2.6 Análise LC-MS

As amostras de plasma foram analisadas usando a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) Agilent HPLC (série 1260 Infinity II) analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) (Agilent Technologies®, series 6530). A fonte de íons foi do tipo *electrospray* de jato duplo (dual AJS ESI) com tecnologia de funil de íons (Agilent Technologies®, EUA). Para a separação cromatográfica, foi injetado 8  $\mu L$  de cada amostra na coluna de fase reversa Kinetex® F5, 5  $\mu m$ , 100 Å, 150 x 4.6 mm (Phenomenex Inc., EUA), a  $40^\circ C$  com eluição gradiente. A taxa de fluxo foi ajustada em 0,6 mL/min, com parada da corrida em 24 min. O gradiente de eluição envolveu uma fase móvel consistindo numa mistura das soluções: Fase (A) água com 0,1% v/v de ácido fórmico e Fase (B) acetonitrila com 0,1% v/v de ácido fórmico. O gradiente foi definido da seguinte forma para modo negativo e modo positivo: de 0 a 15 min, fase B foi aumentada de 1 a 99%, sendo mantida a 99% para limpeza da coluna; de 15 a 19 min, retornando a 1% de fase B até 19.5 min, permanecendo nessa condição até 24 min para reequilibrar a coluna para a próxima corrida.

O efluente da coluna foi desviado para o descarte no início da separação cromatográfica (0 a 1.5 min) e no final (19.0 a 24.0 min), a fim de preservar a limpeza das partes frontais do MS com partes da separação que não fornecem informações

úteis sobre a amostra (i.e., compostos praticamente não retidos ou que saem apenas na etapa de reequilíbrio da coluna).

O experimento foi medido em ionização por *eletrospray* nos modos negativo e positivo (ESI<sup>-</sup> e ESI<sup>+</sup>, respectivamente). A descrição completa das características instrumentais, preparação dos QC e aquisição dos dados são apresentadas no material suplementar 2.

## 2.7 Análise estatística

A aquisição dos dados no modo negativo gerou 4.241 *molecular features* e no modo positivo gerou 6.688 features. Foram detectados 3,7% de *missing values*. Na sequência foram removidos os features com valores ausentes com >50% *missing values*, seguido de substituição dos valores faltantes por 1/5 do menor valor positivo de cada variável. Em seguida, foram removidos os features com desvio padrão relativo (RSD) > 25% em relação às áreas de pico nos QCs (foram utilizados 32 QCs). O objetivo dessa filtragem de dados foi identificar e remover variáveis que provavelmente não seriam úteis na modelagem dos dados. Os resultados gerados a partir da etapa de processamento de dados foram normalização por mediana, transformação logarítmica (base 10) e escalonamento de Pareto. Em seguida foram submetidos à análise estatística multivariada, por meio de análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Posteriormente foi realizada análise univariada através do teste de *Mann-Whitney* combinado com *fold-change* (LMA/controle), que foi apresentado como um Volcano plot. PCA foi usado para investigar as tendências de agrupamento das amostras e QCs, e PLS-DA foi usado para avaliar a classificação entre dois grupos. A análise de cluster foi realizada através agrupamento hierárquico combinado com *heatmap*. Foram selecionados como discriminantes os *moleculares features* que apresentaram concomitantemente *Variable Importance Projection* (VIP) > 2, P-value < 0.01 no teste de Mann-Whitney, com correção para *false discovery rate* (FDR), e *fold-change* ≥ 5 entre os grupos. Essas análises foram executadas no MetaboAnalyst® 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) (17). A anotação dos metabólitos foi realizada com base em valores de *m/z* de alta resolução, plausibilidade biológica e padrão de distribuição isotópica (Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis version 10.0) consultados no banco de dados of CEU Mass Mediator

(<http://ceumass.eps.uspceu.es/>) (18) the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (<https://www.genome.jp/kegg/>) and HMDB database (<https://hmdb.ca/metabolites>) (19). Para analisar as variáveis quantitativas, obtidas a partir do exame hemograma e das dosagens séricas dos parâmetros bioquímicos, foi utilizado o software Graphpad Prism® versão 9.0.0. Para testar a significância estatística das diferenças entre os grupos teste não paramétrico de Mann Whitney.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 População estudada e características basais

Nesse estudo foram utilizadas amostras de 26 participantes do Serviço Hematológico do Hospital das Clínicas de Minas Gerais e 32 amostras de indivíduos como controles saudáveis. Variações estatisticamente significativas foram observadas entre os diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2, T3) dos participantes com LMA, em relação aos parâmetros laboratoriais contagem de leucócitos, neutrófilos, porcentagem de blastos, hemoglobina e ácido úrico ( $p < 0.05$ ). Dados basais dos participantes do estudo, bem como marcadores clínicos laboratoriais estão resumidos na **Tabela 1**.

**Tabela 1** – Dados demográficos e clínicos dos participantes

| Parâmetros                                   | LMA                    | Grupo controle       | p*                    |                     | p**   |
|----------------------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|-------|
| Sexo (F/M)                                   | 15/11                  | 20/12                | 0.561                 |                     |       |
| Idade (anos), mediana                        | 38 (1- 85)             | 40 (16 - 66)         | 0.916                 |                     |       |
| Marcadores laboratoriais                     |                        |                      |                       |                     |       |
| Tempos de coleta                             | T0                     | T1                   | T2                    | T3                  |       |
| WBC ( $10^9/L$ ), mediana (range)            | 21.06<br>(0.67-320.50) | 1.59<br>(0.05-85.67) | 1.52<br>(0.17-81.73)  | 1.19<br>(0.09-7.39) | <0.05 |
| NEU ( $10^9/L$ ), Mediana (range)            | 1.69<br>(0.22-110.30)  | 0.29<br>(0.01-9.17)  | 0.45<br>(0.01-4.20)   | 0.69<br>(0.03-4.96) | <0.05 |
| Blastos periféricos (PB) (%), mediana(range) | 36.79<br>(23.71-94.0)  | 5.66<br>(1.54-52.0)  | 10.45<br>(0.92-21.82) | 6.17<br>(0.0-16.85) | <0.05 |
| Hemoglobina (g/dL), Mediana (range)          | 6.9<br>(2.3-10.7)      | 7.8<br>(6.2-11.6)    | 8.2<br>(6.3-11.9)     | 8.5<br>(6.7-12.3)   | <0.05 |



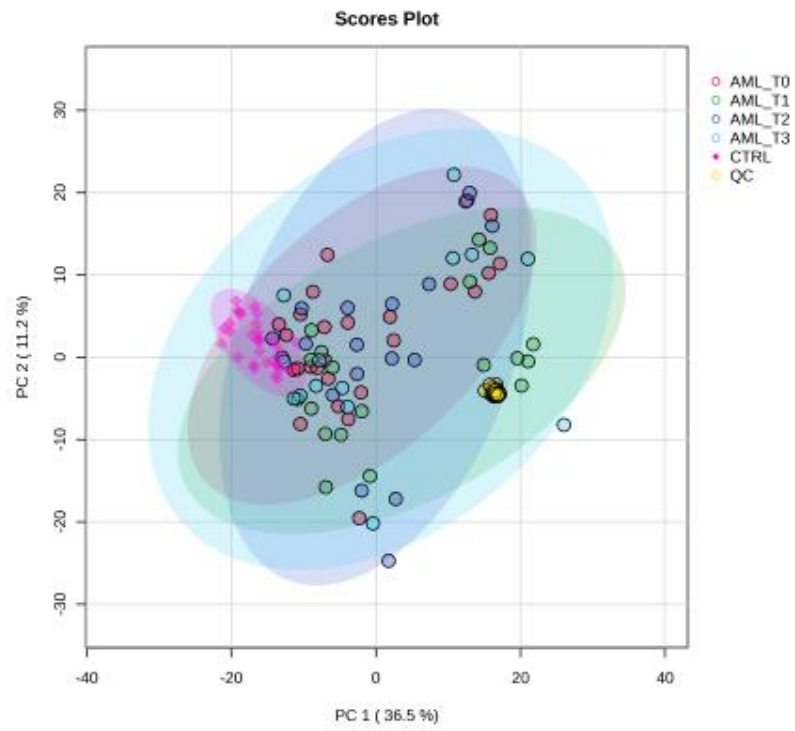
|                                                                                                                             |                     |                     |                     |                     |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------|
| Plaquetas (10 <sup>9</sup> /L),<br>mediana(range)                                                                           | 32<br>(10-204)      | 49<br>(2-144)       | 32<br>(7-151)       | 97<br>(6-253)       | 0.158 |
| Ureia (mg/dL),<br>mediana(range)                                                                                            | 33<br>(4-222)       | 27<br>(8-58)        | 28<br>(11-106)      | 22<br>(5-80)        | 0.302 |
| Creatinina (mg/dL),<br>Mediana (range)                                                                                      | 0.68<br>(0.20-1.35) | 0.52<br>(0.29-1.11) | 0.53<br>(0.20-1.63) | 0.61<br>(0.17-1.19) | 0.135 |
| Ácido úrico (mg/dL),<br>Mediana (range)                                                                                     | 4.4<br>(1.4-8.5)    | 2.4<br>(0.9-4.6)    | 1.9<br>(0.7-4.7)    | 3.2<br>(2.9-3.5)    | 0.008 |
| LDH (U/L),<br>Mediana (range)                                                                                               | 844<br>(338-16412)  | 440<br>(193-5803)   | 865<br>(635-1912)   | -                   | 0.423 |
| ALT (U/L),<br>Mediana (range)                                                                                               | 24<br>(12-494)      | 32<br>(6-99)        | 30<br>(14-176)      | 27<br>(6-170)       | 0.402 |
| AST (U/L),<br>Mediana (range)                                                                                               | 38<br>(20-337)      | 32<br>(18-68)       | 32<br>(15-165)      | 31<br>(7-108)       | 0.715 |
| ALP (U/L),<br>Mediana (range)                                                                                               | 92<br>(48-279)      | 100<br>(57-305)     | 126<br>(14-301)     | 112<br>(53-242)     | 0.785 |
| GGT (U/L),<br>mediana(range)                                                                                                | 73<br>(11-589)      | 218<br>(12-306)     | 122<br>(30-830)     | 131<br>(26-256)     | 0.672 |
| Grupo citogenético (%)<br>Favorável:<br>17 (65.39%)<br>Intermediário:5 (19.23%)<br>Adverso: 0 (%)<br>Não avaliado:4(15.38%) |                     |                     |                     |                     |       |
| Categorias de Perfil de Molecular.<br>BCR-ABL 85% não detectado<br>5% não realizado                                         |                     |                     |                     |                     |       |
| CBFB-MYH11<br>42% não detectado<br>12% detectado<br>46% não realizado                                                       |                     |                     |                     |                     |       |
| RUNX1/RUNX1T1<br>42% não detectado<br>15% detectado<br>43% não realizado                                                    |                     |                     |                     |                     |       |
| Duplicação FLT3 gene<br>57% não detectado<br>19% detectado<br>23% não realizado                                             |                     |                     |                     |                     |       |
| NPM1 gene mutação<br>69% não detectado<br>8% detectado<br>23% não realizado                                                 |                     |                     |                     |                     |       |

**Nota:**\*P-valor foram calculados por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney para variáveis contínuas e do teste Qui-quadrado para variáveis categóricas. Valores de p \*\* Teste de Kruskal-Wallis.  
**Abreviações:** WBC: glóbulos brancos; NEU: neutrófilos; LDH: lactato desidrogenase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; GGT: gama-glutamyl transferase.

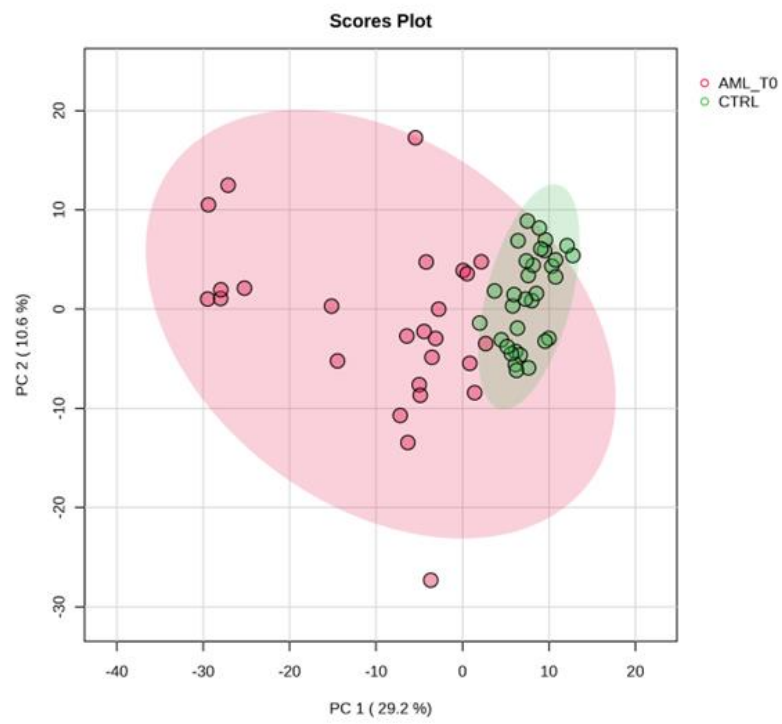
### 3.2 Análise multivariada

Inicialmente, usamos o *PCA scores plot* para descrever o reconhecimento de padrões e tendências do grupo LMA (das amostras coletadas em todos os tempos T0, T1, T2, T3), grupo controle e QCs (**Fig.1A**). O resultado do PCA com totalidade das amostras revelou um agrupamento das amostras do grupo controle e dos QC, mas uma maior dispersão das amostras dos pacientes coletadas em diferentes tempos. Observa-se também um forte agrupamento dos QCs, demonstrando boa estabilidade do sistema LC-MS no decorrer da sequência analítica. No entanto, quando realizamos o PCA com o grupo doente LMA (T0) e o grupo controle observamos uma separação entre os grupos (**Fig.1B**). Na sequência das análises os resultados foram avaliados pelo modelo supervisionado do PLS-DA (**Fig. 1C**) a condução desse modelo foi para revelar diferenças de metabólitos entre grupo controle e grupo doente no início da doença (LMA T0). Em particular, na avaliação de dados metabolômicos o PCA tem sido o método de escolha para obter uma visão geral, encontrar clusters e para identificar outliers e o modelo supervisionado PLS-DA para maximizar a separação das classes e identificar potenciais metabólitos diferenciadores entre duas classes (20). Através do modelo PLS-DA foi possível alcançar uma clara separação entre grupo controle e grupo doente com LMA. Em nossa análise, o PLS-DA validação cruzada mostrou bom desempenho, com  $R^2=0.971$  and  $Q^2=0.835$  com 04 componentes principais, indicando um risco relativamente pequeno de overfitting. No geral, quanto mais próximo de 1 é o valor de  $R^2$ , melhor é o grau de ajuste do modelo aos dados experimentais e quanto mais próximo de 1 é  $Q^2$ , melhor é a habilidade de predição do modelo (21). Os valores usuais para  $R^2$  e  $Q^2$  obtidos em experimentos biológicos são  $Q^2 \geq 0,4$  e  $R^2 \geq 0,7$  (22).

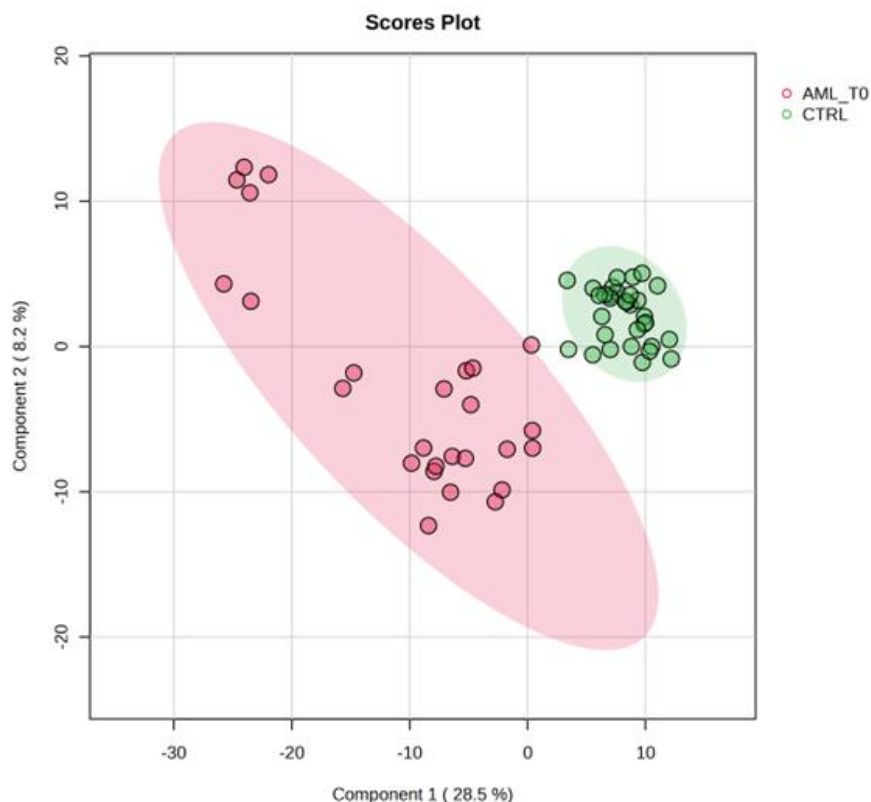
A)



B)



C)



**Fig. 1.** PCA scores plot and PLS-DA scores plot amostras nos modos de polaridade positiva e negativa **A)** PCA scores plot com amostras pacientes LMA (tempos de coleta T0; T1; T2; T3), grupo controle e QC (LMA patients: T0 = círculo vermelho; T1= círculo verde; T2= círculo azul escuro; T3 = círculo azul claro); QC= círculo amarelo; grupo controle = diamante rosa). **B)** PCA scores plot com amostras pacientes LMA (tempo coleta T0) e grupo controle (Pacientes com LMA: círculo vermelho; controles saudáveis: círculo verde). As amostras LMA(T0) e grupo controle tiveram um bom padrão de separação. **C)** Scores plot of PLS-DA mostrando uma discriminação visual do metaboloma entre os pacientes com LMA (T0) e grupo controle.  $R^2=0.971$  and  $Q^2=0.835$ .

A partir do modelo do PLS-DA, foram selecionados 30 principais metabólitos (07 negative polarity and 23 positive polarity baseado nos valores  $VIP > 2.0$ ), como metabólitos importantes na contribuição da diferenciação entre dois grupos analisados grupo dos pacientes no início da doença LMA(T0) e grupo controle.

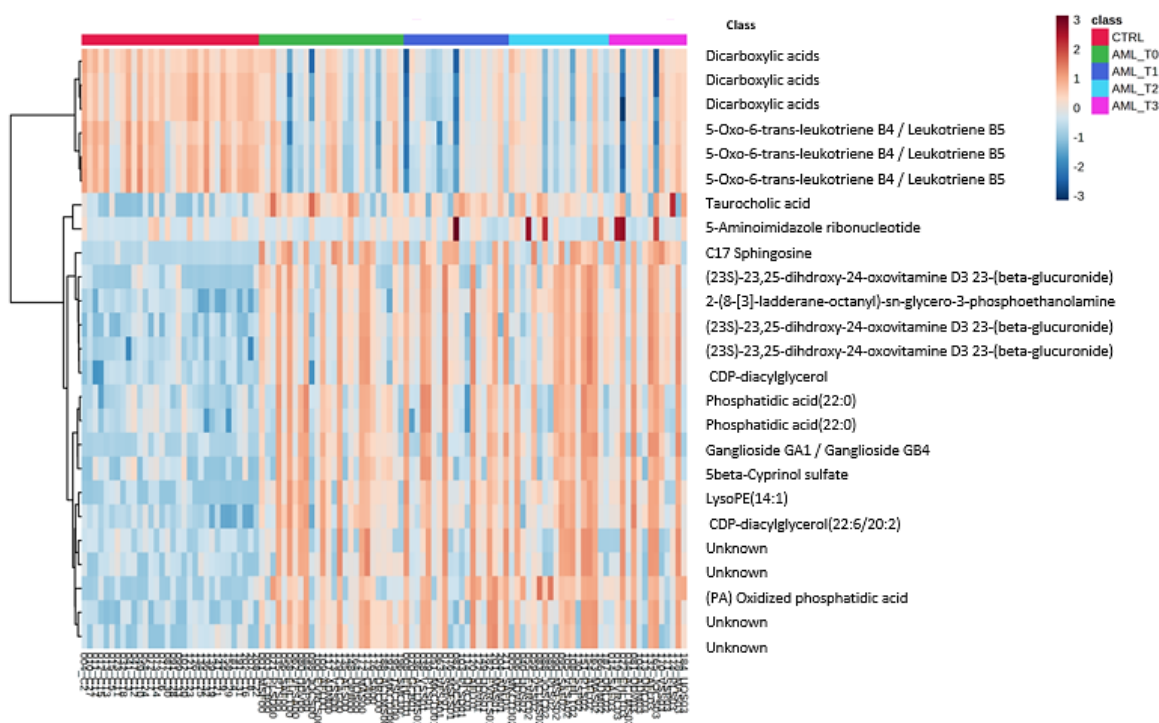
### 3.2.1 Análise Univariada

Posteriormente da análise quimiométrica, um Volcano plot foi construído, combinando resultados *fold-change* análise e teste Mann-Whitney. Os 30 metabólitos previamente selecionados pelo  $VIP$  score do PLS-DA também foram considerados significativamente diferentes nos dois grupos pela análise univariada ( $p < 0.01$  and *fold-change*  $> 5.0$ ) entre o grupo LMA e o grupo controle (**Tabela 2**). As características

dos 30 principais metabólitos diferencialmente abundantes nos modos de polaridade positiva/negativa são mostradas na **Tabela 2**. A distribuição das classes que contribuíram para separação entre grupo LMA (T0) e grupo controle foram os seguintes compostos: 30,00 % lipídios (esfingolipídios; ácidos graxos e glicerofosfolipídios), 6,67% imunossupressores, 6,67% antimicrobianos, 6,67% ácidos biliares, 3,33% aminoácidos, 3,33% nucleosídeos, 3,33% anti-histamínicos e 40,00% desconhecidos.

### 3.2.2 Análise de Cluster

O agrupamento hierárquico dos metabólitos que aparecem como diferenciadores entre os diferentes tempos de coleta das amostras dos pacientes (T0, T1, T2, T3) foi realizado através do Heatmap, mostrando os 25 principais metabólitos top, ilustrado na **Fig.2** (material suplementar, Tabela 3).



**Fig.2.** Heatmap dos top 25 metabólitos diferenciadores a partir da comparação estatística do PLS-DA VIP entre o grupo controle e o grupo LMA nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2, T3). Em vermelho indica intensidade aumentada do metabólito e azul indica intensidade diminuída do metabólito. As colunas representam as amostras e as linhas os metabólitos.

**Tabela 2** – Caracterização dos 30 metabólitos plasmáticos diferenciadores entre LMA T0 e grupo controle.

| No. | Identidade postulada                           | Classe Química                   | m/z      | Massa exata (Da) | erro (ppm) | RT (min) | Composição molecular                                                          | íon aduto               | VIP  | Fold Change <sup>a</sup> | P valor <sup>b</sup> | Intensidade |
|-----|------------------------------------------------|----------------------------------|----------|------------------|------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------|--------------------------|----------------------|-------------|
| 1   | 6-Thioinosinic acid                            | Purine nucleosides               | 283.0399 | 284.0579         | 38         | 7.50     | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S               | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.71 | 58.52                    | 4.07E-06             | ↑           |
| 2   | C17 Sphingosine                                | Sphingolipids                    | 320.2303 | 285.2668         | 21         | 13.91    | C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>2</sub>                               | [M+Cl] <sup>-</sup>     | 2.30 | 72.55                    | 8.82E-08             | ↑           |
| 3   | Beta-lactam antibiotics                        | Carboxylic acids and derivatives | 379.1150 | 380.1042         | 48         | 7.61     | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S               | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.78 | 24.33                    | 3.15E-06             | ↑           |
| 4   | Se-Adenosylselenohomocysteine                  | 5'-deoxyribonucleosides          | 431.0770 | 432.0660         | 42         | 6.96     | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> Se              | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.73 | 50.29                    | 7.69E-06             | ↑           |
| 5   | Fluoroquinolone antibiotic agent               | Quinolines and derivatives       | 436.1364 | 401.1751         | 20         | 7.36     | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>                | [M+Cl] <sup>-</sup>     | 2.83 | 19.99                    | 7.06E-06             | ↑           |
| 6   | Unknown                                        |                                  | 483.1491 |                  |            | 9.68     |                                                                               |                         | 2.98 | 145.71                   | 1.95E-08             | ↑           |
| 7   | Taurocholic acid                               | Bile acids                       | 516.2841 | 515.2917         | 3          | 9.99     | C <sub>26</sub> H <sub>45</sub> NO <sub>7</sub> S                             | [M-H] <sup>-</sup>      | 2.27 | 29.65                    | 2.08E-07             | ↑           |
| 8   | Propionylcarnitine                             | Fatty Acyls                      | 218.1307 | 217.1314         | 37         | 6.41     | C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>                               | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.65 | 16.06                    | 1.95E-06             | ↑           |
| 9   | Phenylacetylglutamine                          | Carboxylic acids and derivatives | 264.1185 | 263.1037         | 28         | 7.76     | C <sub>13</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                 | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.24 | 5.71                     | 7.01E-05             | ↑           |
| 10  | Unknown                                        |                                  | 404.5590 |                  |            |          |                                                                               |                         | 2.23 | 25.34                    | 7.13E-08             | ↑           |
| 11  | LysoPE(14:1)                                   | Glycerophospholipids             | 424.2324 | 423.2386         | 32         | 7.10     | C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>7</sub> P                             | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.76 | 58.51                    | 1.44E-09             | ↑           |
| 12  | Ganglioside GA1 (d18:1/18:0) / Ganglioside GB4 | Sphingolipids                    | 426.5791 | 1254.7812        | 38         | 7.49     | C <sub>62</sub> H <sub>114</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub>               | [M+2H+Na] <sup>3+</sup> | 2.42 | 54.33                    | 1.25E-07             | ↑           |
| 13  | Unknown                                        |                                  | 457.5751 |                  |            | 6.17     |                                                                               |                         | 2.15 | 121.8                    | 7.13E-08             | ↑           |
| 14  | LPE O-20:4                                     | Glycerophospholipids             | 488.3213 | 487.3063         | 16         | 7.67     | C <sub>25</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>6</sub> P                             | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.25 | 23.00                    | 7.13E-08             | ↑           |
| 15  | Dimenhydrinate                                 | Antihistamines                   | 492.1736 | 469.1881         | 8          | 7.08     | C <sub>24</sub> H <sub>28</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub>               | [M+Na] <sup>+</sup>     | 2.39 | 24.50                    | 2.39E-06             | ↑           |
| 16  | 6-Thioguanosine-5'-O-triphosphate              | Purine nucleotides               | 522.0228 | 521.0114         | 8          | 7.52     | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub> | [M+H] <sup>+</sup>      | 2.11 | 25.42                    | 1.55E-07             | ↑           |
| 17  | CDP-diacylglycerol (CDP-DG)                    | Glycerophospholipids             | 539.2902 | 1075.5299        | 15         | 7.09     | C <sub>54</sub> H <sub>83</sub> N <sub>3</sub> O <sub>15</sub> P <sub>2</sub> | [M+2H] <sup>2+</sup>    | 2.46 | 35.51                    | 1.38E-07             | ↑           |
| 18  | 5beta-Cyprinol sulfate                         | Bile acids                       | 555.3063 | 532.307          | 19         | 7.27     | C <sub>27</sub> H <sub>48</sub> O <sub>8</sub> S                              | [M+Na] <sup>+</sup>     | 2.15 | 18.56                    | 2.16E-05             | ↑           |
| 19  | Unknown                                        |                                  | 590.0368 |                  |            | 7.15     |                                                                               |                         | 2.17 | 15.27                    | 9.90E-08             | ↑           |

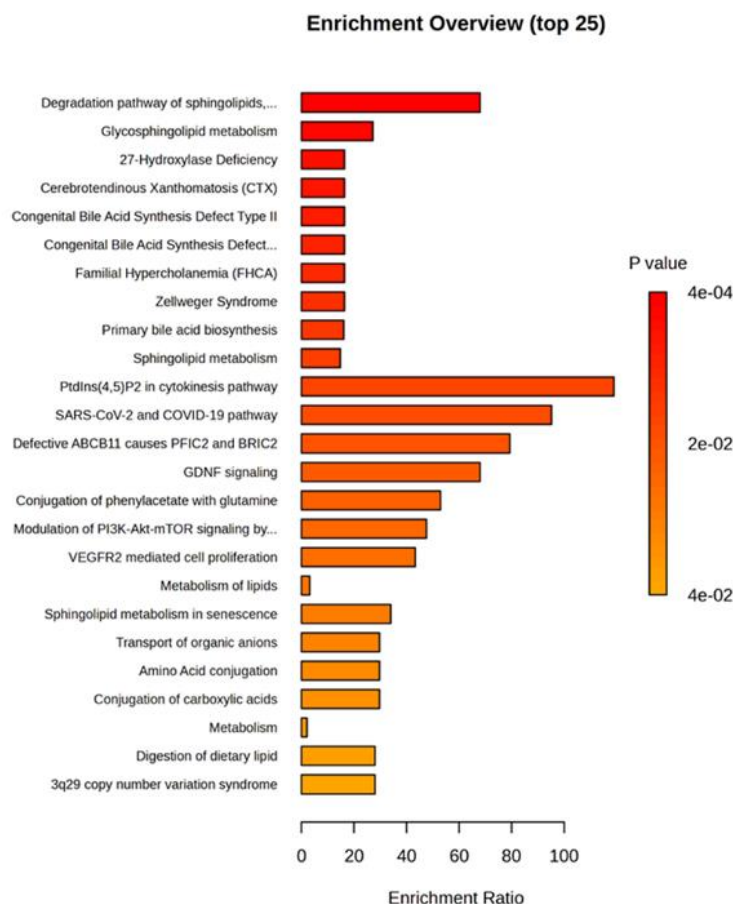
|    |                             |                      |          |           |    |      |                                                                                |                                      |      |       |          |   |
|----|-----------------------------|----------------------|----------|-----------|----|------|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|------|-------|----------|---|
| 20 | Oxidized CDP-diacylglycerol | Glycerophospholipids | 606.3336 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.30 | 24.47 | 1.35E-08 | ↑ |
| 21 | Oxidized CDP-diacylglycerol | Glycerophospholipids | 607.3363 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.46 | 27.05 | 1.35E-08 | ↑ |
| 22 | Unknown                     |                      | 632.1342 |           |    | 7.63 |                                                                                |                                      | 2.26 | 18.95 | 1.35E-07 | ↑ |
| 23 | Unknown                     |                      | 645.5024 |           |    | 7.90 |                                                                                |                                      | 2.21 | 23.65 | 5.77E-08 | ↑ |
| 24 | Oxidized CDP-diacylglycerol | Glycerophospholipids | 653.3077 | 1193.6505 | 20 | 7.67 | C <sub>57</sub> H <sub>101</sub> N <sub>3</sub> O <sub>19</sub> P <sub>2</sub> | [M+H+NH <sub>4</sub> ] <sup>2+</sup> | 2.31 | 24.96 | 3.40E-07 | ↑ |
| 25 | Unknown                     |                      | 686.0214 |           |    | 7.68 |                                                                                |                                      | 2.12 | 51.99 | 8.20E-07 | ↑ |
| 26 | Unknown                     |                      | 774.0005 |           |    | 7.90 |                                                                                |                                      | 2.36 | 18.73 | 4.20E-09 | ↑ |
| 27 | Unknown                     |                      | 774.2006 |           |    | 7.90 |                                                                                |                                      | 2.63 | 30.77 | 5.94E-10 | ↑ |
| 28 | Unknown                     |                      | 823.0230 |           |    | 7.68 |                                                                                |                                      | 2.35 | 61.70 | 1.95E-08 | ↑ |
| 29 | Unknown                     |                      | 823.4240 |           |    | 7.68 |                                                                                |                                      | 2.22 | 37.03 | 1.67E-10 | ↑ |
| 30 | Unknown                     |                      | 823.8247 |           |    | 7.69 |                                                                                |                                      | 2.12 | 19.79 | 1.86E-07 | ↑ |

**Nota:** <sup>a</sup> Fold change was calculated direction of comparison LMA (T0) /CTRL. <sup>b</sup> P value corrigido para FDR. <sup>c</sup> ↑ Increased intensity in the LMA T0 group.

### 3.3 Análise das vias metabólicas

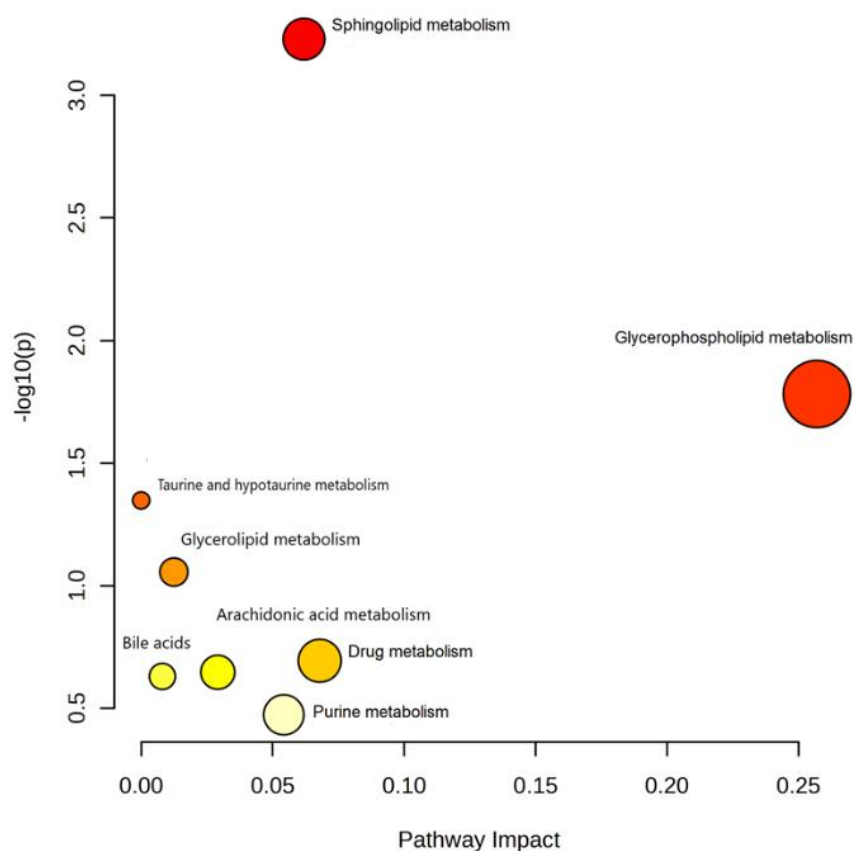
Com objetivo de explorar e examinar o impacto dos metabólitos diferenciadores revelados (Tabela 2 and Fig.2) no enriquecimento das vias metabólicas foi realizada essa análise conduzida através da plataforma online MetaboAnalyst 6.0 (<http://www.metaboanalyst.ca>). Pathway based from RaMP (integrating HMDB, KEGG, Reactome, WikiPathways), análise revelou que os metabólitos diferenciais estavam associados com vias biológicas importantes da LMA ( $p < 0.05$ ) como metabolismo de lipídios, metabolismo esfingolipídico, biossíntese de ácidos biliares, modulação da PI3K-Akt-mTOR, proliferação celular mediada por VEGFR2 entre outras, mostrado na **Fig.3A**. Quando comparamos e enriquecemos o conjunto de todos os metabólitos apontados, a partir vias do KEGG mostram que esses metabólitos participam de vias envolvidas no metabolismo esfingolipídio, metabolismo glicerofosfolipídios, metabolismo de purinas, metabolismo de drogas, metabolismo do ácido araquidônico, metabolismo da taurina e ácidos biliares, como mostrado na **Fig. 3B**.

A





B



**Fig.3.** Resultados da Análise de Enriquecimento demonstrando o impacto/perturbações biológicas dos metabólitos diferenciais nas vias biológicas. **A)** Vias metabólicas alteradas pelas vias do RaMP. **B)** Metabolismo alterado pelas vias da base do KEGG.

## 4 DISCUSSÃO

Neste estudo foi aplicado a abordagem da metabolômica untargeted, utilizando LC-MS, com objetivo de relevar metabólitos discriminadores no plasma de pacientes com LMA quando comparados a um grupo controle. Primeiramente discutiremos os metabólitos revelados nas amostras coletadas no tempo (T0) quando comparados com o grupo controle. Na sequência os metabólitos apontados através da análise do heatmap das amostras coletadas de forma seriada nos tempos (T0, T1, T2 e T3).

### 4.1 Metabólitos revelados no estágio inicial da doença (T0)

A partir da análise do PCA scores plot já foi observado uma diferença entre o grupo controle e os pacientes, no entanto foi na análise do modelo discriminante do

PLS-DA ( $R^2=0.971$  and  $Q^2=0.835$ ) que claramente exibiu essa forte separação entre os grupos (Fig.1B, Fig.1C). Depois de sistemática seleção foram identificados 30 principais metabólitos nas amostras de plasma no tempo (T0), com VIP score  $> 2$  obtidos do modelo PLS-DA, igualmente apontados pelo Volcano plot, (Informação suplementar Fig.1).

com valores de *fold-change* na faixa de 5.00 a 145.71, ou seja, cerca de 5 a 145 vezes aumentados no grupo LMA T0 em relação ao controle, como mostrado na Tabela 2. Entre os 30 metabólitos identificados, obtivemos a seguinte distribuição das classes 30.00 % lipídios (esfingolipídios; ácidos graxos e glicerofosfolipídios), 6,67% imunossupressores, 6,67% antimicrobianos, 6,67% ácidos biliares, 3,33% aminoácidos, 3,33% nucleosídeos, 3,33% anti-histamínicos e 40,00% ainda desconhecidos.

Os achados mostraram um aumento de nove diferentes tipos de lipídios, sendo: dois pertencentes à classe dos esfingolipídios (C17 esfingosina e gangliosídeo GA1 (d18:1/18:0) /gangliosídeo GB4); um da classe dos ácidos graxos (propionilcarnitina) e seis da classe glicerofosfolipídios (LysoPE (14:1); LPE O-20:4; CDP-diacilglicerol e CDP-diacilglicerol oxidado) (Tabela 2).

A desregulação do metabolismo de lipídios tem sido associada com a várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, diabetes e outras doenças de distúrbios metabólicas, bem como exposições tóxicas e perturbações ambientais (23). Esfingosina é formada a partir da degradação de esfingolipídios complexos, como a ceramida, posteriormente fosforilada em esfingosina 1-fosfato (S1P) pela enzima, esfingosina quinase (SK). S1P regula processos como a inflamação, que podem impulsionar a tumorigênese, através da estimulação da angiogênese, fornecendo nutrientes e oxigênio às células cancerígenas para seu crescimento e sobrevivência celular, evidenciando o papel importante dos receptores S1P no câncer de tumores sólidos e hematológicos (24). S1P exerce uma infinidade de efeitos na fisiologia e patologia celular através dos seus cinco receptores S1P (S1PRs), sendo que esses receptores estão acoplados a subtipos distintos de  $\alpha$  proteína G. A ativação dos S1PRs e, a consequente estimulação da proteína G associada, regulam vias distintas de sinalização, incluindo Rac, Ras–ERK, PI3K–AKT–Rac, fosfolipase C (PLC) and Rho (25). Na LMA a maioria dos pacientes apresenta ativação das cascatas de sinalização RAF/MEK/ERK e PI3K/AKT, resultando em maior proliferação e sobrevivência de células progenitoras hematopoiéticas (26). Neste estudo foi

apontado a elevação dos níveis de C17 esfingosina no plasma dos pacientes, levando à hipótese se esse metabólito poderia contribuir como ativador para aumentar os níveis do S1P e assim, provocar ativação anormal das vias de sobrevivência e crescimento dessas células leucêmicas.

Outro metabólito detectado no estudo foi o gangliosídeo GA1 (d18:1/18:0) /gangliosídeo GB4. Não foi possível a separação na sua identificação por causa da similaridade na distribuição isotópica. Os gangliosídeos estão localizados principalmente na camada externa das membranas celulares. Estas moléculas estão envolvidas em muitos processos fisiológicos, incluindo crescimento, diferenciação, migração e apoptose através da modulação de processos de sinalização celular e interações célula-célula e, também participam na resposta inflamatória (27). Mudanças na expressão de certas espécies de gangliosídeos ocorrem durante a proliferação, diferenciação e ontogênese celular. Tumores, como melanoma, câncer de pulmão, sarcoma e neuroblastoma liberam gangliosídeos para o meio extracelular, modificam a composição da membrana das células do sistema imunológico e assim conseguem induzir modificações que modulam a imunidade inata e adaptativa, favorecendo assim, o escape do tumor (28). Alterações na síntese de glicoesfingolipídios também foram observadas nos pacientes de LMA t (8;21) com aumento do gangliosídeo GM3, e nos pacientes com t(8;21) e inv16 do globosídeo GB4 em estudo conduzido por Stefanko, Adam, et al.2017 (29). A elevação do gangliosídeos dos GA1/GB4 detectada no plasma dos pacientes com LMA nesse estudo, será que poderia auxiliar como indicador da proliferação celular ou contribuir como marcador da resposta imune?

Uma das características de muitos tumores incluindo malignidades hematológicas, é o aumento da lipogênese, decorrente do aumento das atividades das enzimas (Acc1, Fasn and Scd1) na formação dos ácidos graxos para acelerar o seu crescimento (29). Vários estudos já demonstraram diferentes regulações (para baixo/para cima) no metabolismo de lipídeos em pacientes com LMA (14, 29-31).

Foi observado neste estudo aumentos nos níveis de propionilcarnitina; LysoPE (14:1); LPE O-20:4; CDP-diacilglicerol e CDP-diacilglicerol oxidado. Células leucêmicas da LMA tem a biogênese mitocondrial aumentada, consequentemente os blastos são metabolicamente mais ativos, e por isso, dependentes da função mitocondrial (32). A propionilcarnitina é uma acilcarnitina que tem como função biológica a produção de energia para sustentar atividade celular através do transporte

de grupos acil do citoplasma para as mitocôndrias (33). Sendo assim, sua elevação possivelmente indicando a manutenção energética dos blastos. Em estudo similar realizado por Wang, Dong *et al.*, 2019 também foi demonstrado seu aumento no soro de paciente com LMA (30).

Os lipídios oxidados, como CDP-diacilgliceróis oxidados, pertencem a um grupo de biomoléculas que desempenham um papel como moléculas sinalizadoras (34). Células leucêmicas oxidam os ácidos graxos por desacoplamento mitocondrial através da fosforilação oxidativa promovendo uma mudança na produção de ATP via oxidação dos ácidos graxos (35). A oxidação de ácidos graxos apoia a sobrevivência das células de leucemias fornecendo acetil-CoA para ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) (36). Além disso, tem sido demonstrado que o aumento da oxidação de ácidos graxos promove a quimiorresistência (35). Portanto, a hipótese aqui é que os dados encontrados neste estudo de maior abundância desses lipídeos nos pacientes com leucemia mieloide aguda poderiam contribuir para sinalizar o apoio nos mecanismos da manutenção do metabolismo energético do TCA ou conferir aos blastos resistência frente à quimioterapia.

Os metabólitos ácidos taurocólico e *5beta-cyprinol sulfate*, pertencentes ao metabolismo dos ácidos biliares foram apontados no estudo. A compreensão como efeito protetor (facilitar a digestão e absorção de lipídios) ou tóxico dos ácidos biliares tem sido ampliada. Em alguns tipos de cânceres como por exemplo, câncer fígado, câncer colorretal e câncer de pâncreas os diferentes tipos de ácidos biliares estão trazendo uma ampliação do conhecimento na angiogênese, proliferação, metástase, inflamação e a regulação imunológica (37).

A detecção elevada da fenilacetilglutamina (PAGln) foi encontrada nos pacientes LMA. A fenilalanina, que é um aminoácido proteogênico, é o precursor da fenilacetilglutamina (38), sendo absorvida no intestino delgado. A fenilalanina não absorvida é metabolizada em ácido fenilpirúvico e posteriormente ácido fenilacético pela microbiota intestinal do intestino grosso. O ácido fenilacético, é absorvido pelo sistema porta e metabolizado no fígado para produzir fenilacetilglutamina (39). Níveis aumentados no sangue de PAGln foram encontrados em estudo como marcador de alerta precoce do início de acidente vascular cerebral, em função da formação de trombos pela ativação plaquetária (38). Também tem sido associado com a patogênese de polineuropatia simétrica distal em paciente com diabetes mellitus tipo 2 (40). Por outro lado, altos níveis plasmáticos de PAGln foram relacionados ao menor

risco de desenvolvimento de câncer de mama (41). Nossos achados para maior elevação de PAGln, sugerem mudança na microbiota intestinal dos pacientes ou uma disfunção hepática apesar de não observarmos variações nos valores das enzimas hepáticas das transaminases (ALT and AST), ALP and GGT.

Outro metabólito aumentado na LMA foi o Se-adenosilselenohomocisteína (SeAH). A SeAH participa de várias reações enzimáticas envolvidas no metabolismo do selenoaminoácido. É formada a partir selenometionina (SeMet) que por ação de S-adenosilmetionina sintases é convertida em Se-adenosilmetionina (SeAM). A SeAM é utilizada em reações de metilação, tendo como produto a Se-adenosilselenohomocisteína (42). Os selenocompostos, podem servir como precursores para a biossíntese de selenoproteínas (43). Estudos mostram a complexidade das funções das selenoproteínas (proteínas contendo selênio) que parecem desempenhar um papel dividido tanto na prevenção do câncer, (efeito antioxidante regulando espécies reativas de oxigênio celular (ROS) como também promovendo o câncer, como por exemplo, com a superexpressão de tiorredoxina redutase 1 (TR1) em células cancerígenas (44). Portanto, um questionamento a ser avaliado com mais estudos é se a elevação da Se-adenosilselenohomocisteína poderia contribuir na tumorigênese da LMA.

Até o momento, não conseguimos reconhecer a identidade molecular de 12 features, apontados como 'desconhecido' com valores de  $m/z$  e tempos de retenção, descritos na Tabela 2.

#### 4.2 Metabólitos revelados no decorrer do tempo (T0, T1, T2, T3)

Quando analisamos a partir do heatmap, o padrão dos 25 metabólitos verificamos nos resultados dos pacientes dois padrões de intensidade distintos (diminuição e aumento) nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2, T3), quando comparado com o grupo controle. Primeiro, a diminuição na intensidade dos metabólitos da classe dos ácidos dicarboxílicos e leucotrienos (*5-Oxo-6-trans-leukotriene B4 / leukotriene B5*), no plasma dos pacientes, Fig.2. Os ácidos dicarboxílicos de cadeia muito longa (VLCDCA) são lipídios endógenos com propriedades anti-inflamatórias e quimiopreventivas (45). A diminuição dos níveis séricos dos VLCDCA 28:4 já foi detectada em estudos anteriores em pacientes com câncer colorretal e câncer do pâncreas (46). A inflamação afeta vários aspectos da

hematopoiese, como a progressão da doença, quimiorresistência, mielossupressão e síndrome de leucostase (47). Sabidamente, blastos leucêmicos usam mecanismos moleculares das integrinas e selectinas para ativar as células endoteliais secretando citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, que induzem as condições necessário para sua adesão ao endotélio vascular, migração para tecidos, proliferação e quimiorresistência (48). Sendo assim, a diminuição da intensidade desses lipídios anti-inflamatórios poderia ser estudada para compreender como poderia impulsionar ou afetar os mecanismos inflamatórios dos diferentes tipos de leucemias. Os leucotrienos são metabólitos do ácido araquidônico, através da enzima 5-LO (5-lipoxigenase). Esses compostos são derivados de leucócitos como PMNNs, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, mastócitos e macrófagos (49). São mediadores inflamatórios que funcionam na defesa normal do hospedeiro e desempenham papéis em doenças inflamatórias, exercendo seus efeitos biológicos ligando-se a receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (50). A redução no plasma, possivelmente seja relacionada devido à neutropenia dos pacientes, Tabela 1.

Um segundo padrão observado foi o aumento da intensidade dos metabólitos ácido taurocólico; C17 Esfingosina; derivados da vitamina D e glicerofosfolipídios. Entre os glicerofosfolipídios, destaque para a elevação do ácido fosfatídico. O ácido fosfatídico (PA) é um componente das membranas celulares e um intermediário crítico na biossíntese de fosfolipídios (51), podendo ser gerado de ácido lisofosfatídico (LPA) e diacilglicerol (DG) e também de fosfatidilcolina. A fonte mais provável e relevante nas células cancerígenas seja através da hidrólise de fosfatidilcolina (52). A fosfolipase D (PLD) é uma proteína de membrana que catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina (PC) em ácido fosfatídico e colina. Em humanos duas isoformas de PLD são referidas PLD1 e PLD2 (53). O ácido fosfatídico, por ser um lipídio multifuncional, é capaz de mediar cascatas de sinalização recrutando ou modulando as atividades enzimáticas. É um importante cofator em diversas vias de sinalização celular que regulam a proliferação celular e a apoptose, incluindo Raf, vias de quinases (ERK), Akt, *the mammalian target of rapamycin* (mTOR) e via da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). Também é um cofator importante de proteína quinase citosólica multifuncional envolvida na ativação da NADPH oxidase em neutrófilos (51, 54). Estudo realizado por Lu, Ying *et al.*, demonstraram níveis mais elevados de mRNA de PLD1 em pacientes com LMA. Embora não seja claro como a PLD1 regula a progressão do processo leucêmico, o ácido fosfatídico gerado por PLD1 regula o crescimento celular através do mTOR, cuja

a ativação representa uma das marcas da LMA (55). Um aumento na expressão de mRNA PLD1 foi observada durante a administração de 1,25-dihidroxitamina D3 na diferenciação induzida de queratinócitos epidérmico (56). Apesar do nosso estudo não ter medido os níveis de PLD1, curiosamente os nossos resultados mostraram elevação de derivados da vitamina D ((23S) -23,25-dihydroxy-24-oxovitamin D3 23-(beta-glucuronide)), CDP-diacilglicerol e do ácido fosfatídico.

E por fim, com o objetivo de desenvolvermos uma compreensão integrada do impacto desses metabólitos no enriquecimento das vias biológicas aplicamos essa exploração através da plataforma online MetaboAnalyst 6.0. Utilizando como condição de triagem  $p < 0.05$ , os metabólitos apontados neste estudo foram relacionados em várias vias bioquímicas importantes do câncer, como por exemplo vias envolvidas na biossíntese de ácidos biliares, metabolismo dos lipídios, metabolismo das purinas, vias de modulação de PI3K-Akt-mTOR, e receptores de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFR2), entre outros, Fig. 3. Com o presente estudo esperamos fornecer aspectos para contribuição do melhor entendimento da fisiopatologia da leucemia mieloide aguda, ainda que possua algumas limitações como o número pequeno de pacientes participantes e os vários subtipos de classificações LMA, incluindo os pacientes com LPA, o que nos impediu de tirar conclusões definitivas sobre o painel de metabólitos. Outra limitação foi não conseguir coletar o mesmo  $n$  amostral dos pacientes em todos os tempos de coleta (T0  $n=26$ ; T1( $n=19$ ); T2 ( $n=18$ ); T3 ( $n=14$ )) em função das amostras terem sido coletadas em período de pandemia (junho de 2020 até junho de 2022) e alguns pacientes faleceram durante o tratamento. Além da limitação para identificar os metabólitos nomeados como '*desconhecido*'. Como os pacientes estavam hospitalizados inevitavelmente estavam sendo medicados, em razão disso detectamos alguns medicamentos, como por exemplo os antibióticos das classes dos antibióticos beta-lactâmicos e quinolonas.

## 5 CONCLUSÃO

Através desta análise metabolômica global (LC-MS), foi possível revelar no plasma de pacientes com LMA, trinta metabólitos (VIP score  $> 2$  and FC entre 5.00 e 145.71) e vinte e cinco metabólitos a partir *heatmap*.

Em nosso estudo encontramos aumento da intensidade no plasma dos pacientes de metabólitos relacionados com processos na regulação imunológica como

na inflamação, com atuação nas cascatas de sinalização RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, (mTOR), na angiogênese, processos de sinalização celular, metabolismo energético celular e da microbiota intestinal. E uma diminuição em relação ao grupo controle, na abundância dos metabólitos de ácidos dicarboxílicos e leucotrienos. Entre as possíveis interpretações dos nossos resultados podemos sugerir que os metabólitos apresentados mostraram influenciar em vias biológicas importantes da leucemogênese. O movimento dessas moléculas aumentadas ou diminuídas no plasma dos pacientes com LMA sugere uma mudança em direção à síntese ou degradação desses metabólitos.

Na análise do *heatmap* a diminuição e o acúmulo da intensidade dos metabólitos nos pacientes parecem não ter havido diferenças consideráveis nos diferentes tempos de coleta (T0, T1, T2 and T3), no entanto quando comparamos com o grupo controle observamos que existem claras separações. O perfil do 'fenótipo metabólico' dos diferentes tempos de coleta aparenta não ter grandes variações no decorrer das três semanas analisadas.

Portanto, com esses achados esperamos contribuir com o fornecimento de informações que possam ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico, acompanhamento de prognóstico, no tratamento e quimiorresistência. Estudos complementares com maior número de participantes serão necessários para melhor compreensão e verificação desses mecanismos.

## REFERENCES

1. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136-52.
2. Kumar CC. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. *Genes & cancer*. 2011;2(2):95-107.
3. Khwaja A, Bjorkholm M, Gale RE, Levine RL, Jordan CT, Ehninger G, et al. Acute myeloid leukaemia. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2(1):1-22.
4. Wojcicki AV, Kasowski MM, Sakamoto KM, Lacayo N. Metabolomics in acute myeloid leukemia. *Molecular genetics and metabolism*. 2020;130(4):230-8.
5. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood cancer journal*. 2016;6(7):e441-e.
6. Stuani L, Sabatier M, Sarry J-E. Exploiting metabolic vulnerabilities for personalized therapy in acute myeloid leukemia. *BMC biology*. 2019;17:1-17.



7. Kreitz J, Schönfeld C, Seibert M, Stolp V, AlshLMAeh I, Oellerich T, et al. Metabolic plasticity of acute myeloid leukemia. *Cells*. 2019;8(8):805.
8. Vinaixa M, Samino S, Saez I, Duran J, Guinovart JJ, Yanes O. A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. *Metabolites*. 2012;2(4):775-95.
9. Wishart DS, Feunang YD, Marcu A, Guo AC, Liang K, Vazquez-Fresno R, et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(D1):D608-d17.
10. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. *Analyst*. 2012;137(2):293-300.
11. Duncan KD, Fyrestam J, Lanekoff I. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics. *Analyst*. 2019;144(3):782-93.
12. Watson AD. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *Journal of lipid research*. 2006;47(10):2101.
13. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(4):263-9.
14. Wang Y, Zhang L, Chen W-L, Wang J-H, Li N, Li J-M, et al. Rapid diagnosis and prognosis of de novo acute myeloid leukemia by serum metabonomic analysis. *Journal of proteome research*. 2013;12(10):4393-401.
15. Allegra A, Innao V, Gerace D, Bianco O, Musolino C. The metabolomic signature of hematologic malignancies. *Leuk Res*. 2016;49:22-35.
16. Delgado-Dolset MI, Obeso D, Rodríguez-Coira J, Tarin C, Tan G, Cumplido JA, et al. Understanding uncontrolled severe allergic asthma by integration of omic and clinical data. *Allergy*. 2022;77(6):1772-85.
17. Xia J, Wishart DS. Metabolomic data processing, analysis, and interpretation using MetaboAnalyst. *Current protocols in bioinformatics*. 2011;34(1):14.0. 1-.0. 48.
18. Gil-de-la-Fuente A, Godzien J, Saugar S, Garcia-Carmona R, Badran H, Wishart DS, et al. CEU mass mediator 3.0: a metabolite annotation tool. *Journal of proteome research*. 2018;18(2):797-802.
19. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, et al. HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(D1):D622-D31.
20. Trygg J, Holmes E, Lundstedt T. Chemometrics in metabonomics. *J Proteome Res*. 2007;6(2):469-79.
21. Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wikström C, Wold S. Design of experiments: Principles and applications (2008). Sweden: Umetrics Academy; 2008.

22. Jiménez-Contreras E, Torres-Salinas D, Moreno R, Baños R, López-Cózar E. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. *Scientometrics*. 2009;79(1):201-18.
23. Kirkwood KI, Christopher MW, Burgess JL, Littau SR, Foster K, Richey K, et al. Development and application of multidimensional lipid libraries to investigate lipidomic dysregulation related to smoke inhalation injury severity. *Journal of proteome research*. 2021;21(1):232-42.
24. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2010;10(7):489-503.
25. Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(2):139-50.
26. Scholl C, Gilliland DG, Fröhling S, editors. *Deregulation of signaling pathways in acute myeloid leukemia*. *Seminars in oncology*; 2008: Elsevier.
27. Vilcaes AA, Garbarino-Pico E, Torres Demichelis V, Daniotti JL. Ganglioside synthesis by plasma membrane-associated sialyltransferase in macrophages. *International journal of molecular sciences*. 2020;21(3):1063.
28. Daniotti JL, Lardone RD, Vilcaes AA. Dysregulated expression of glycolipids in tumor cells: from negative modulator of anti-tumor immunity to promising targets for developing therapeutic agents. *Frontiers in oncology*. 2016;5:300.
29. Stefanko A, Thiede C, Ehninger G, Simons K, Grzybek M. Lipidomic approach for stratification of acute myeloid leukemia patients. *PLoS One*. 2017;12(2):e0168781.
30. Wang D, Tan G, Wang H, Chen P, Hao J, Wang Y. Identification of novel serum biomarker for the detection of acute myeloid leukemia based on liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2019;166:357-63.
31. Musharraf SG, Siddiqui AJ, Shamsi T, Naz A. SERUM metabolomics of acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia for probing biomarker molecules. *Hematol Oncol*. 2017;35(4):769-77.
32. Skrtić M, Sriskanthadevan S, Jhas B, Gebbia M, Wang X, Wang Z, et al. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human acute myeloid leukemia. *Cancer cell*. 2011;20(5):674-88.
33. Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Nordberg D, Attwood MM, et al. Acylcarnitines: nomenclature, biomarkers, therapeutic potential, drug targets, and clinical trials. *Pharmacological Reviews*. 2022;74(3):506-51.
34. Hajeyah AA, Griffiths WJ, Wang Y, Finch AJ, O'Donnell VB. The biosynthesis of enzymatically oxidized lipids. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:591819.
35. Samudio I, Harmancey R, Fiegl M, Kantarjian H, Konopleva M, Korchin B, et al. Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *The Journal of clinical investigation*. 2010;120(1):142-56.

36. Tcheng M, Roma A, Ahmed N, Smith RW, Jayanth P, Minden MD, et al. Very long chain fatty acid metabolism is required in acute myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2021;137(25):3518-32.
37. Fu J, Yu M, Xu W, Yu S. Research progress of bile acids in cancer. *Frontiers in Oncology*. 2022;11:778258.
38. Ma L, Fu G, Liu R, Zhou F, Dong S, Zhou Y, et al. Phenylacetyl glutamine: a novel biomarker for stroke recurrence warning. *BMC neurology*. 2023;23(1):74.
39. Chen W, Zhang S, Wu J, Ye T, Wang S, Wang P, et al. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis. *Clinica chimica acta*. 2020;507:236-41.
40. Xu J, Cai M, Wang Z, Chen Q, Han X, Tian J, et al. Phenylacetylglutamine as a novel biomarker of type 2 diabetes with distal symmetric polyneuropathy by metabolomics. *Journal of Endocrinological Investigation*. 2023;46(5):869-82.
41. Zeleznik OA, Balasubramanian R, Zhao Y, Frueh L, Jeanfavre S, Avila-Pacheco J, et al. Circulating amino acids and amino acid-related metabolites and risk of breast cancer among predominantly premenopausal women. *NPJ Breast cancer*. 2021;7(1):54.
42. Lazard M, Dauplais M, Blanquet S, Plateau P. Recent advances in the mechanism of selenoamino acids toxicity in eukaryotic cells. *Biomolecular concepts*. 2017;8(2):93-104.
43. Brigelius-Flohé R. Selenium compounds and selenoproteins in cancer. *Chemistry & biodiversity*. 2008;5(3):389-95.
44. Hatfield DL, Yoo M-H, Carlson BA, Gladyshev VN. Selenoproteins that function in cancer prevention and promotion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 2009;1790(11):1541-5.
45. Wood PL. Endogenous anti-inflammatory very-long-chain dicarboxylic acids: potential chemopreventive lipids. *Metabolites*. 2018;8(4):76.
46. Wood PL, Donohue MM, Cebak JE, Beckmann TG, Messias MCF, Credidio L, et al. Reduced plasma levels of very-long-chain dicarboxylic acid 28: 4 in Italian and Brazilian colorectal cancer patient cohorts. *Metabolites*. 2018;8(4):91.
47. Pietras EM. Inflammation: a key regulator of hematopoietic stem cell fate in health and disease. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2017;130(15):1693-8.
48. Récher C. Clinical implications of inflammation in acute myeloid leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2021;11:623952.
49. Murphy RC, Gijón MA. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochemical Journal*. 2007;405(3):379-95.

50. Jo-Watanabe A, Okuno T, Yokomizo T. The role of leukotrienes as potential therapeutic targets in allergic disorders. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(14):3580.
51. Douvas MG, Hogan KN, Ji Y, Hollenback D, Bonham L, Singer JW, et al. Effect of lysophosphatidic acid acyltransferase- $\beta$  inhibition in acute leukemia. *Leukemia research*. 2006;30(8):1027-36.
52. Foster DA. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009;1791(9):949-55.
53. Foster DA, Xu L. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Molecular Cancer Research*. 2003;1(11):789-800.
54. Bruntz RC, Lindsley CW, Brown HA. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer. *Pharmacological reviews*. 2014;66(4):1033-79.
55. Lu Y, Zhou J, Pei R, Li F, Jin J, Jiang L. Expression and clinical significance of phospholipase D1 in de novo acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2020;25(1):270-5.
56. Griner RD, Qin F, Jung E, Sue-Ling CK, Crawford KB, Mann-Blakeney R, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces phospholipase D-1 expression in primary mouse epidermal keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(8):4663-70.

\*\*\*FIM DO ARTIGO CIENTÍFICO\*\*\*

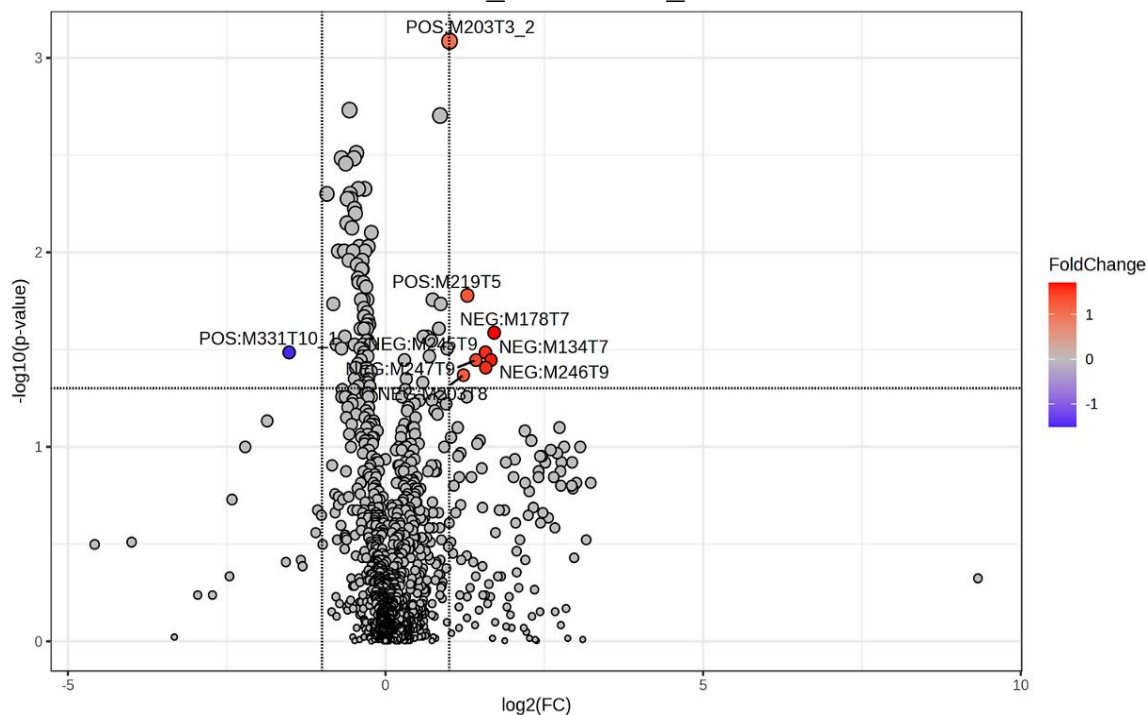
## 5 COMPARAÇÕES PACIENTES LLA VS. LMA

### 5.1 Análises Estatísticas entre os grupos LLA vs. LMA

Iniciamos essa avaliação entre os dois grupos doentes (LLA e LMA) através da análise estatística quimiométrica do PCA. Essa análise exploratória mostrou uma separação do grupo controle, um forte agrupamento dos QCs e uma similaridade no padrão da distribuição das amostras dos dois tipos de leucemias estudadas, conforme anteriormente demonstrado no Gráfico 1.

Na sequência das análises foi plotado o gráfico de Volcano com os seguintes critérios para seleção dos *features* diferenciadores entre os dois grupos: *fold change* >2.0, testes não-paramétricos com p-valor <0.05 e com a direção da comparação de LLA\_T0/LMA\_T0. Essa avaliação mostrou que 01 *feature* aparece com intensidade diminuída LLA\_T0 e 08 *features* com intensidade aumentada em LLA\_T0, como demonstrado no Gráfico 9.

Gráfico 9 – Volcano Plot aplicado aos dados das amostras entre os grupos doentes LLA\_T0 vs. LMA\_T0



**Legenda:** Cada ponto no gráfico representa um *molecular feature*. Os pontos vermelhos indicam intensidade aumentada e os pontos azuis intensidade diminuída. Os pontos cinzas representam *features* que não tiveram distinção significativa entre os grupos. 01 *feature* aparece com intensidade diminuída LLA\_T0 e 08 *features* com intensidade aumentada em LLA\_T0. Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 9 apresenta as propriedades dos 09 *features* diferenciadores entre os dois grupos.

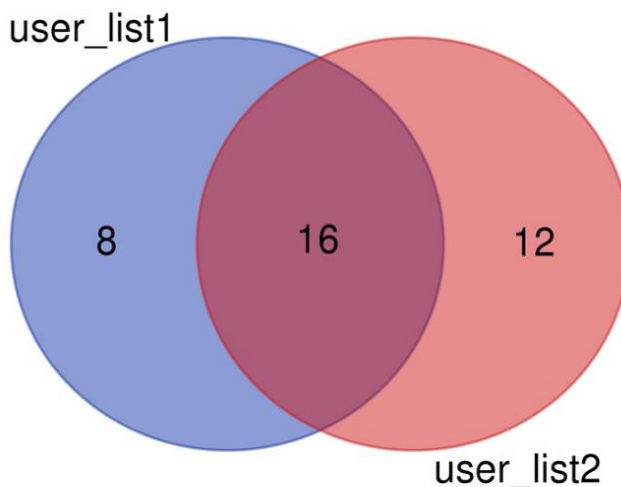
Tabela 9 – Relação dos *features* diferenciadores entre dois grupos LLA\_T0 e LMA\_T0

| <i>n</i> | Código do <i>Feature</i> | <i>m/z</i> | RT (min) | Intensidade LLA_T0/LMA_T0 |
|----------|--------------------------|------------|----------|---------------------------|
| 1        | POS:M331T10_1            | 331.1315   | 9.57     | ↓                         |
| 2        | POS:M203T3_2             | 203.1509   | 2.59     | ↑                         |
| 3        | POS:M219T5               | 219.1431   | 5.48     | ↑                         |
| 4        | NEG:M178T7               | 178.0513   | 7.37     | ↑                         |
| 5        | NEG:M245T9               | 245.0485   | 9.33     | ↑                         |
| 6        | NEG:M134T7               | 134.0615   | 7.37     | ↑                         |
| 7        | NEG:M247T9               | 247.0466   | 9.33     | ↑                         |
| 8        | NEG:M246T9               | 246.0519   | 9.33     | ↑                         |
| 9        | NEG:M203T8               | 203.0025   | 7.96     | ↑                         |

**Legenda:** *m/z* relação massa-carga; RT= tempo de retenção; POS: modo de aquisição positivo; NEG: modo de aquisição negativo; ↓ intensidade diminuída; ↑ intensidade aumentada. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Outra avaliação realizada foi a comparação das duas listas com os 30 metabólitos VIP de cada grupo, caracterizados na Tabela 6 (grupo LLA (T0) vs. Ctrl) e Tabela 2 (do artigo científico, grupo LMA (T0) vs. Ctrl). Essa integração de análise mostrou que há 08 metabólitos exclusivos do grupo LLA (T0), 12 metabólitos exclusivos do grupo LMA (T0) e 16 metabólitos em comum entre as duas leucemias, quando comparados com o grupo controle, conforme demonstrado no Gráfico 10. Essa análise reforça o que foi observado no PCA (Gráfico 1) que há uma maior similaridade no padrão metabólico entre as duas leucemias do que diferenças, possivelmente devido à presença das células imaturas blásticas no sangue desses pacientes.

Gráfico 10 – Diagrama de Venn construído com as duas listas dos 30 metabólitos VIP de cada grupo em suas comparações com o grupo controle



**Legenda:** User\_list1: são os 30 metabólitos VIP do grupo LLA(T0) vs. CTRL. User\_list2: são os 30 metabólitos VIP do grupo LMA(T0) vs. CTRL. Sendo 08 metabólitos exclusivos do grupo LLA, 12 exclusivos do grupo LMA e 16 metabólitos são comuns entre as duas leucemias. Na construção Diagrama de Venn foram removidos das listas de comparação os metabólitos isótopos. Fonte: Elaborado pelo autor.

A apresentação desses metabólitos está descrita no Quadro 6.

Quadro 6 – Relação dos metabólitos exclusivos e comuns entre os grupos LLA e LMA

| Exclusivos Grupo:<br>LLA vs CTRL                       | Comum entre os<br>dois grupos                          | Exclusivos Grupo:<br>LMA vs CTRL               |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Ácido fosfatídico (22:0)                               | Desconhecido<br>(POS: $m/z=774.2006$ ;<br>RT: 7.90)    | Unknown<br>(POS: $m/z=823.4240$ ;<br>RT: 7.68) |
| Ácido fosfatídico oxidado                              | Desconhecido 28<br>(POS: $m/z=823.0230$ ;<br>RT: 7.68) | Unknown<br>(POS: $m/z=645.5024$ ;<br>RT: 7.90) |
| Desconhecido<br>(POS: $m/z=823.2234$ ;<br>RT: 7.68)    | Meticilina                                             | Phenylacetylglutamine                          |
| Desconhecido 25<br>(POS: $m/z=763.9821$ ;<br>RT: 7.65) | CDP-diacilglicerol<br>(CDP-DG)                         | 6-Thioguanosine-5'-O-triphosphate              |
| Desconhecido<br>(POS: $m/z=861.1902$ ;<br>RT: 7.65)    | Ácido 6-tioinosínico                                   | Unknown<br>(POS: $m/z=686.0214$ ;<br>RT: 7.68) |
| Gangliosídeo GM1                                       | CDP-diacilglicerol oxidado                             | Unknown<br>(POS: $m/z=823.8247$ ;<br>RT: 7.69) |
| Gangliosídeo GD1b                                      | Fluoroquinolona                                        | Unknown<br>(POS: $m/z=404.5590$ ;<br>RT: 7.67) |
| Desconhecido<br>(POS: $m/z=547.2854$ ;<br>RT: 7.61)    | LPE O-20:4                                             | Unknown<br>(POS: $m/z=457.5751$ ;<br>RT: 6.17) |

|  |                                                      |                                                        |
|--|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|  | LysoPE(14:1)                                         | Dimenhydrinate                                         |
|  | Gangliosídeo GA1/GB4                                 | <i>Unknown</i><br>(POS: $m/z=590.0368$ ;<br>RT:7.15)   |
|  | <i>5beta-Cyprinol sulfate</i>                        | <i>Unknown</i><br>(POS: $m/z=632.1342$ ;<br>RT:7.63)   |
|  | Se-<br>adenosilselenohomocisteína                    | <i>Unknown</i><br>(NEG : $m/z =483.1491$ ;<br>RT:9.68) |
|  | Esfingosina (C17)                                    |                                                        |
|  | Desconhecido<br>(POS: $m/z= 774.0005$ ;<br>RT: 7.90) |                                                        |
|  | Propionilcarnitina                                   |                                                        |
|  | Ácido taurocólico                                    |                                                        |

**Fonte:** Elaborado pelo autor.



## 6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As principais limitações do estudo são: o número pequeno de pacientes participantes e os vários subtipos de classificações da LLA e LMA , o que nos impediu de tirar conclusões definitivas sobre o painel de metabólitos. Outra limitação foi não conseguir coletar o mesmo n amostral dos pacientes em todos os tempos de coleta em função das amostras terem sido coletadas em período de pandemia (junho de 2020 até junho de 2022) e alguns pacientes faleceram durante o tratamento. Além da limitação para identificar os metabólitos nomeados como ‘desconhecido’. Como os pacientes estavam hospitalizados, inevitavelmente estavam sendo medicados, em função disso detectamos alguns medicamentos, como por exemplo, a presença de antibióticos, possivelmente utilizado no manejo do tratamento devido à neutropenia desses pacientes.

## 7 CONCLUSÕES

Após a avaliação dos resultados obtidos e das discussões realizadas, foi possível concluir que a abordagem da metabolômica global através do uso da LC-MS é importante para explorar e pesquisar metabólitos em amostras biológicas como o plasma, e também útil para a compreensão desses metabólitos nas vias biológicas do câncer.

Neste estudo foi possível identificar um padrão de metabólitos do grupo LLA envolvidos nas vias biológicas do metabolismo de lipídios, ácidos biliares, nucleosídeos e alguns ainda com identidade desconhecida.

Para o grupo LMA um grupo de metabólitos relacionados com os processos na regulação imunológica como na inflamação, com atuação nas cascatas de sinalização RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, (mTOR), na angiogênese, processos de sinalização celular, metabolismo energético celular e da microbiota intestinal.

Quando comparamos os metabólitos identificados em cada uma das leucemias, observamos que há um padrão de metabólitos que são comuns entre as duas leucemias e alguns que são exclusivos de cada tipo, como apontado no Quadro 6.

O movimento dessas moléculas aumentadas ou diminuídas no plasma dos pacientes sugere uma mudança em direção à síntese desses metabólitos. Ou de outro modo, seriam efeitos moleculares secundários da doença?

Portanto, com esses achados esperamos contribuir para o fornecimento de informações que possam ajudar no desenvolvimento de novas estratégias para diagnóstico, acompanhamento de prognóstico, no tratamento e quimiorresistência. Estudos complementares com maior número de participantes serão necessários para melhor compreensão desses mecanismos.

## REFERÊNCIAS

- AKKINENI, Roopa et al. Treatment of asymptomatic hyperuricemia and prevention of vascular disease: a decision analytic approach. *The Journal of rheumatology*, v. 41, n. 4, p. 739-748, 2014.
- ALAGGIO, R.; AMADOR, C.; ANAGNOSTOPOULOS, I.; ATTYGALLE, A. D. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. **Leukemia**, 36, n. 7, p. 1720-1748, 2022.
- ALGERI, M.; MERLI, P.; LOCATELLI, F.; PAGLIARA, D. The Role of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Pediatric Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, 10, n. 17, p. 3790, 2021.
- ALLEGRA, A.; INNAO, V.; GERACE, D.; BIANCO, O. *et al.* The metabolomic signature of hematologic malignancies. **Leuk Res**, 49, p. 22-35, Oct 2016.
- ÁLVAREZ-SÁNCHEZ, B.; PRIEGO-CAPOTE, F.; DE CASTRO, M. L. Metabolomics analysis II. Preparation of biological samples prior to detection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29, n. 2, p. 120-127, 2010.
- ALVARNAS, J. C.; BROWN, P. A.; AOUN, P.; BALLEEN, K. K. *et al.* Acute lymphoblastic leukemia, version 2.2015. **Journal of the national comprehensive cancer network**, 13, n. 10, p. 1240-1279, 2015.
- ALVES, G. V. D. A. Caracterização hematológica e imunofenotípica em pacientes com leucemia linfoblástica aguda. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial; Biotecnologia em Agropecuária; Biotecnologia em Recursos Naturais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.
- ANDERSSON, A. K.; MA, J.; WANG, J.; CHEN, X. *et al.* The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. **Nature genetics**, 47, n. 4, p. 330-337, 2015.
- ANGIONE, C. Human systems biology and metabolic modelling: a review—from disease metabolism to precision medicine. **BioMed research international**, 2019, 2019.
- ARMSTRONG, Scott A.; LOOK, A. Thomas. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, v. 23, n. 26, p. 6306-6315, 2005.
- ASH. Sociedade Americana de Hematologia. Disponível em: <https://imagebank.hematology.org/>. Acesso em: 10 dezembro 2022.
- BAI, Y.; ZHANG, H.; SUN, X.; SUN, C. *et al.* Biomarker identification and pathway analysis by serum metabolomics of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clinica Chimica Acta**, 436, p. 207-216, 2014.
- BAIN, B. J. Células Sanguíneas-5ª Edição: Um Guia Prático. Artmed Editora, 2016.

- BELINATO, J. R.; BAZIOLI, J. M.; SUSSULINI, A.; AUGUSTO, F. *et al.* Metabolômica microbiana: inovações e aplicações. **Química Nova**, 42, n. 5, p. 546-559, 2019.
- BISPO, J. A. B.; PINHEIRO, P. S.; KOBETZ, E. K. Epidemiology and etiology of leukemia and lymphoma. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 10, n. 6, p. a034819, 2020.
- BLANKENBERG, F. G.; KATSIKIS, P. D.; STORRS, R. W.; BEAULIEU, C. *et al.* Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Blood**, 89, n. 10, p. 3778-3786, May 15 1997.
- BURGOS, R. C. R.; DE MACEDO, A. N.; DA CRUZ, P. L. R.; JÚNIOR, H. T.-S. *et al.* Improving data quality in liquid chromatography-mass spectrometry metabolomics of human urine. **Journal of Chromatography A**, 1654, p. 462457, 2021.
- BUSS, E. C.; HO, A. D. Leukemia stem cells. **International journal of cancer**, 129, n. 10, p. 2328-2336, 2011.
- CAMBIAGHI, A.; FERRARIO, M.; MASSEROLI, M. Analysis of metabolomic data: tools, current strategies and future challenges for omics data integration. **Brief Bioinform**, 18, n. 3, p. 498-510, May 1 2017.
- CANCELA, C. S. P.; MURAO, M.; SOUZA, M. E. D. L.; BARCELOS, J. M. *et al.* Central nervous system involvement in acute lymphoblastic leukemia: diagnosis by immunophenotyping. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 49, p. 260-263, 2013.
- CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L. D.; CRUZ, P. L. R. D.; SOUZA, A. R. L. D. *et al.* METABOLÔMICA: DEFINIÇÕES, ESTADO-DA-ARTE E APLICAÇÕES REPRESENTATIVAS. **Química Nova**, 41, p. 75-91, 2018.
- CAPRA, M.; VILELLA, L.; PEREIRA, W. V.; COSER, V. M. *et al.* Estimated number of cases, regional distribution and survival of patients diagnosed with acute myeloid leukemia between 1996 and 2000 in Rio Grande do Sul, Brazil. **Leukemia & lymphoma**, 48, n. 12, p. 2381-2386, 2007.
- CARROLL, D.; ST. CLAIR, D. K. Hematopoietic stem cells: normal versus malignant. **Antioxidants & redox signaling**, 29, n. 16, p. 1612-1632, 2018.
- CAVALCANTE, M. S.; ROSA, I. S. S.; TORRES, F. Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, 8, n. 2, p. 151-164, 2017.
- CAZÉ, M. O.; BUENO, D.; SANTOS, M. E. F. D. Estudo referencial de um protocolo quimioterápico para leucemia linfocítica aguda infantil. **Revista HCPA. Porto Alegre. Vol. 30, n. 1 (2010), p. 5-12**, 2010.
- CHAMBERS, M. C.; MACLEAN, B.; BURKE, R.; AMODEI, D. *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. **Nature biotechnology**, 30, n. 10, p. 918-920, 2012.

CHEN, W.-L.; WANG, J.-H.; ZHAO, A.-H.; XU, X. *et al.* A distinct glucose metabolism signature of acute myeloid leukemia with prognostic value. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 124, n. 10, p. 1645-1654, 2014.

CLARKE, W.; MARZINKE, M. **Contemporary practice in clinical chemistry**. Academic Press, 2020. 0128158336.

COLBY, J. M.; THOREN, K. L. Chapter 21 - Applications of mass spectrometry in the clinical laboratory. *In*: CLARKE, W. e MARZINKE, M. A. (Ed.). **Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)**: Academic Press, p. 351-363.2020.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química nova**, 29, p. 287-292, 2006.

CRUZ, Carlos Eduardo Lima de Souza. Marcadores biomoleculares no manejo clínico de pacientes com leucemia mieloide aguda. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina) - Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, 2021.

DANIOTTI, J. L.; LARDONE, R. D.; VILCAES, A. A. Dysregulated expression of glycolipids in tumor cells: from negative modulator of anti-tumor immunity to promising targets for developing therapeutic agents. **Frontiers in oncology**, 5, p. 300, 2016.

DARMON, Michael et al. Síndrome de lise tumoral: uma revisão abrangente da literatura. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 20, p. 278-285, 2008.

DE KOUCHKOVSKY, I.; ABDUL-HAY, M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. **Blood cancer journal**, 6, n. 7, p. e441-e441, 2016.

DEBERARDINIS, R. J.; LUM, J. J.; THOMPSON, C. B. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. **Journal of Biological Chemistry**, 281, n. 49, p. 37372-37380, 2006.

DEBERARDINIS, R. J.; THOMPSON, C. B. Cellular metabolism and disease: what do metabolic outliers teach us? **Cell**, 148, n. 6, p. 1132-1144, 2012.

DELGADO-DOLSET, M. I.; OBESO, D.; RODRÍGUEZ-COIRA, J.; TARIN, C. *et al.* Understanding uncontrolled severe allergic asthma by integration of omic and clinical data. **Allergy**, 77, n. 6, p. 1772-1785, 2022.

DESCHLER, B.; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Acute Leukemias**, p. 47-56, 2008.

DOS SANTOS, G. C. CARACTERIZAÇÃO DA LMA POR MEIO DE TÉCNICAS CITOGENÉTICAS E BIOMOLECULARES: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. **Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, 48, n. 1, p. 8739, 2022.

DUDZIK, D.; BARBAS-BERNARDOS, C.; GARCÍA, A.; BARBAS, C. Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics. a review. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, 147, p. 149-173, 2018.

DUNCAN, KYLE D.; FYRESTAM, JONAS; LANEKOFF, INGELA. Advances in mass spectrometry based single-cell metabolomics. *Analyst*, v. 144, n. 3, p. 782-793, 2019.

DÖHNER, H.; WEISDORF, D. J.; BLOOMFIELD, C. D. Acute myeloid leukemia. **New England Journal of Medicine**, 373, n. 12, p. 1136-1152, 2015.

DÖHNER, K.; DÖHNER, H. Molecular characterization of acute myeloid leukemia. **Haematologica**, 93, n. 7, p. 976-982, 2008.

ERIKSSON, Lennart et al. Design of experiments: Principles and applications (2008). Third revised and enlarged edition. Umetrics Academy, Sweden, 2008.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. D. Diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 40, p. 91-98, 2004.

FERREIRA, Marcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Editora da UNICAMP, 2015

FIEHN, O.; KOPKA, J.; DORMANN, P.; ALTMANN, T. *et al.* Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nat Biotechnol**, 18, n. 11, p. 1157-1161, Nov 2000.

FIGUEIREDO, MARIA STELLA; KERBAUY, JOSÉ ELIAS CURI; LOURENÇO, DAYSE MARIA. Guia de hematologia - Guias de medicina ambulatorial e hospitalar da UNIFESP-EPM. Barueri - SP- Brasil: Manole, 1ª edição, 2011

FOSTER, D. A. Phosphatidic acid signaling to mTOR: signals for the survival of human cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1791, n. 9, p. 949-955, 2009.

FU, J.; YU, M.; XU, W.; YU, S. Research progress of bile acids in cancer. **Frontiers in Oncology**, 11, p. 778258, 2022.

GALLEGOS-ARREOLA, M.; BORJAS-GUTIÉRREZ, C.; ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G.; FIGUERA, L. *et al.* Pathophysiology of acute lymphoblastic leukemia. **Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia-From the Molecules to the Clinic**. InTech: Mexico, p. 43-73, 2013.

GLOBOCAN, Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 23 de novembro de 2022.

GROMSKI, Piotr S. *et al.* A comparative investigation of modern feature selection and classification approaches for the analysis of mass spectrometry data. *Analytica chimica acta*, v. 829, p. 1-8, 2014.

HAFERLACH, T.; MACIEJEWSKI, J. P. Progress in the molecular diagnostics of hematologic neoplasia. **Best practice & research. Clinical haematology**, 33, n. 3, p. 101198, 2020.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HELMAN, RICARDO et al. Leucemia mieloide aguda: atualidade brasileira de diagnóstico e tratamento. Einstein (São Paulo), v. 9, p. 179-183, 2011.

HEUSER, M.; OFRAN, Y.; BOISSEL, N.; MAURI, S. B. *et al.* Acute myeloid leukaemia in adult patients: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, 31, n. 6, p. 697-712, 2020.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Órgão Auxiliar do Ministério da Saúde no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 28 de novembro de 2022.

JABBOUR, E.; FULLMER, A.; FADERL, S. Chapter 1. Acute Lymphoblastic Leukemia. *In*: KANTARJIAN, H. M.; WOLFF, R. A., *et al* (Ed.). **The MD Anderson Manual of Medical Oncology, 2e**. New York, NY: The McGraw-Hill Companies, 2011.

JABBOUR, E.; PUI, C.-H.; KANTARJIAN, H. Progress and innovations in the management of adult acute lymphoblastic leukemia. **JAMA oncology**, 4, n. 10, p. 1413-1420, 2018.

JÁCOMO, R. H.; FIGUEIREDO-PONTES, L. L. D.; REGO, E. M. Do paradigma molecular ao impacto no prognóstico: uma visão da leucemia promielocítica aguda. Revista da Associação Médica Brasileira, 54, p. 82-89, 2008.

JAIME-PÉREZ, J. C.; GARCÍA-ARELLANO, G.; HERRERA-GARZA, J. L.; MARFIL-RIVERA, L. J. *et al.* Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. **Hematology, transfusion and cell therapy**, 41, p. 57-61, 2019.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, Evaristo et al. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. *Scientometrics*, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2009.

JUDGE, A.; DODD, M. S. Metabolism. **Essays Biochem**, 64, n. 4, p. 607-647, Oct 8 2020.

KAMPEN, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. **Leukemia research**, 36, n. 1, p. 6-13, 2012.

KANSAL, R. Toward integrated genomic diagnosis in routine diagnostic pathology by the world health organization classification of acute myeloid leukemia. **Journal of Clinical Haematology**, 1, n. 2, p. 33-53, 2020.

KANTARJIAN, H. M.; KADIA, T. M.; DINARDO, C. D.; WELCH, M. A. *et al.* Acute myeloid leukemia: Treatment and research outlook for 2021 and the MD Anderson approach. **Cancer**, 127, n. 8, p. 1186-1207, 2021.

KATAJAMAA, M.; OREŠIČ, M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. **BMC bioinformatics**, 6, n. 1, p. 1-12, 2005.

KHOURY, J. D.; SOLARY, E.; ABLA, O.; AKKARI, Y. *et al.* The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.

KHWAJA, A.; BJORKHOLM, M.; GALE, R. E.; LEVINE, R. L. *et al.* Acute myeloid leukaemia. **Nature reviews Disease primers**, 2, n. 1, p. 1-22, 2016.

KIMURA, S.; MULLIGHAN, C. G. Molecular markers in ALL: Clinical implications. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, 33, n. 3, p. 101193, 2020.

KLUPCZYSKA, AGNIESZKA; DEREZISKI, PAWEŁ; KOKOT, Zenon J. Metabolomics in medical sciences – trends, challenges and perspectives. *Acta poloniae pharmaceutica*, p. 629, 2015.

KOLTER, T. Ganglioside biochemistry. **International Scholarly Research Notices**, 2012, 2012.

KUMAR, C. C. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia. **Genes & cancer**, 2, n. 2, p. 95-107, 2011.

LANE, S. W.; GILLILAND, D. G., **Leukemia stem cells**. Elsevier. 71-76, 2010.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LEE, J. W.; CHO, B. Prognostic factors and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Korean journal of pediatrics**, 60, n. 5, p. 129, 2017.

LENNMYR, Emma *et al.* Survival in adult acute lymphoblastic leukaemia (ALL): a report from the Swedish ALL Registry. *European journal of haematology*, v. 103, n. 2, p. 88-98, 2019.

LIBISELLER, G.; DVORZAK, M.; KLEB, U.; GANDER, E. *et al.* IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. **BMC bioinformatics**, 16, n. 1, p. 1-10, 2015.

LIBOUREL, E. J.; KLERK, C. P.; VAN NORDEN, Y.; DE MAAT, M. P. *et al.* Disseminated intravascular coagulation at diagnosis is a strong predictor for thrombosis in acute myeloid leukemia. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, 128, n. 14, p. 1854-1861, 2016.

LIERSCH, R.; MÜLLER-TIDOW, C.; BERDEL, W. E.; KRUG, U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults—biological significance and clinical use. **British journal of haematology**, 165, n. 1, p. 17-38, 2014.

LIESENFELD, D. B.; HABERMANN, N.; OWEN, R. W.; SCALBERT, A. *et al.* Review of mass spectrometry-based metabolomics in cancer research. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 22, n. 12, p. 2182-2201, Dec 2013.



LINDON, JOHN C.; NICHOLSON, JEREMY K.; HOLMES, ELAINE (Ed.). The handbook of metabonomics and metabolomics. Elsevier, 2011.

LOPES, LETÍCIA PAULA et al. Abordagens do tratamento da leucemia mieloide aguda: revisão integrativa Approaches to treatment of acute myeloid leukemia: integrative review. *Brazilian Journal of Development*, v. 8, n. 2, p. 9586-9601, 2022.

MALARD, F.; MOHTY, M. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, 395, n. 10230, p. 1146-1162, 2020.

MANISHA, P. Leukemia: a review article. **International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences**, 1, n. 4, p. 397-408, 2012.

MASTRANGELO, A.; FERRARINI, A.; REY-STOLLE, F.; GARCIA, A. *et al.* From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica chimica acta**, 900, p. 21-35, 2015.

MATIAS, Nídia Maria Antunes. **Leucemia linfoblástica Aguda: Fisiopatologia, Diagnóstico e Abordagens Terapêuticas**. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa (Portugal). Universidade de Lisboa (Portugal).2019.

MCKNIGHT, STEVEN L. On getting there from here. *Science*, v. 330, n. 6009, p. 1338-1339, 2010.

MIZUNO, HAJIME et al. The great importance of normalization of LC–MS data for highly-accurate non-targeted metabolomics. *Biomedical Chromatography*, v. 31, n. 1, p. e3864, 2017.

MORAIS, R. V. D.; SOUZA, M. V. D.; SILVA, K. A. D. S.; SANTIAGO, P. *et al.* Epidemiological evaluation and survival of children with acute myeloid leukemia. **Jornal de Pediatria**, 97, p. 204-210, 2021.

MOREIRA, L. **Ciências genômicas: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto: (Sociedade Brasileira de Genética.2015.

MRÓZEK, K.; HARPER, D. P.; APLAN, P. D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/Oncology Clinics**, 23, n. 5, p. 991-1010, 2009.

MUSHARRAF, S. G.; SIDDIQUI, A. J.; SHAMSI, T.; NAZ, A. SERUM metabolomics of acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia for probing biomarker molecules. **Hematol Oncol**, 35, n. 4, p. 769-777, Dec 2017.

NAOUM, F. A. Iron deficiency in cancer patients. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, 38, p. 325-330, 2016.

NARAYANAN, DAMODARAN; WEINBERG, OLGA K. How I investigate acute myeloid leukemia. *International journal of laboratory hematology*, v. 42, n. 1, p. 3-15, 2020

ONCIU, M. Acute lymphoblastic leukemia. **Hematology/oncology clinics of North America**, 23, n. 4, p. 655-674, 2009.

ÖZDEMİR, N.; TÜYSÜZ, G.; ÇELİK, N.; YANTRI, L. et al. Febrile neutropenia in children with acute lymphoblastic leukemia: single center experience. *Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi*, 51, n. 2, p. 79, 2016.

PADILHA, S. L.; SOUZA, E. J. D. S.; MATOS, M. C. C.; DOMINO, N. R. Acute myeloid leukemia: survival analysis of patients at a university hospital of Paraná. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, 37, p. 21-27, 2015.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C. H.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100, n. suppl\_1, p. 11842-11849, 2003.

PATTI, G. J.; YANES, O.; SIUZDAK, G. Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. **Nature reviews Molecular cell biology**, 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

PEDROSA, F.; LINS, M. Leucemia linfóide aguda: uma doença curável. *SciELO Brasil*. 2: 63-68 p. 2002.

PELCOVITS, A.; NIROULA, R. Acute myeloid leukemia: a review. **Rhode Island Medical Journal**, 103, n. 3, p. 38-40, 2020.

PISZCZ, J.; ARMITAGE, E. G.; FERRARINI, A.; RUPEREZ, F. J. et al. To treat or not to treat: metabolomics reveals biomarkers for treatment indication in chronic lymphocytic leukaemia patients. **Oncotarget**, 7, n. 16, p. 22324-22338, Apr 19 2016.

PUI, C.-H.; RELLING, M. V.; DOWNING, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. **New England Journal of Medicine**, 350, n. 15, p. 1535-1548, 2004.

QUEHENBERGER, O.; ARMANDO, A. M.; BROWN, A. H.; MILNE, S. B. et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma 1 [S]. **Journal of lipid research**, 51, n. 11, p. 3299-3305, 2010.

RAETZ, Elizabeth A.; TEACHEY, David T. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, v. 2016, n. 1, p. 580-588, 2016.

RAFEI, H.; KANTARJIAN, H. M.; JABBOUR, E. J. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leukemia & lymphoma**, 60, n. 11, p. 2606-2621, 2019.

REGLERO, C.; REGLERO, G. Precision nutrition and cancer relapse prevention: A systematic literature review. **Nutrients**, 11, n. 11, p. 2799, 2019.

RINSCHEN, M. M.; IVANISEVIC, J.; GIERA, M.; SIUZDAK, G. Identification of bioactive metabolites using activity metabolomics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 20, n. 6, p. 353-367, 2019.

ROJO, D.; BARBAS, C.; RUPÉREZ, F. J. LC–MS metabolomics of polar compounds. **Bioanalysis**, 4, n. 10, p. 1235-1243, 2012.

ROWE, J. M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. **British journal of haematology**, 150, n. 4, p. 389-405, 2010.

SAMUDIO, I.; HARMANCEY, R.; FIEGL, M.; KANTARJIAN, H. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. **J Clin Invest**, 120, n. 1, p. 142-156, Jan 2010.

SANTOS, C. R.; SCHULZE, A. Lipid metabolism in cancer. **The FEBS journal**, 279, n. 15, p. 2610-2623, 2012.

SAULTZ, J. N.; GARZON, R. Acute myeloid leukemia: a concise review. **Journal of clinical medicine**, 5, n. 3, p. 33, 2016.

SAWYERS, C. L.; DENNY, C. T.; WITTE, O. N. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. **Cell**, 64, n. 2, p. 337-350, 1991.

SCHOCH, C.; HAFERLACH, T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. **Current oncology reports**, 4, n. 5, p. 390-397, 2002.

SEBER, A.; DE CASTRO JUNIOR, C. G.; KERBAUY, L. N.; HIRAYAMA, A. V. *et al.* Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Consensus on genetically modified cells. II: CAR-T cell therapy for patients with CD19+ acute lymphoblastic leukemia. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, 43, p. S13-S21, 2021.

SEGALIN, Jéferson. Utilização da espectrometria de massas no estudo de produtos de transformação/degradação de fármacos de uso humano e veterinário. Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015.

SHAIKH, M. R.; HAIDER, G.; MEMON, P.; RAHOOL, R. *et al.* THE COMMON CYTOGENETIC ABNORMALITIES IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA PATIENTS. **Journal of Ayub Medical College Abbottabad**, 32, n. 1, p. 33-37, 2020.

SHALLIS, R. M.; WANG, R.; DAVIDOFF, A.; MA, X. *et al.* Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. **Blood reviews**, 36, p. 70-87, 2019.

SILVA, G. C. D.; PILGER, D. A.; CASTRO, S. M. D.; WAGNER, S. C. Diagnóstico laboratorial das leucemias mielóides agudas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 42, p. 77-84, 2006.

SKOOG, D.; WEST, D.; HOLLER, F.; CROUCH, S. Fundamentos de Química Analítica. Editora Thomson, 2006. 1-50 p.2006.

SMITH, C. A.; WANT, E. J.; O'MAILLE, G.; ABAGYAN, R. *et al.* XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. **Analytical chemistry**, 78, n. 3, p. 779-787, 2006.

SOUZA, André Marcelo de; POPPI, Ronei Jesus. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química nova*, v. 35, p. 223-229, 2012.

STEFANKO, A.; THIEDE, C.; EHNINGER, G.; SIMONS, K. *et al.* Lipidomic approach for stratification of acute myeloid leukemia patients. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0168781, 2017.

STEFFEN, B.; MÜLLER-TIDOW, C.; SCHWÄBLE, J.; BERDEL, W. E. *et al.* The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Critical reviews in oncology/hematology**, 56, n. 2, p. 195-221, 2005.

SYRJÄLÄ, H.; OHTONEN, P.; KINNUNEN, U.; RÄTY, R. *et al.* Blood stream infections during chemotherapy-induced neutropenia in adult patients with acute myeloid leukemia: treatment cycle matters. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, 29, p. 1211-1218, 2010.

TEBBI, C. K. Etiology of acute leukemia: A review. **Cancers**, 13, n. 9, p. 2256, 2021.

TEITELL, M. A.; PANDOLFI, P. P. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 4, p. 175-198, 2009.

TERWILLIGER, T.; ABDUL-HAY, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **Blood cancer journal**, 7, n. 6, p. e577-e577, 2017.

THOMAS, S. N. Chapter 10 - Mass spectrometry. *In*: CLARKE, W. e MARZINKE, M. A. (Ed.). **Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)**: Academic Press, p. 171-185.2019.

TRYGG, Johan; HOLMES, Elaine; LUNDSTEDT, Torbjörn. Chemometrics in metabonomics. *Journal of proteome research*, v. 6, n. 2, p. 469-479, 2007

VAKITI A, MEWAWALLA P. Acute Myeloid Leukemia. [Updated 2022 Aug 15]. *In*: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K. *et al.* Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC Genomics**, 7, p. 142, Jun 08 2006.

VARMA, V. R.; OOMMEN, A. M.; VARMA, S.; CASANOVA, R. *et al.* Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: A targeted metabolomics study. **PLoS Med**, 15, n. 1, p. e1002482, Jan 2018.

VILCAES, A. A.; GARBARINO-PICO, E.; TORRES DEMICHELIS, V.; DANIOTTI, J. L. Ganglioside synthesis by plasma membrane-associated sialyltransferase in macrophages. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 3, p. 1063, 2020.

VILLAS-BOAS, S. G.; NIELSEN, J.; SMEDSGAARD, J.; HANSEN, M. A. *et al.* **Metabolome analysis: an introduction**. John Wiley & Sons, 2007.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. METABOLOMA. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 36, p. 58, 2006.

VINAIXA, M.; SAMINO, S.; SAEZ, I.; DURAN, J. *et al.* A guideline to univariate statistical analysis for LC/MS-based untargeted metabolomics-derived data. **Metabolites**, 2, n. 4, p. 775-795, 2012.

WALAA FIKRY, M. E. Lactate dehydrogenase (LDH) as prognostic marker in acute leukemia quantitative method. *J Blood Disord Transfus*, v. 8, n. 375, p. 2, 2017.

WISHART, D. S. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. **Am J Transplant**, 5, n. 12, p. 2814-2820, Dec 2005.

WISHART, D. S.; FEUNANG, Y. D.; MARCU, A.; GUO, A. C. *et al.* HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Res**, 46, n. D1, p. D608-d617, Jan 4 2018.

WISHART, D. S.; GUO, A.; OLER, E.; WANG, F. *et al.* HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022. **Nucleic acids research**, 50, n. D1, p. D622-D631, 2022.

WOJCICKI, A. V.; KASOWSKI, M. M.; SAKAMOTO, K. M.; LACAYO, N. Metabolomics in acute myeloid leukemia. **Molecular genetics and metabolism**, 130, n. 4, p. 230-238, 2020.

XIA, J.; WISHART, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Curr Protoc Bioinformatics**, 55, p. 14.10.11-14.10.91, Sep 7 2016.

XU, Y.-H.; BARNES, S.; SUN, Y.; GRABOWSKI, G. A. Multi-system disorders of glycosphingolipid and ganglioside metabolism. **Journal of lipid research**, 51, n. 7, p. 1643-1675, 2010.

YAMAUCHI, Takahiro *et al.* A high serum uric acid level is associated with poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Anticancer research*, v. 33, n. 9, p. 3947-3951, 2013.

ZHANG, A.; SUN, H.; WANG, P.; HAN, Y. *et al.* Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, 137, n. 2, p. 293-300, Jan 21 2012.

ZHANG, A.; SUN, H.; XU, H.; QIU, S. *et al.* Cell metabolomics. **Omics: a journal of integrative biology**, 17, n. 10, p. 495-501, 2013.

ZHONG, P.; ZHANG, J.; CUI, X. Abnormal metabolites related to bone marrow failure in aplastic anemia patients. **Genet Mol Res**, 14, n. 4, p. 13709-13718, Oct 29 2015.

ÖZDEMİR, N.; TÜYSÜZ, G.; ÇELİK, N.; YANTRI, L. *et al.* Febrile neutropenia in children with acute lymphoblastic leukemia: single center experience. **Turkish Archives of Pediatrics/Türk Pediatri Arşivi**, 51, n. 2, p. 79, 2016.

## ANEXOS

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, COEP (2016)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 02177612.0.0000.5149

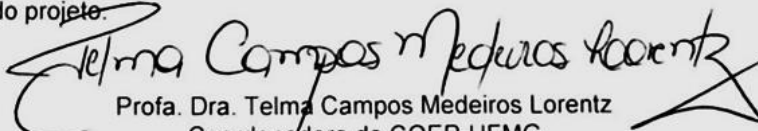
Interessado(a): Prof. Adriano de Paula Sabino  
 Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas  
 Faculdade de Farmácia - UFMG

## DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de julho de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas em amostras de pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia" com atualização do projeto contendo todas as outras neoplasias a serem avaliadas atualmente:

- 1 Leucemias agudas;
  - 1.1 Leucemias mielóides agudas;
  - 1.2 Leucemias linfóides agudas;
- 2 Doenças mieloproliferativas crônicas;
  - 2.1 Leucemia mielóide crônica;
  - 2.2 Policitemia Vera;
  - 2.3 Trombocitemia essencial;
  - 2.4 Mielofibrose;
  - 2.5 Mieloma múltiplo;
  - 2.6 Mielodisplasia;
- 3 Doenças linfoproliferativas crônicas;
  - 3.1 Leucemia linfocítica crônica;
  - 3.2 Leucemiaprolinfocítica;
  - 3.3 Tricoleucemia;
- 4. Linfomas (Hodgkin e Não-Hodgkin).

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
 Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz  
 Coordenadora do COEP-UFMG

# ANEXO B – ACESSO À DADOS CLÍNICOS EM FORMATO ELETRÔNICO PARA FINS DE PESQUISA



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas



## TERMO DE RESPONSABILIDADE: ACESSO À DADOS CLÍNICOS EM FORMATO ELETRÔNICO PARA FINS DE PESQUISA

Política de Segurança em Tecnologia da Informação na Saúde

(Perfil de Acesso: Pesquisador)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nome do projeto de pesquisa:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação in vitro de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Neoplasias Hematológicas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Nome do coordenador do projeto de pesquisa e vínculo institucional:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Adriano de Paula Sabino, Professor Magistério Superior UFMG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Registro na Plataforma Brasil: C.A.A.E                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 02177612.0.0000.5149                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Duração da pesquisa data de início:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 09 / 04 / 2018 data de término: 09 / 04 / 2024                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Modalidade de acesso aos dados clínicos:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <input type="checkbox"/> Consulta-protutório dentro dos Sistemas de PEP do Hospital das Clínicas da UFMG<br><input checked="" type="checkbox"/> Consulta-protutório dentro dos Sistemas de PEP do Hospital das Clínicas da UFMG e adicionalmente registros de papel no arquivo SAME<br><input type="checkbox"/> Base de dados clínica, anonimizada. Neste caso identificar o nome do sistema e o período de coleta de dados constantes no projeto autorizado pelo CEP UFMG<br><input type="checkbox"/> Base de dados clínica identificada. Neste caso identificar o nome do sistema e o período de coleta de dados constantes no projeto autorizado pelo CEP UFMG<br><input type="checkbox"/> Outra modalidade (especificar): |
| Identificação da equipe de pesquisa que terá acesso aos sistemas eletrônicos, quando for o caso:                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Pesquisador 1 (nome e vínculo): Fabiana Kalina Marques - Doutoranda UFMG<br>Pesquisador 2 (nome e vínculo): Daniela Félix Coutinho - Doutoranda UFMG<br>Pesquisador 3 (nome e vínculo): Flávia Favretto Doutoranda UFMG<br>Pesquisador 4 (nome e vínculo):                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Eu, Adriano de Paula Sabino                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | SIAPE: 01535962                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| CPF: 02824275826, declaro ter conhecimento de que as informações constantes no prontuário clínico pertencem ao paciente, estão sob a guarda do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, administrado pela Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares, e são de caráter sigiloso. Eu concordo em tomar todas as precauções para assegurar a Confidencialidade, Integridade e Disponibilidade de qualquer informação, seja ela interna ou externa, que tenha sido confiada a mim pela no exercício de minha atuação como pesquisador. Assumo o compromisso de utilizar os dados apenas para os fins previstos no projeto de pesquisa supracitado, já aprovado |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

Av. Prof. Alfredo Balena, 110 – 1º andar  
 Bairro Santa Efigênia – Cep: 30130-100 – Belo Horizonte – MG  
 Telefone: (31) 3409.9612 - FAX: (31) 3409.9380 –  
 E-mail: dingerai@hc.ufmg.br



**Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas**



pelo CEP UFMG e pela Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFMG. Assumo o compromisso de não repassar os dados para quaisquer outros que não os membros da equipe de pesquisa sob minha coordenação. Estou ciente de que o acesso, a cópia ou a divulgação indevida dos dados constantes no prontuário do paciente constitui infração grave ou crime, em conformidade com a resolução CFM nº 1605/2000 (do Conselho Federal de Medicina); artigo 154 do Código Penal; artigos 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 e 85 do Código de Ética Médica; artigo 5º, inciso X, da Constituição Federal.

Estou ciente de que embora a lei n.º 12.527/11, - Lei de Acesso à Informação, tenha sido criada com a finalidade de garantir o acesso às informações, em seu capítulo IV seção V, restringe o acesso às informações sigilosas, somente às pessoas que necessitem conhecê-las como médicos, profissionais e estudantes da área da saúde, e delega a quem as usou, a obrigação do sigilo e a responsabilidade por seu uso indevido.

Belo Horizonte, 29 de Dezembro de 2021



Documento assinado eletronicamente  
Assinado por: MARIA KATIA  
Data: 29/12/2021 14:20:13-0100  
Verificar em: https://verificadocv.jf.br

**Assinatura e carimbo profissional  
(Pesquisador Responsável)**

Observações e especificidades do projeto de pesquisa (se for o caso):

Ciência da Gerência de Ensino e Pesquisa

Belo Horizonte, 06 de 03 de 2022

*Assinatura*  
**Assinatura do Gerente de Ensino e Pesquisa**

**Assinatura do Gerente de Ensino e Pesquisa**  
Gerente de Ensino e Pesquisa  
Insc. 219138 CRM 30769  
PT - SEI 342 de 20/05/19  
HC-UFMG/EBSEH



## ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PROJETO DE PESQUISA

### Anexo 1

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Projeto de Pesquisa:** “Caracterização de assinaturas metabólicas, em pacientes com neoplasias hematológicas”

**Subprojeto:** “Caracterização de assinaturas metabólicas, em pacientes com Leucemias Agudas”

Prezado (a) Senhor (a),

O Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle das Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasias/tumores sólidos. Se você quiser participar deste estudo, solicitamos que autorize a utilização do sangue total já coletado para a realização do “hemograma” ou sangue da medula (se houver solicitação médica) para realizarmos exames laboratoriais que incluem hemograma, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. Utilizaremos também resultados dos exames já solicitados pelo seu médico.

Toda informação obtida nesta pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Nome: \_\_\_\_\_

Documento de identificação: \_\_\_\_\_

Contato: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_