



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS  
A HEMATOLOGIA**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIAPOPTÓTICOS E DE  
RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NA RESPOSTA A TERAPIA DE INDUÇÃO  
EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

**DANIELE DE SÁ PEREIRA**

**MANAUS - AM**

**2023**

**DANIELE DE SÁ PEREIRA**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES ANTIAPOPTÓTICOS E DE  
RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS NA RESPOSTA A TERAPIA DE INDUÇÃO  
EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, como requisito parcial para obtenção grau de *Mestre em Ciências Aplicadas à Hematologia*.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup> Dr. Allyson Guimarães da Costa

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Adriana Malheiro Alle Marie

**MANAUS - AM**

**2023**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

P436cc Pereira, Daniele de Sá

Caracterização da expressão de genes antiapoptóticos e de resistência a múltiplas drogas na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda / Daniele de Sá Pereira. Manaus : [s.n], 2023.  
86 f.: color.; 29 cm.

Dissertação - Programa de pós-graduação em ciências aplicadas a hematologia - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.

Inclui bibliografia

Orientador: Allyson Guimarães da Costa


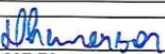
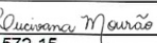
Coorientador: Adriana Malheiro Alle Marie

1. ABCB1. 2. ABCC1. 3. MVP. 4. TP53. 5. BCL2. I. Allyson Guimarães da Costa (Orient.). II. Adriana Malheiro Alle Marie (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Caracterização da expressão de genes antiapoptóticos e de resistência a múltiplas drogas na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda

## FICHA DE JULGAMENTO

### ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 008/2023

Ao vigésimo dia do mês de julho do ano de 2023, às 09h00min, realizou-se remotamente, via plataforma Google Meet, a Defesa de Dissertação da discente **Daniele de Sá Pereira**, sob o título: “**Caracterização da expressão de genes antiapoptóticos e de resistência a múltiplas drogas na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda**”, tendo como orientador o Prof. Dr. **Allyson Guimarães da Costa** e coorientadora a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> **Adriana Malheiro Alle Marie**, segundo encaminhamento da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Monteiro Tarragô, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas, a Banca julgadora foi composta pelos seguintes componentes, que deram o parecer final sobre a Defesa, tendo sido atribuído a discente o conceito discriminado no parecer da referida Comissão.

Membros	Parecer	Assinatura
Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa – Presidente (UFAM / HEMOAM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura:  CPF: 887.165.032-87
Prof. Dr. Dhémerson Souza de Lima – Membro (UVM)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura:  CPF: 924.898.697-72
Prof. <sup>a</sup> Dr. <sup>a</sup> Lucivana Prata de Souza Mourão Membro (UEA)	Aprovado(a) <input checked="" type="checkbox"/> Reprovado(a) <input type="checkbox"/>	Assinatura:  CPF: 600.963.572-15

O parecer final do Exame de Defesa foi:

Aprovado

Não Aprovado



\_\_\_\_\_  
Presidente da Banca Examinadora



## AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre cuidar de mim com todo o seu amor, e me ajudar a manter a esperança mesmo nos momentos de dificuldades e incertezas, pela oportunidade de viver bons momentos, e por colocar tantas pessoas de luz em minha vida.

Aos meus pais, Marinei e Osmar, por todo apoio e encorajamento, vocês são minhas maiores inspirações.

Ao meu noivo, Jiwon Kim, por toda compreensão e companheirismo durante essa jornada.

Ao meu orientador, Dr. Allyson Guimarães, por acreditar em mim e por toda paciência, confiança e pelos ensinamentos durante todos esses anos. Você é um exemplo não só de profissional, mas também de ser humano, sempre nos guiando com compreensão e empatia, tenho orgulho de ser orientada por você!

À minha coorientadora, Dra. Adriana Malheiro, pela colaboração para que esse projeto pudesse ser realizado.

À Fabíola Hanna, quem eu considero uma mãe científica e que esteve comigo desde o início dessa trajetória, por sempre estar disponível e disposta a ajudar.

À minha amiga, Amanda Lima, pelos momentos de alegria e desespero que compartilhamos, você ajudou a tornar essa jornada mais leve.

À minha amiga, Luciana Viana, que me acompanhou desde a graduação e sempre esteve pronta à ajudar e fez isso com toda dedicação e paciência. Você contribuiu significativamente para a minha formação e é um exemplo de persistência.

Ao meu amigo, Joey Ramone que tive a honra de auxiliar no desenvolvimento do seu projeto de iniciação científica e compartilhar vários momentos de alegria e aprendizado dentro do laboratório. Você agregou muito a minha formação profissional.

Aos demais colegas de pesquisa e membros do Grupo Amazon InterScience por compartilhar os bons e maus momentos.

Aos colaboradores do Laboratório Genômica, em especial à Dra. Andréa, Wagner e Rafaela por todo o apoio oferecido para que os projetos sejam realizados com excelência.

À equipe do laboratório de marcadores celulares da Fundação HEMOAM, em especial, Dr. Nilberto Dias que sempre me ajudou com a obtenção de amostras dos pacientes.

À Dra. Aya Sadahiro, pela disponibilidade e dedicação em me instruir durante o estágio de docência. Foram momentos de muito aprendizado no âmbito da docência.

Aos colaboradores do SAME, por nos ajudarem com a logística de busca em prontuários.

À Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM).

À Universidade do Estado do Amazonas (UEA) pela oportunidade de fazer parte do programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia e contribuir para a divulgação de pesquisa nessa área que muito há a ser explorada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo concedimento da bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

À todos os demais que contribuíram para a realização desse projeto. Muito obrigada!

## **DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), através das resoluções nº 002/2008, 007/2018 e 005/2019 (Programa Pró-Estado), por financiar indiretamente esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), responsável pelo pagamento da bolsa que colaborou para a realização deste estudo.

**EPÍGRAFE**

*“Temos que continuar aprendendo. Temos que estar abertos. E temos que estar prontos para espalhar conhecimento a fim de chegar a uma compreensão mais elevada da realidade”.*

**Thich Nhat Hanh**

## RESUMO

Apesar dos avanços terapêuticos, 25% das crianças com leucemia linfoblástica aguda (LLA) recaem durante o tratamento devido a diversos mecanismos celulares intrínsecos. Estudos relatam que a alta expressão de genes antiapoptóticos e de resistência a múltiplas drogas estão associados com falhas terapêuticas em vários tipos de neoplasias, incluindo as leucemias. Todavia, há uma carência de estudos que demonstrem a influência da expressão desses genes na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B). Assim, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a expressão de genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1*, *MVP*) e genes antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) no prognóstico clínico de pacientes com LLA-B diagnosticados na Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) e comparar seus níveis de expressão aos de crianças saudáveis. Foi realizado um estudo longitudinal do tipo prospectivo, no qual foram incluídos amostras de medula óssea (MO) e sangue periférico (SP) de 17 pacientes pediátricos com LLA-B, de faixa etária geral e ambos os sexos, durante a terapia de indução, sendo coletadas ao diagnóstico (D0) e no final da terapia (D35). Adicionalmente, foi coletado amostras de SP de 17 crianças saudáveis, atendidas no ambulatorial da Fundação HEMOAM. A detecção da expressão dos genes (*ABCB1*, *ABCC1*, *MVP*, *TP53*, *BCL2*) ocorreu através da técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando sondas de expressão *Taqman*. Foi observado que os genes antiapoptóticos *BCL2* e *TP53* demonstraram serem mais expressos em pacientes com LLA-B em comparação a indivíduos saudáveis no SP. Além disso, níveis de expressão dos genes de resistência *ABCB1*, *ABCC1* e *MVP* diminuíram na medula óssea ao D35 da terapia de indução, contrapondo o aumento na expressão de *ABCC1* e *MVP* no D35 em comparação com D0 de amostras de sangue periférico desses pacientes. Por fim, observamos que indivíduos saudáveis expressaram níveis mais elevado de *MVP* em comparação a pacientes com LLA. Ao final do estudo, observamos que a avaliação da expressão dos genes *ABCB1*, *ABCC1*, *MVP*, *BCL2* e *TP53* podem auxiliar na avaliação do prognóstico desses pacientes, contribuindo na detecção de possíveis biomarcadores moleculares e na criação de terapias alvos de forma agregada a quimioterapia atual. No entanto, investigações futuras são necessárias para o melhor entendimento do impacto da expressão desse genes na remissão medular nesses pacientes, gerando dados que contribuam com aumento da taxa de sobrevida na LLA-B.

**Palavras-chave:** LLA; *ABCB1*; *ABCC1*; *MVP*; *TP53*; *BCL2*

## ABSTRACT

Despite therapeutic advances, 25% of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) relapse during treatment due to various intrinsic cellular switches. Studies report that the high expression of anti-apoptotic genes and resistance to multiple drugs are types associated with therapeutic failures in several neoplasms, including leukemias. However, there is a lack of studies demonstrating the influence of the expression of these genes on the response to induction therapy in patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). Thus, the present study aimed to characterize the expression of multi-drug resistance genes (ABCB1, ABCC1, MVP) and anti-apoptotic genes (TP53 and BCL2) in the clinical prognosis of patients with B-ALL projected at Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) and compare their expression levels to those of healthy children. A prospective longitudinal study was carried out, in which bone marrow (BM) and peripheral blood (SP) were included in 17 pediatric patients with B-ALL, of general age group and gender, during induction therapy, being collected at diagnosis (D0) and at the end of therapy (D35). In addition, a SP sample was collected from 17 healthy children, attended at the HEMOAM Foundation outpatient clinic. Detection of gene expression (ABCB1, ABCC1, MVP, TP53, BCL2) was performed using the quantitative real-time PCR (qPCR) technique using Taqman expression probes. It was observed that the anti-apoptotic genes BCL2 and TP53 were more expressed in patients with B-ALL compared to healthy subjects in SP. Furthermore, levels of expression of resistance genes ABCB1, ABCC1 and MVP decreased in the bone marrow at D35 of the induction therapy, counteracting the increase in expression of ABCC1 and MVP at D35 compared to D0 of reference blood from those patients. Finally, we observed that healthy individuals expressed higher levels of MVP compared to patients with ALL. Finally, we observed that the evaluation of the expression of the ABCB1, ABCC1, MVP, BCL2 and TP53 genes can help in the evaluation of the prognosis of these patients, contributing to the detection of possible molecular biomarkers and the creation of targeted therapies in addition to current chemotherapy. However, future investigations are necessary for a better understanding of the impact of the expression of these genes on medullary remission in these patients, generating data that contribute to an increase in the survival rate in A-ALL.

**Keywords:** ALL; ABCB1; ABCC1; MVP; TP53; BCL2

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> A- Representação do sangue periférico de um indivíduo saudável com presença de hemácias e três pequenos linfoblastos de citoplasma escasso; (B) Aspirado de medula óssea de um paciente com leucemia linfoblástica aguda, no qual observa-se um elevado número de linfoblastos de tamanho homogêneo. ....	19
<b>Figura 2.</b> Taxa de incidência de leucemia para ambos os sexos (0-19 anos). ....	21
<b>Figura 3.</b> Diagrama esquematizado da hematopoiese. ....	22
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do funcionamento dos transportadores ABC na célula. ....	30
<b>Figura 5.</b> Ativação da via intrínseca da apoptose regulada por membros da família Bcl-2. ....	36
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do fluxograma do estudo dividido em três etapas: Inclusão dos participantes; Coleta de amostras e armazenamento; Procedimento. ....	39
<b>Figura 7.</b> Avaliação da integridade do RNA por gel de agarose não desnaturante a 0,8%. ....	42
<b>Figura 8.</b> Curva de amplificação gerada para o gene GAPDH de 96 amostras, ilustrando a razão entre o nível de emissão de luz com o número de ciclos. ....	43
<b>Figura 9.</b> Representação gráfica do número de amostras controles de sangue periférico que expressaram os genes: GAPDH, BCL2, TP53, ABCB1, ABCC1 e MVP. ....	47
<b>Figura 10.</b> Representação gráfica do número de amostras do grupo caso ao D0 (A) e D35 (B) do sangue periférico que expressaram o genes em estudo. ....	48
<b>Figura 11.</b> Representação gráfica do número de amostras do grupo caso ao D0 (A) e D35 (B) da medula óssea que expressaram o genes em estudo. ....	49
<b>Figura 12.</b> Avaliação da média do Ciclo Threshold (CT) por gene, representados pelas letras: A - GAPDH; B - ABCC1; C - ABCB1; D - TP53; E - BCL2; F- MVP. Os Ct dos genes alvo foram subdivididos conforme os dias ( D0 e D35) e tipos de amostras: sangue periférico (SP) e medula óssea (). ....	50
<b>Figura 13.</b> Avaliação da expressão do gene <i>BCL2</i> em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle. ....	51
<b>Figura 14.</b> Avaliação da expressão diferencial de <i>BCL2</i> em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA. ....	51
<b>Figura 15.</b> Avaliação da expressão do gene <i>TP53</i> em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle. ....	52

<b>Figura 16.</b> Avaliação da expressão diferencial de <i>TP53</i> em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA. ....	52
<b>Figura 17.</b> Avaliação da expressão do gene <i>ABCB1</i> em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle. ....	53
<b>Figura 18.</b> Avaliação da expressão diferencial de <i>ABCB1</i> em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.....	54
<b>Figura 19.</b> Avaliação da expressão do gene <i>ABCC1</i> em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle. ....	54
<b>Figura 20.</b> Avaliação da expressão diferencial de <i>ABCC1</i> em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.....	55
<b>Figura 21.</b> Avaliação da expressão do gene <i>MVP</i> em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle. ....	55
<b>Figura 22.</b> Avaliação da expressão diferencial de <i>ABCC1</i> em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.....	56



**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Medicamentos e doses especificadas no protocolo GBTLI-2009 para o tratamento de pacientes de LLA com baixo risco de recaída.....	26
<b>Tabela 2.</b> Medicamentos e doses especificadas no protocolo GBTLI-2009 para o tratamento de pacientes de LLA com alto risco de recaída.....	27
<b>Tabela 3.</b> Gene de referência, localização e kit de expressão gênica. ....	44
<b>Tabela 4.</b> Avaliação dos dados sociodemográfico, clínicos e laboratoriais dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda e do grupo controle. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURA

ABC	<i>ATP binding cassette</i> (sítio de ligação a ATP)
ABCB1	<i>ATP binding cassette subfamily B member 1</i> (Poli-peptídeo membro 1 da família B da superfamília ABC)
ABCC1	<i>ATP binding cassette subfamily C member 1</i> (Poli-peptídeo membro 1 da família C da superfamília ABC)
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> (Homólogo 1 do oncogene viral da leucemia murina de Abelson)
AF4	Proteína de fusão
ATP	Adenosina trifosfato
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i> (Linfoma de células B 2)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
D0	Dia do diagnóstico
D35	Dia trinta e cinco da terapia de indução à remissão
DLN	Domínio ligantes de nucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRAM	Modulador de autofagia regulado por danos no DNA 1
DRM	Doença residual mensurável
FAB	Franco Americano Britânico
GBTLI	Grupo Brasileiro para Tratamento de Leucemia Linfóide Aguda
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (Molécula de adesão intercelular 1)
INCA	Instituto Nacional de Câncer
kD	kiloDalton
LIF	<i>Interleukin 6 Family Cytokine</i> (Citocina da Família Interleucina 6)
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LLA-B	Leucemia linfoblástica aguda de células B
LLC	Leucemia linfoblástica crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LRP	Proteína associada à resistência
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MLL	<i>Mixed lineage leukemia</i> (Leucemia de linhagem mista)
mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
MRPI	Proteína relacionada a resistência a múltiplas drogas

MSH2	<i>Human Muts Homolog 2</i> (Muts homólogo 2)
MVP	<i>Major vaults proteins</i> (Proteína de abóbada principal)
nPCR	NESTED Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)
OMS	Organização mundial da saúde
P21	Inibidor de ciclina quinase
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBX1	<i>Pre-B-cell leukemia homeobox 1</i> (Homeobox 1 de leucemia de células pré-B)
PGP	Glicoproteína P
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RCBP	Registro de câncer de base populacional
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcrição reversa - Reação em Cadeia da Polimerase
RUNX1	<i>Rut-related transcription factor 1</i> (Fator de transcrição 1 da família RUNX)
SAME	Sistema de atendimento médico e estatístico
SP	Sangue periférico
TNF	Fator de necrose tumoral
TP53	<i>Tumor protein 53</i> (Proteína tumoral 53)
TSP1	Trombospondina-1

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>17</b>
2.1. LEUCEMIAS .....	18
2.1.1 Tipos De Leucemia.....	19
2.1.2 Epidemiologia.....	20
2.2. HEMATOPOIESE .....	22
2.3. LEUCEMOGÊNESE .....	23
2.4. DIAGNÓSTICO E ESTRATIFICAÇÃO .....	24
2.5. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA LEUCEMIA .....	24
2.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS.....	28
2.7 SUPERFAMÍLIA ABC.....	29
2.7.1 <i>ABCB1</i> .....	30
2.7.2 <i>ABCC1</i> .....	32
2.8. <i>MPV</i> .....	33
2.9. GENES ANTIAPOPTÓTICOS .....	34
2.9.1. <i>TP53</i> .....	34
2.9.2. <i>BCL2</i> .....	35
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.8. OBJETIVO GERAL .....	37
3.9. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
4.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	38
4.2. TIPO DE ESTUDO.....	37
4.3. FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	38
4.4. PACIENTES E AMOSTRAGEM .....	40
4.5. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE .....	40
4.5.1. Critérios De Não Inclusão .....	40
4.5.2. Critérios De Exclusão.....	40
4.6. COLETA DE DADOS .....	41
4.7. COLETA DE AMOSTRAS .....	41

4.8. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS .....	41
4.9. EXTRAÇÃO DE RNA .....	41
4.10. SÍNTESE DE CDNA .....	42
4.11. EXPRESSÃO GÊNICA.....	43
4.12. ANÁLISE DE DADOS.....	44
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
5.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	45
5.2. AVALIAÇÃO DOS CICLOS THRESHOLD (CT) POR GENES.....	49
5.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS.....	50
5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA.....	53
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>9. APÊNDICE .....</b>	<b>69</b>
9.1. APÊNDICE 01- EQUIPE DO PROJETO.....	69
9.2. APÊNDICE 02 – FINANCIAMENTO DO PROJETO .....	69
9.3. APÊNDICE 03 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP- HEMOAM .....	70
9.4. APÊNDICE 04 - POP01 EXTRAÇÃO DE RNA.....	72
9.5. APÊNDICE 05 - POP02 SÍNTESE DE CDNA.....	74
9.6. APÊNDICE 06 – POP03 EXPRESSÃO GÊNICA.....	75
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>77</b>
10.1. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS 2021-2022.....	77
10.2. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS 2021-2022.....	83

## INTRODUÇÃO

A leucemia linfoblástica aguda (LLA) é uma neoplasia hematopoiética caracterizada pela proliferação desordenada de linfoblastos na medula óssea comprometendo a produção de outras linhagens celulares, além de acometer o sangue periférico (SP) e órgãos como fígado e baço (1). O pico de incidência da doença, ocorre entre 2 a 5 anos de idade afetando predominantemente o sexo masculino, sendo considerada doença maligna mais prevalente na infância constituindo cerca de 75% a 80% de todas as leucemias agudas em idade pediátrica (2)

De acordo com os Registros de Câncer de Base Populacional (RCBP), entre os anos de 1999-2010, observou-se um aumento geral na taxa de incidência de leucemia na primeira infância na Região Norte, onde Manaus destacou-se com os maiores números de casos. Para o triênio 2020-2022 são estimados para capital do Amazonas, Manaus, aproximadamente 6,28 casos por 100 mil habitantes para os homens e 5,75 casos por 100 mil habitantes para as mulheres, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA)(3). Um estudo realizado na capital por Silva-Júnior et al (2019) demonstrou que a maioria dos casos de LLA foi proveniente dos municípios de Manaus, Tefé e Maués. Além disso, o subtipo B (79,55%) foi predominante em relação ao subtipo T (9,01%), bem como gênero masculino, baixo grau de escolaridade e renda(3)

Na LLA, os protocolos utilizados para tratamento consistem em três fases: indução a remissão, com o objetivo de eliminar a maior quantidade de linfoblastos possíveis (geralmente são usados corticoides, *Vicristine*, *L-asparaginase* e *Daunoblastina*); a fase da consolidação da remissão, que busca erradicar as células leucêmicas residuais através da associação de diversos quimioterápicos e a fase da manutenção na qual, ocorre um tratamento mais brando e contínuo por meses, afim de prevenir eventos de recaída (4).

Apesar dos avanços terapêuticos, 25% das crianças com LLA apresentam recaídas ocasionadas pela presença de células residuais oriundas de alterações genéticas (presente em 90% dos pacientes) e mecanismos de resistência quimioterápica (5). Dentre as anomalias genéticas, 50% são translocações cromossômicas e influenciam na agressividade da doença, bem como na resposta a terapia, além da busca de melhor conduta quimioterápica (6). Outro mecanismo apontado é a resistência à quimioterapia, podendo ser intrínseca (ausência de resposta ao medicamento antes da exposição dele) ou adquirida (resistência após o tratamento). Além disso, há diversos mecanismos que ajudam as células neoplásicas a desenvolverem resistência a múltiplas drogas como efluxo de

compostos citotóxicos mediados por proteínas transmembrana que levam à diminuição do acúmulo celular da droga e da sua toxicidade (7).

As bombas de efluxo fortemente relacionadas a resistência a múltiplas drogas são pertencentes a família de transportadores ABC (8). Um dos membros dessa família é o gene de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*) e codifica a glicoproteína P (PGP) presente na membrana celular com funcionamento de bomba de efluxo na qual usa a energia da quebra do ATP (Adenosina Trifosfato) para realizar o transporte ativo de medicamentos quimioterápicos para fora da célula. Esse mecanismo pode causar a diminuição da sua concentração citoplasmática nas células neoplásicas e promover a resistência cruzada a medicamentos que não são estruturalmente semelhantes (9). Outros genes envolvidos na resistência a medicamentos é o gene da proteína relacionado a resistência a múltiplas drogas (*ABCC1*) (também pertencente à família ABC) e a proteína relacionada a resistência pulmonar (*MVP*) que apesar de não fazer parte da família ABC, é amplamente descrito (10).

O mecanismo antiapoptótico também é apontado como uma possível falha do tratamento na LLA (12). A apoptose é um tipo de morte celular, controlada pela interação entre várias moléculas, visando a eliminação de células indesejadas(11) A expressão de genes antiapoptóticos como o gene do linfoma de células B (*BCL2*) e *TP53* desenvolve um papel importante no processo de regulação negativa da apoptose e estão associados com resistência ao tratamento da LLA (11,12)

Entretanto, apesar da alta taxa de recaída na LLA na região norte, há uma carência de estudos que demonstrem a influência da expressão de genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*) e genes antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, tornando de grande importância nosso estudo que por caracterizar esses genes na população em estudo e fornecer dados clínicos acerca da população. Nosso estudo servirá de base para pesquisas futuras que visem a identificação de biomarcadores de prognóstico para LLA a fim de contribuir para a melhor conduta terapêutica destes pacientes.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

Os primeiros casos de leucemia foram registrados na literatura no início do século XIX. Em 1811, Peter Cullen relatou o caso de um paciente com inflamação do baço (Esplenite aguda) cujo

sangue possuía um aspecto leitoso. Alfred Velpeau (1825), em Paris, definiu os sintomas associados à leucemia ao descrever um caso de uma paciente, na qual o seu sangue estava grosso, sendo semelhante a pus. Alfred Donné (1844) ao observar o sangue de uma paciente sob a mesma condição, observou pouca diferenciação celular e uma quantidade excessiva de células brancas chegando a pensar que o sangue tinha sido misturado com pus(13).

No ano de 1845, John Bennett fundador da microscopia clínica francesa definiu a doença pelo termo “leucocitemia”, ao observar durante a microscopia um acúmulo de leucócitos purulentos com pouca diversidade morfológica. Neste mesmo ano, Rudolf Virchow, analisou uma amostra de sangue e percebeu um desequilíbrio entre as células brancas e vermelhas, havendo grande quantidade de células brancas em relação as células vermelhas. Posteriormente, em 1847, Virchow observou um segundo caso e utilizou o termo “*leukhemia*” que significa “sangue branco” para descrever a doença. No ano de 1850, foi descrito o primeiro caso de leucemia infantil pelo médico Henry Fuller (14). Na Alemanha, Neumann e Nikolaus Friedreich no ano de 1857, diferenciaram a leucemia em formas crônicas e agudas, assim como suas variantes esplênicas (posteriormente denominada por mieloide) e linfáticas (15).

Em relação ao tratamento das leucemias, no final da década de 1890, a radioterapia foi inicialmente utilizada como esquema terapêutico, entretanto, não foi obtido resultados eficazes. Somente em 1948, Sydney Farber e seus colegas, relataram que o agente antifolato aminopterina, precursor do metotrexato, provocava remissões temporárias em crianças com leucemia linfoblástica aguda (LLA). No decorrer dos anos foram elaborados esquemas terapêuticos a fim de um melhor tratamento para leucemia. No Brasil, em 1980, iniciou-se o primeiro protocolo brasileiro multicêntrico de tratamento da LLA infantil, denominado grupo cooperativo brasileiro de tratamento de leucemia linfóide aguda na infância (GBTLI), sendo o mais atualizado atualmente(16).

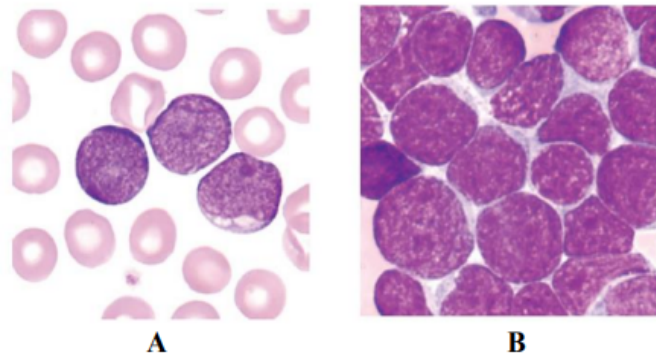
## 2.1. LEUCEMIAS

As leucemias são um grupo heterogêneo de doenças malignas do sangue, no qual um clone maligno das células-tronco hematopoiéticas resulta na proliferação anormal de leucócitos, ocupando o lugar das células normais e comprometendo o funcionamento das células do sangue. As leucemias diferem entre si nas suas características clínicas, morfológicas e moleculares, como



também, na evolução e prognóstico, sendo classificadas de acordo com o grau de diferenciação celular, em leucemias agudas ou crônicas e de acordo com o seu tipo de linhagem celular predominante envolvido, em mieloide e linfoide (17).

Nas leucemias agudas, encontram-se células anormais imaturas (blastos), que se desenvolvem de forma acelerada e deixam a medula óssea ainda como células disfuncionais (**Figura 1**). Um indivíduo normal apresenta cerca de 1% a 5% de blastos entre as células presentes na medula óssea e de acordo com a Organização mundial da saúde (OMS), para o diagnóstico de leucemia aguda é necessário ter mais de 20% de blastos presentes na medula (18). Os estágios de desenvolvimento hematopoiético são alvos para transformação maligna da doença, tais como: a célula tronco multipotente e as células precursoras mieloides e linfoides, culminando nas leucemias mieloides e linfoides (19). No mundo, as leucemias são a décima causa de morte por câncer, sendo a leucemia linfoblástica aguda considerada o câncer pediátrico mais comum e responsável por 80% dos casos neste grupo e 20% em adultos (20)



**Figura 1.** A- Representação do sangue periférico de um indivíduo saudável com presença de hemácias e três pequenos linfoblastos de citoplasma escasso; (B) Aspirado de medula óssea de um paciente com leucemia linfoblástica aguda, no qual observa-se um elevado número de linfoblastos de tamanho homogêneo.

**Fonte:** Rodak B et al (2013).

### 2.1.1 TIPOS DE LEUCEMIA

Segundo a OMS, para as leucemias, temos como base não apenas as características morfológicas e citoquímicas, como também imunofenotípicas e genético-moleculares. As leucemias podem ser classificadas de acordo com a linhagem acometida (mieloide ou linfoide) e

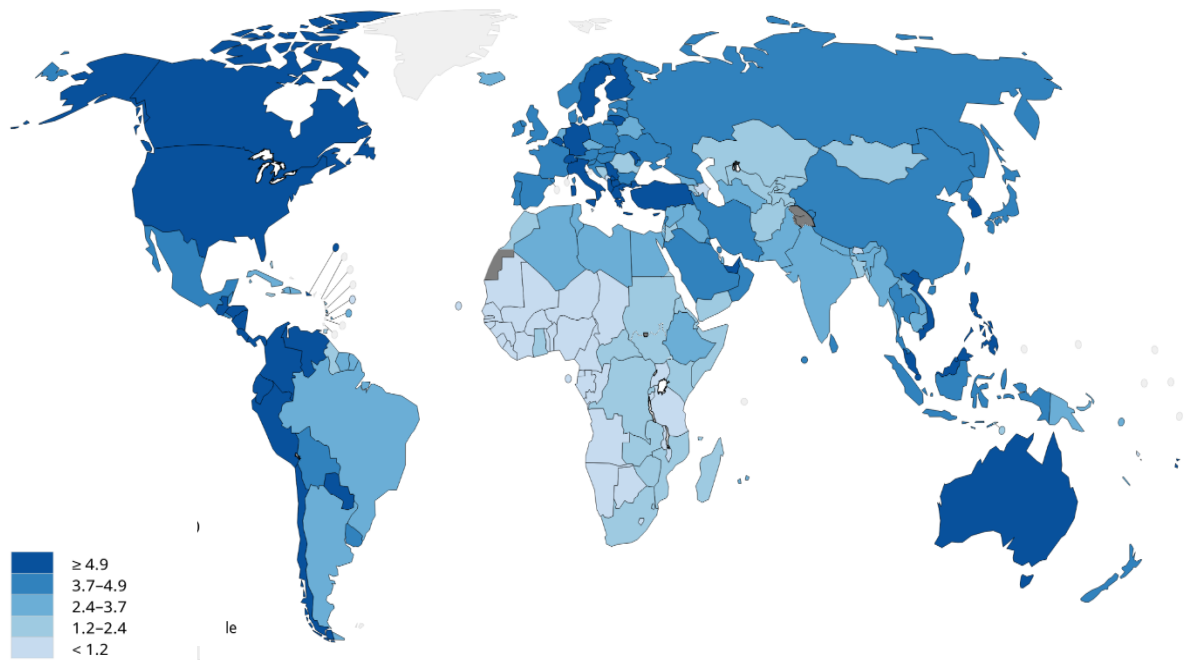
tempo de evolução (crônica ou aguda). Desta forma, temos como os principais tipos: leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC) (21)

A LLA é considerada a neoplasia hematológica que mais acomete crianças no mundo. Tem como característica a rápida evolução e proliferação anormal de células imaturas, culminando na diminuição e interrupção do processo de diferenciação dos leucócitos e levando à proliferação exacerbada de blastos incapazes de exercer suas funções normais (21,22). A OMS divide a LLA em dois grandes grupos: leucemia linfoblástica aguda de precursor B, que corresponde a 80% dos casos, e leucemia linfoblástica aguda de precursor T, a partir de marcadores celulares (22)

Outra classificação também aplicada, principalmente em regiões com pouco recursos financeiros, é a do grupo cooperativo Franco Americano-Britânico (FAB) no qual classifica a LLA em três subtipos: L1, L2 e L3. Essa classificação baseia-se na coloração das células do sangue periférico, no aspirado ou biópsia de medula óssea pelo método de *Wright-Giemsa* e das reações citoquímicas, tendo como requisitos de identificação: a morfologia celular, presença de nucléolos, membrana nuclear regular, tamanho da célula e número de blastos (20,22).

### 2.1.2 EPIDEMIOLOGIA

A LLA é a doença maligna mais comum na infância, podendo acometer crianças de todas as faixas etárias, principalmente até os 5 anos, sendo mais comum em crianças de cor branca e do gênero masculino (1). A LLA é a doença mais frequente em países industrializados e em áreas urbanas de países em desenvolvimento. Segundo a OMS, observa-se um número maior de casos em países desenvolvidos, como demonstrado na Figura 2 (23,24).



**Figura 2.** Taxa de incidência de leucemia para ambos os sexos (0-19 anos).

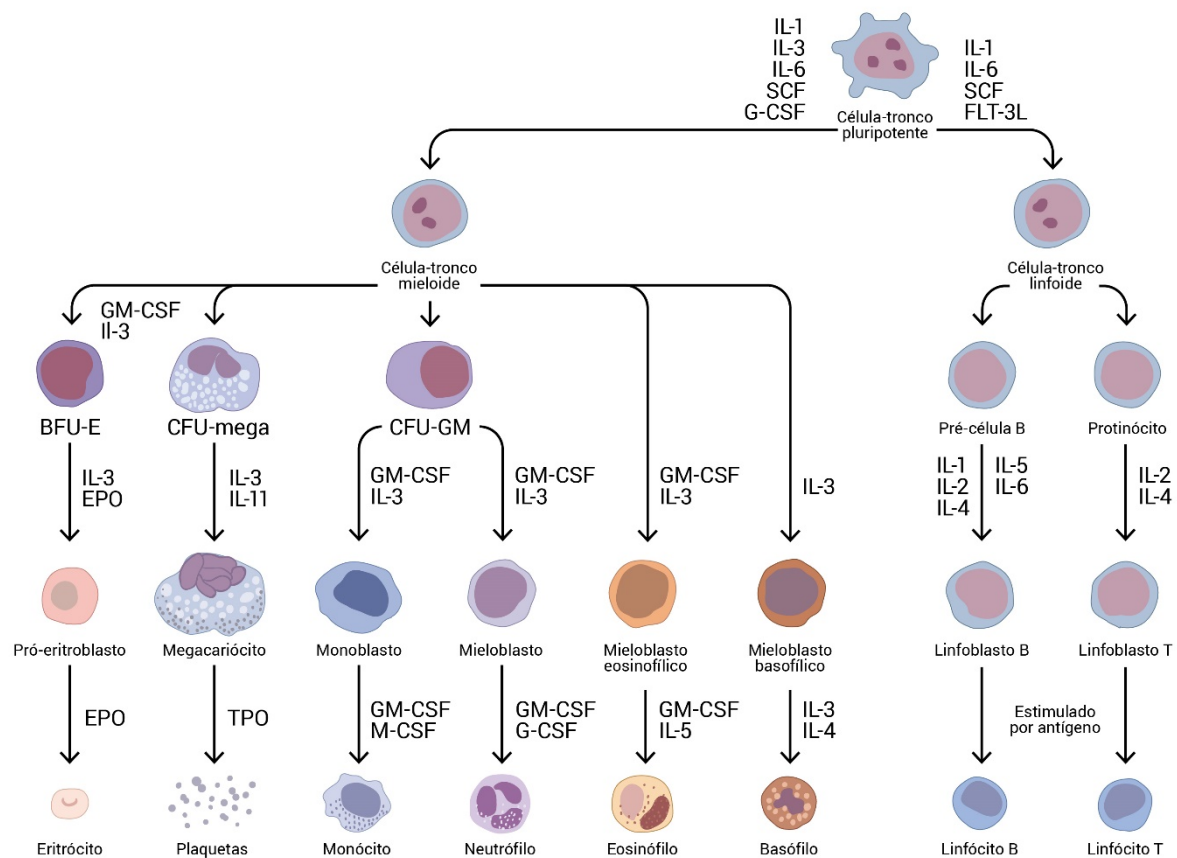
**Fonte:** Globocan (2020)

Um estudo epidemiológico de base populacional com 184 países, realizado por Miranda-Filho et al (2018) apontou que as maiores taxas de incidência de leucemias para ambos os sexos foram na Austrália e Nova Zelândia, seguido da América do Norte e Europa Ocidental, com a menor incidência demonstrada na África Ocidental (25).

De acordo com os registros de câncer de base populacional (RCBP), a leucemia em crianças destaca-se no Brasil com frequência entre 25% a 30% de todos os cânceres pediátricos, e entre os anos de 1999-2010, observou-se um aumento geral na taxa de incidência de leucemia na primeira infância na Região Norte, onde Manaus destacou-se com os maiores índices de casos(3). Para o triênio 2020-2022, no Brasil, são estimados para capital Manaus 6,28 casos de leucemias por 100 mil habitantes para os homens e 5,75 casos por 100 mil habitantes para as mulheres(24). Em um estudo realizado por Silva-Júnior et al (2019), demonstrou que os municípios do interior que apresentaram a maior frequência de casos LLA, além da capital Manaus, foram Tefé e Maués (3).

## 2.2. HEMATOPOIESE

Denomina-se hematopoiese, o processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue, como os eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Todas as células sanguíneas são oriundas de percussores celulares indiferenciados, conhecidos como células hematopoiéticas pluripotentes. Essas células possuem capacidade de divisão, autorrenovação e diferenciação, podendo dar origem as principais células sanguíneas, como eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Todo processo de hematopoiese é regulado por fatores de transcrição e crescimento hematopoiético como está sendo representado na **figura 3** (26).



**Figura 3.** Diagrama esquematizado da hematopoiese.

**Fonte:** Sanarmed (2012).

### 2.3. LEUCEMOGÊNESE

Os mecanismos etiológicos da LLA permanecem desconhecidos, no entanto, acredita-se que alguns fatores de risco estão associados com desenvolvimento da doença, como a exposição à agentes químicos/radiativos (benzeno e radiação ionizante, por exemplo), anemia de Fanconi, infecções comuns, alto peso ao nascer, dentre outros que contribuem para o processo de leucemogênese a partir da susceptibilidade à alterações genômicas, sendo a translocação cromossômica, o evento molecular mais observado nesta malignidade (27).

A frequência da ocorrência das alterações genéticas desencadeadoras da LLA, pode variar de acordo com a faixa etária do diagnóstico. A  $t(4;11)(q21;q23)$  que codifica o gene *KMT2A-AFF1* é presente em cerca de 50-80% dos pacientes lactentes (<1 ano), 2-20% das crianças (2-18 anos), 10% dos pacientes adultos (>18 anos) e está associada a um prognóstico desfavorável. Já o gene *ETV6-RUNX1*, resultante da  $t(12;21)(p13;q22)$  é expresso em cerca de 12-15% das crianças, 2% dos adultos está relacionado com o prognóstico favorável. A  $t(1;19)(q23;p13)$  [*E2A-PBX1*] está associada com um prognóstico favorável e é expressa principalmente em crianças (2-6%), seguidas dos adultos (3%). O gene *BCR-ABL1*, expresso em decorrência da  $t(9;22)(q34;q11.2)$  é identificado principalmente nos adultos (25%), em menor parcela em crianças (1-3%) e está correlacionado com um prognóstico desfavorável. Além disso, a hiperdiploidia é detectada em aproximadamente 20-30% das crianças, 7% dos adultos e está associada com um prognóstico favorável. Outras alterações responsáveis pelo processo de leucemogênese são encontradas em menor frequência na LLA. Por fim, a identificação dessas mutações podem ser úteis na classificação do prognóstico, detecção da doença residual mensurável e na definição do tratamento farmacológico adequado nessa população(28).

A partir da aquisição de uma ou mais alterações genéticas, as células hematopoiéticas progenitoras de linfócitos (blastos) remodelam a sinalização de diversas vias relacionadas com a proliferação, diferenciação e morte celular. Estes eventos favorecem a proliferação exacerbada de blastos ineficientes e resistentes à apoptose na medula óssea, resultando na supressão da produção de outros elementos sanguíneos, como hemácias, plaquetas e neutrófilos. Além disso, essas células anormais podem povoar regiões extra-medulares, como baço, fígado, testículos e SNC, podendo comprometer as funções fisiológicas dos órgãos relacionados (29–31).

## 2.4. DIAGNÓSTICO E ESTRATIFICAÇÃO

A triagem dos pacientes com suspeita de LLA é realizada através do hemograma. A maior parcela (60%) dos indivíduos com esta doença manifestam alta leucometria ( $>100.000/\text{mm}^3$ ), embora 25% apresentem contagem  $<4.000/\text{mm}^3$ , com alta expressão de blastos na medula óssea ( $>20\%$ ) e em casos mais avançados, no sangue periférico e regiões extra-medulares. A partir de indícios da presença da doença, são realizados exames celulares, citogenéticos e moleculares que auxiliam no diagnóstico e prognóstico destes pacientes (16,32).

A distinção entre os subtipos da leucemia é realizada através de exames de imunofenotipagem, mielograma, e análises citogenéticas e moleculares. A análise citológica da medula óssea, também conhecida como mielograma, é utilizada na verificação da morfologia e quantificação de células leucêmicas presentes na região medular. Pacientes com contagem de blastos igual ou superior a 20%, comumente são categorizados como portadores de leucemia aguda, no entanto é somente a partir do exame de imunofenotipagem que se garante um diagnóstico preciso (38,39). A imunofenotipagem auxilia na distinção das linhagens celulares associadas com os diferentes fenótipos da LLA, através da detecção de marcadores celulares específicos (*CDs: clusters of differentiation*) de cada subgrupo da doença. Para isso, é utilizada a técnica de citometria de fluxo, que garante a determinação das linhagens dos linfoblastos nos diferentes estágios de maturação, permitindo a classificação da doença (33).

Os exames de citogenética e biologia molecular são peças fundamentais no contexto da estratificação e tratamento dos pacientes com LLA, pois a identificação de alterações genéticas específicas auxilia na categorização destes indivíduos conforme o risco da doença. Além disso, a avaliação dessas alterações permite a individualização do tratamento antineoplásico. Diversos agentes alvo-específicos foram desenvolvidos baseados na expressão de marcadores moleculares específicos, aumentando a sobrevivência dessa população. Em conjunto, estes exames e os citados anteriormente garantem um diagnóstico preciso, possibilitando o tratamento adequado e aumentando as taxas de remissão desses pacientes(33).

## 2.5. TRATAMENTOS CONVENCIONAIS PARA LEUCEMIA

Na década de 80, foi inserido no Brasil o primeiro protocolo brasileiro para o tratamento da LLA, desenvolvendo-se o grupo cooperativo brasileiro de tratamento da leucemia linfoblástica

aguda na infância (GBTLI). Desde então, foram realizados estudos e aperfeiçoamento do protocolo (GBTLI-80, 82, 85, 93 e 99) e atualmente encontra-se na sexta versão GBTLI -2009 (14,16).

Embora os esquemas terapêuticos possam variar conforme as diretrizes dos centros de tratamento, os protocolos de tratamento da LLA têm como etapas: Indução de remissão, que consiste na introdução de fármacos afim de eliminar a maior quantidade de linfoblastos possíveis, ou seja, fazer com que a medula óssea apresente menos de 5% de blastos e que o sangue periférico atinja valores normais de leucócitos, neutrófilos, plaquetas e hemoglobina. E em seguida, temos a fase da consolidação da remissão, que busca erradicar as células leucêmicas residuais através da associação de diversos quimioterápicos; por fim, a fase da manutenção, na qual ocorre um tratamento mais brando e contínuo por meses, afim de prevenir o acontecimento de recaída (34,35).

A maioria dos quimioterápicos agem através da destruição de células cancerosas por meio de diversos mecanismos inerentes ao ciclo celular (36). As principais classes farmacológicas incluem: agentes alquilantes (formam ligações covalentes com o DNA, impedindo sua replicação); antimetabólitos (bloqueiam uma ou mais vias metabólicas envolvidas na síntese do DNA); antibióticos citotóxicos (substâncias de origem microbiana que evitam a divisão celular); e derivados de plantas (agentes que afetam especificamente a função microtubular e, portanto, na formação do fuso mitótico) Na LLA, os medicamentos mais utilizados são: vincristina, daunorubicina, citarabina, L-asparaginase/PEG-L-asparaginase, 6-mercaptopurina, metotrexato, ciclofosfamida, Prednisona, dexametasona e nelarabine(16,37). Nas tabelas 1 e 2 está sendo demonstrado as etapas e medicamentos utilizados no tratamento de pacientes com LLA conforme, o seu grupo de risco. As tabelas estão baseadas nos critérios estabelecidos pelo protocolo GBTL-2009. No entanto, a duração das etapas e dose de medicamentos podem variar conforme as centros hospitalares e a resposta terapêutica em cada indivíduo.

**Tabela 1.** Medicamentos e doses especificadas no protocolo GBTLI-2009 para o tratamento de pacientes de LLA com baixo risco de recaída.

ETAPA (DURAÇÃO)	MEDICAMENTOS (DOSES)	
Indução da remissão (4 semanas)	Prednisona (40 mg/m <sup>2</sup> /dia) Vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /sem) L-asparaginase (5000 UI/m <sup>2</sup> /dia) Daunorrubicina (25 mg/m <sup>2</sup> /semana) MADIT	
Consolidação da remissão (2 semanas)	Ciclofosfamida (1 g/m <sup>2</sup> /dose) Citarabina (75 mg/m <sup>2</sup> /dose) 6-Mercaptopurina (50 mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT	
Intensificação (8 semanas)	Metotrexato (2 g/m <sup>2</sup> /dose) 6-Mercaptopurina (50 mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT	
Consolidação tardia (8semanas)	Dexametasona (6 mg/m <sup>2</sup> /dia) Vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /dose) Doxorrubicina (30 mg/m <sup>2</sup> /dose) L-asparaginase (5000 UI/m <sup>2</sup> /dose) Ciclofosfamida (1 g/m <sup>2</sup> /dose) Tioguanina (60 mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT	
Manutenção (1 ano e meio - pacientes são aleatoriamente colocados em um dos grupos)	GRUPO 1 6-Mercaptopurina (50 mg/m <sup>2</sup> /dia) + meto- trexato (25 mg/m <sup>2</sup> /dose) contínuos. Pulsos de vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /dia) + dexametasona (4mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT	GRUPO 2 6-Mercaptopurina (100 mg/m <sup>2</sup> /dia) + metotrexato (200 mg/m <sup>2</sup> ) intermitentes. Pulsos de vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /dia) + dexametasona (4mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT



**Tabela 2.** Medicamentos e doses especificadas no protocolo GBTLI-2009 para o tratamento de pacientes de LLA com alto risco de recaída.

ETAPA (DURAÇÃO)	MEDICAMENTOS (DOSES)	
<p>Indução da remissão (4 semanas - pacientes são aleatoriamente colocados em um dos grupos)</p>	<p>GRUPO A Prednisona (40mg/m<sup>2</sup>/dia) Vincristina (1,5mg/m<sup>2</sup>/sem) L-asparaginase (5000 UI/m<sup>2</sup>/dia) Daunorrubicina (25 mg/m<sup>2</sup>/dose) MADIT</p>	<p>GRUPO B Prednisona (40 mg/m<sup>2</sup>/dia) Vincristina (1,5 mg/m<sup>2</sup>/sem) L-asparaginase (5000 UI/m<sup>2</sup>/dia) Daunorrubicina (35 mg/m<sup>2</sup>/dose) Metotrexato (1 g/m<sup>2</sup>/dose) MADIT</p>
<p>Consolidação - Bloco A (1 semana)</p>	<p>Metotrexato (2 g/m<sup>2</sup>/dose) Tioguanina (100 mg/m<sup>2</sup>/dia) Citarabina (2 g/m<sup>2</sup>/dose) Ciclofosfamida (200 mg/m<sup>2</sup>) MADIT</p>	
<p>Consolidação - Bloco B (1 semana)</p>	<p>Vincristina (1,5 mg/m<sup>2</sup>/dose) Metotrexato (2 g/m<sup>2</sup>/dose) 6-Mercaptopurina (150 mg/m<sup>2</sup>/dia) Citarabina (2 g/m<sup>2</sup>/dose) MADIT</p>	
<p>Intensificação (8 semanas)</p>	<p>Dexametasona (6 mg/m<sup>2</sup>/dia) Vincristina (1,5 mg/m<sup>2</sup>/dose) Doxorrubicina (30 mg/m<sup>2</sup>/dose) L-asparaginase (5000 UI/m<sup>2</sup>/dose) Ciclofosfamida (1 g/m<sup>2</sup>/dose) Citarabina (75 mg/m<sup>2</sup>/dose) Tioguanina (60 mg/m<sup>2</sup>/dia) MADIT</p>	
<p>Consolidação - Bloco C (1 semana)</p>	<p>Metotrexato (2 g/m<sup>2</sup>/dose) 6-Mercaptopurina (150 mg/m<sup>2</sup>/dia) Etopósido (150 mg/m<sup>2</sup>/dia) Citarabina (2 g/m<sup>2</sup>/dose)</p>	
<p>Consolidação - Bloco D (1 semana)</p>	<p>Ifosfamida (1,8 g/m<sup>2</sup>/dia) Etopósido (150 mg/m<sup>2</sup>/dia) MADIT</p>	

Consolidação tardia (8 semanas)	Dexametasona (6 mg/m <sup>2</sup> /dia) Vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /dose) Doxorrubicina (30 mg/m <sup>2</sup> /dose) L-asparaginase (5000 UI/m <sup>2</sup> /dose) Ciclofosfamida (1 g/m <sup>2</sup> /dose) Citarabina (75 mg/m <sup>2</sup> /dose) Tioguanina (60 mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT
Manutenção (1 ano e meio)	6-Mercaptopurina (50 mg/m <sup>2</sup> /dia) + metotrexato (25 mg/m <sup>2</sup> /dose) Contínuos Pulsos de vincristina (1,5 mg/m <sup>2</sup> /sem) + dexametasona (4 mg/m <sup>2</sup> /dia) MADIT

Apesar dos avanços terapêuticos no tratamento de LLA, aproximadamente 25% das crianças recaem durante o tratamento. Isso pode ser devido a uma diversidade de fatores como presença de anormalidades genéticas, mecanismos envolvidos na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas, tais como os quimioterápicos usados no tratamento e expressão de genes antiapoptóticos (38).

## 2.6. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A MÚLTIPLAS DROGAS

A combinação de múltiplas drogas para o tratamento quimioterápico determinou um avanço na diminuição das taxas de resistência, porém, diversas neoplasias mesmo com o uso de diferentes tipos de fármacos continuam resistentes(39). Alguns tumores são intrinsicamente resistentes ao tratamento, outros respondem nos estágios iniciais, entretanto, adquirem posteriormente a resistência a múltiplas drogas (MDR), causada principalmente, pela ação de um grupo de proteínas de membrana, que atuam como bombas de efluxo de drogas que realizam o transporte de moléculas citotóxicas para fora da célula, mantendo as taxas de concentrações intracelulares de quimioterápicos abaixo das concentrações citotóxicas desejadas (40).

Duas famílias de proteínas estão implicadas ao fenômeno de MDR, sendo elas a superfamília das *ATP-binding cassette* (transportadoras ABC) que durante o século XX, através do programa de sequenciamento do genoma humano, proporcionou à descoberta de uma variedade de

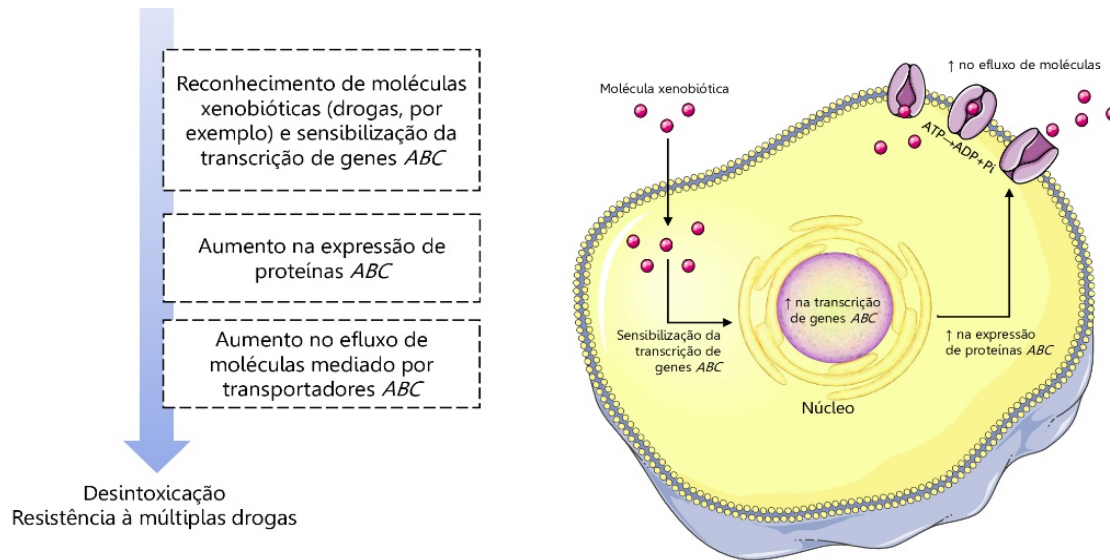
transportadores desta família, além da família das *human major vault proteins* (MVP) que são componentes predominantes de organelas denominadas de *vaults*. Essas organelas estão localizadas principalmente em vesículas citoplasmáticas, todavia, podem ser encontradas na membrana nuclear e nos complexos de poros nucleares em pequenas quantidades. A função das proteínas que compõem a família das MVP ainda é desconhecida, entretanto, estudos apontam que devido sua localização, elas sejam responsáveis por realizar um transporte bidirecional de uma variedade de substratos entre o núcleo e o citoplasma(41).Dentre as proteínas membros desta família, a proteína associada à resistência pulmonar (MVP) se destaca por ser frequentemente associada ao fenômeno de MDR(42).

## 2.7 SUPERFAMÍLIA ABC

A superfamília de transportadores ABC constitui uma das maiores famílias de proteínas transmembrana já descrita na literatura, composta por mais de 40 membros nos seres humanos e presentes em todas as espécies vivas. Essas proteínas atuam como receptores, canais e transportadores, estando envolvidas com o transporte de diversas substâncias tais como, hormônios, lipídeos e xenobióticos (8). As proteínas da família ABC podem ser encontradas tanto na membrana plasmática das células quanto no sistema de endomembranas, tais como, nas membranas do retículo endoplasmático, vacúolos digestivos, peroxissomos, na membrana mitocondrial e no envelope nuclear (43).

Essas proteínas são transportadoras dependentes da hidrólise do ATP, elas apresentam como característica em comum um domínio específico ABC (ATP-Binding Casett)(44). Dentro do grupo de proteínas ABC, temos a glicoproteína-P (codificada pelo gene ABCB1) e a proteína MRP1 (codificada pelo gene ABCC1), ambas se destacam por transportar uma variedade de moléculas através de membranas biológicas tais como, substâncias endógenas, xenobióticos e seus metabólitos, incluindo vários conjugados, drogas anticancerígenas, metais pesados, ânions orgânicos e lipídios. Essas proteínas estão sendo amplamente associadas a resistência a drogas, devido estarem superexpressas no câncer(45). Na **figura 4**, está sendo representado o processo de funcionamento desses transportadores ABC. Ao realizarem o reconhecimento das moléculas, ocorre o processo de sensibilização da transcrição de genes ABC e em caso de aumento da

expressão das proteínas, ocorre um aumento no efluxo de moléculas resultando, na desintoxicação e resistência a múltiplas drogas.



**Figura 4.** Representação esquemática do funcionamento dos transportadores ABC na célula.

**Fonte:** Adaptado de Cattaneo et al. (2009).

### 2.7.1 *ABCB1*

O gene *ABCB1* (ATP binding cassette subfamily B member 1) (ID HGNC:40; Refseq: NM\_000927; OMIM:171050) de localização citogenética: 7q21.12, é expresso nas membranas plasmáticas de várias células e órgãos, incluindo o endotélio da barreira hematoencefálica (BHE), este gene codifica a glicoproteína P, uma transportadora transmembrana que é parte integrante da barreira hematoencefálica e transporta uma variedade de compostos xenobióticos da células(46) A glicoproteína P (P-gp) foi descrita pela primeira vez por Juliano e Ling (1976) ao observarem células ovarianas de hamster chinês e detectaram um fenótipo de resistência a fármacos devido um componente presente na membrana das células, no qual denominaram como uma glicoproteína de 170kD (glicoproteína P) que estava fortemente envolvida, na alteração da permeabilidade de fármacos (47). Ueda et al. (1986) confirmaram que o gene *ABCB1* anteriormente conhecido como *MDR1*, codifica a glicoproteína P(48).

Ao medirem o RNA ABCB1 em tumores humanos e tecidos normais, detectaram que o gene é expresso em níveis alto, na glândula adrenal e rim; intermediários no pulmão, fígado, jejuno inferior, cólon e reto; baixos em muitos outros tecidos. Este gene também foi expresso em diversos tumores humanos derivados da glândula adrenal e colón, sugerindo que a avaliação dos níveis de RNA ABCB1 seja uma ferramenta significativa para no projeto da quimioterapia(40). A glicoproteína-P (P-gp) responsável pela proteção das células de substâncias tóxicas ou metabólitos os seus domínios transmembranares são compostos por seis segmentos abrangentes capazes de reconhecer e ligar-se a uma variedade de compostos, como drogas quimioterápicas, inibidores de proteases, imunossuppressores, bloqueadores de canais de cálcio, dentre outros (49).

Essa proteína apresenta um papel crucial na eliminação de medicamentos administrados por via oral, por limitar sua biodisponibilidade por efluxo de drogas e absorção de substratos do intestino, como também na excreção de substratos na urina, acelerando a depuração renal (49,50). Sugere-se que fatores ambientais e genéticos podem influenciar na variabilidade interindividual da expressão ou função da P-gp e assim, na resposta a terapia medicamentosa visto que, a maioria dos medicamentos quimioterápicos entram nas células neoplásicas através de difusão de membrana celular, o que torna vulneráveis a ação das bombas de efluxo e evitam que as drogas entrem no citoplasma. Esse mecanismo pode estar diretamente envolvido nas taxas de recidivas de diversas doenças, incluindo a leucemia (51).

A alta expressão de ABCB1 tem sido frequentemente observada em tumores humanos após quimioterapia Estudos apontam que a superexpressão ABCB1 é considerado um fator sugestivo de pior resposta a quimioterapia em pacientes com LMC e resistência a prednisolona, um dos medicamentos utilizados no tratamento de pacientes com LLA(51).Sharnouby et al (2010) sugeriu, que a expressão de ABCB1 afeta a remissão completa e as taxas de sobrevida em pacientes com LLA (52). Além disso, Hirose et al (2009), demonstrou uma correlação significativa entre a expressão aumentada de ABCB1 e a proteína codificada pelo gene P-gp com o nível de resistência a vincristina (VCR), quimioterápico utilizado no tratamento da LLA(40). Drach et al (2009) observou que a expressão de ABCB1 está envolvida não apenas em células leucêmicas, mas também em populações de células hematopoiéticas normais, como células progenitoras CD34+ e linfócitos do sangue periférico, sendo capazes de expressar um fenótipo multirresistente (53).

### 2.7.2 *ABCCI*

O gene *ABCCI* (ATP binding cassette subfamily C member 1) (ID HGNC:51; Refseq: NM\_004996; OMIM: 158343) de localização citogenética: 16p13.11, codifica a proteína de resistência múltipla-1 (MRP1) que faz parte da família de transportadores ABC. O MRP1 transporta uma gama estruturalmente diversificada de substâncias endógenas, bem como xenobióticos e seus metabólitos, incluindo vários conjugados, medicamentos anticancerígenos, metais pesados, ânions orgânicos e lipídios (54). A proteína é identificada principalmente na membrana plasmática das células e tem como função, remover agentes citotóxicos da célula por meio de transporte ativo (40).

A proteína de resistência a múltiplas drogas, foi descrita pela primeira vez por Cole et al (1992), após observar a existência de um segundo tipo de proteína (MRP1) que também funciona como bomba de efluxo de drogas, com ação de mediar a resistência à doxorubicina, etoposídeo, vincristina, entre outros (45). No entanto, atualmente essa proteína tem sido apontada com um papel mais amplo que mediar o efluxo de drogas dependente de ATP das células, que faz com que facilite as mudanças na conformação da proteína permitindo a passagem do soluto (55,56).

Estudos relatam que a alta expressão de *ABCCI* vem sendo associada ao desenvolvimento de resistência a drogas anticancerígenas em vários tipos de tumores e apontada como um fator de prognóstico desfavorável em diferentes neoplasias hematológicas não tratadas e refratárias à quimioterapia, incluindo as LMAs e LLAs.(49,64). Em um estudo de feito por Mahjoubi et al. observou-se que pacientes pediátricos iranianos com Leucemia Linfoblástica Aguda recidivante têm altos níveis de expressão gênica *ABCCI*(57). Além disso, no estudo de Mehrvar et al (2019) revelou uma relação entre altas doses de agentes quimioterápicos e a expressão gênica do transportador *ABCCI* em todos os pacientes recidivantes (58). Silveira-Júnior et al (2020), indicou que a detecção do fenótipo *MRP1* por citometria de fluxo pode ser um marcador molecular para o prognóstico de pacientes com LMA, visto que, foi observado no estudo uma associação entre a expressão de *MRP1* com achados laboratoriais de 133 pacientes de LMA de diferentes subtipos (59). O aumento da expressão de mRNA de *ABCCI* foi associado a recaída e a alta contagem de leucócitos em pacientes indianos com leucemia linfoblástica aguda, além disso, Gurbuxani et al (2001) sugere que são necessários outros estudos afim da investigação dos aspectos funcionais do transporte de drogas por *MRP1*(60).

## 2.8. *MPV*

O gene *MVP* (Major Vault Protein) (ID HGNC: 7531; Refseq:NM\_005115; OMIM: 605088) de localização citogenética: 16p11.2 também é conhecido pela denominação de proteína relacionada à resistência pulmonar (LRP). A proteína foi inicialmente identificada em 1986, em células de linhagem de câncer de pulmão resistentes a antraciclinas que não apresentavam aumento de expressão de *ABCB1* (61). Posteriormente, a análise da sequência de aminoácidos da MVP revelou que esta era, na verdade, a principal proteína da família das *major vault proteins* (MVP). *Vaults* são organelas citoplasmáticas presentes na membrana nuclear e no poro nuclear. A MVP geralmente está associada a vesículas e lisossomos e acredita-se que seja responsável pela absorção de drogas nas vesículas citoplasmáticas que provavelmente são expulsas da célula por exocitose (62).

Devido à sua localização sugestiva na membrana nuclear, sugere-se que a MVP tenha um efeito no transporte bidirecional de drogas, no qual seu principal alvo é o DNA, desempenhando um papel importante na resistência a drogas(63). Elas podem ser encontradas fisiologicamente no cólon, pulmões, túbulos proximais renais, córtex e adrenal(62). A MVP pode levar a uma maior ou menor sensibilidade a quimioterapia em diferentes tipos de tumores, não se sabendo ao certo o seu papel no câncer, porém estudos sugerem que a superexpressão de MVP prediz uma pior resposta à quimioterapia e prognóstico na leucemia mieloide aguda e no carcinoma ovariano(64).

Além disso, a expressão de *MVP* também foi associada a uma resposta insatisfatória a quimioterapia e uma sobrevida curta, em casos de linfoma de célula B(61). Até o momento existem poucos estudos elucidando os mecanismos de participação da *MVP* no desenvolvimento da resistência a múltiplas drogas em neoplasias hematológicas principalmente na leucemia linfoblástica aguda (65). Segundo Valera et al (2004), apesar dos avanços na taxa de cura de pacientes com LLA, muitos desses pacientes apresentam recaídas. Ao analisar a expressão de RNA mensageiro para o gene *MVP* por RT-PCR semiquantitativo, observou que o risco relativo de recaída ou morte foi seis vezes maior entre as crianças com um aumento na expressão de *MVP* ao diagnóstico(66). Hu et al (2006), demonstrou que pacientes com leucemia aguda que expressaram mRNA de *MRP1* e *MVP* tiveram piores resultados e pior sobrevida em 2 anos(10).

## 2.9.GENES ANTIAPOPTÓTICOS

Apoptose é um processo biológico criticamente importante que desempenha um papel essencial no destino celular e na homeostase(67), desencadeada quando há exposição da célula a determinados estímulos como lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Esta morte celular tem como característica a presença de condensação e fragmentação da cromatina nuclear, além da quebra cromossomal do DNA e formação de corpos apoptóticos contendo fragmentos de células mortas e membrana plasmática, que posteriormente serão fagocitadas por macrófagos (68).

O processo de apoptose é altamente regulado por vias de sinalização celular e proteínas pró e antiapoptóticas. Mudanças nos genes que reagem a apoptose podem levar ao acúmulo de células neoplásicas, induzindo a taxa de crescimento e destruição celular. A apoptose é um importante fator na patogênese do câncer , visto que as células tumorais podem apresentar alta resistência ao tratamento radioterápico ou quimioterápico, devido ao controle ou inibição da via apoptótica (69,70).

Existem duas principais vias de ativação da apoptose, denominadas de via intrínseca e extrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial pode ser estimada por diversos fatores, como quimioterápicos que agem causando danos ao DNA, ruptura de microtúbulos e deficiência ou ausência de fatores de crescimento. Esta via é controlada por genes antiapoptóticos como o *BCL-2* e *p53*. Enquanto a via extrínseca é ativada por receptores de morte, como o fator de necrose tumoral (TNF), dentre outros (71).

### 2.9.1. TP53

O gene TP53 (*Tumor Protein p53*) (ID HGNC:11998; Refseq:NM\_000546; OMIM:191170) de localização citogenética: 17p13.1 é um regulador chave da apoptose e codifica a fosfoproteína p53, amplamente associada ao processo carcinogênico no microambiente tumoral. A p53 funciona como um fator de transcrição que tem um papel central na coordenação da resposta celular que é estabilizado e ativado por vários sinais genotóxicos e de estresse celular, tais como danos de DNA, hipóxia, perda de adesão celular, frio, calor, encurtamento telomérico, dentre outros. Essa proteína também atua regulando outros genes como proteínas da família *BCL-2* (72,73).



Os níveis de *TP53* em células normais são baixos, porém quando ocorre um estresse ou danos no DNA, a proteína é estabilizada e se torna ativa. A parada do ciclo, assim como a ativação da apoptose, é dependente de p53 e parece contribuir com a inibição do desenvolvimento do câncer em vários estágios (73). A p53 é expressa em aproximadamente 50% dos tumores humanos, podendo afetar tanto na evolução e biologia quanto resposta terapêutica (74). Dependendo de sua localização no citoplasma ou no núcleo, a p53 pode atuar inibindo ou induzindo o processo de autofagia, caracterizando importante mecanismo de resistência a drogas, além de interagir com inibidores de mTOR (regulador de crescimento, proliferação e sobrevivência celular)(75) Estudos apontam que mutações nesse gene estão associadas com o risco de recidivas e progressão da LLA-T e LLC (76).

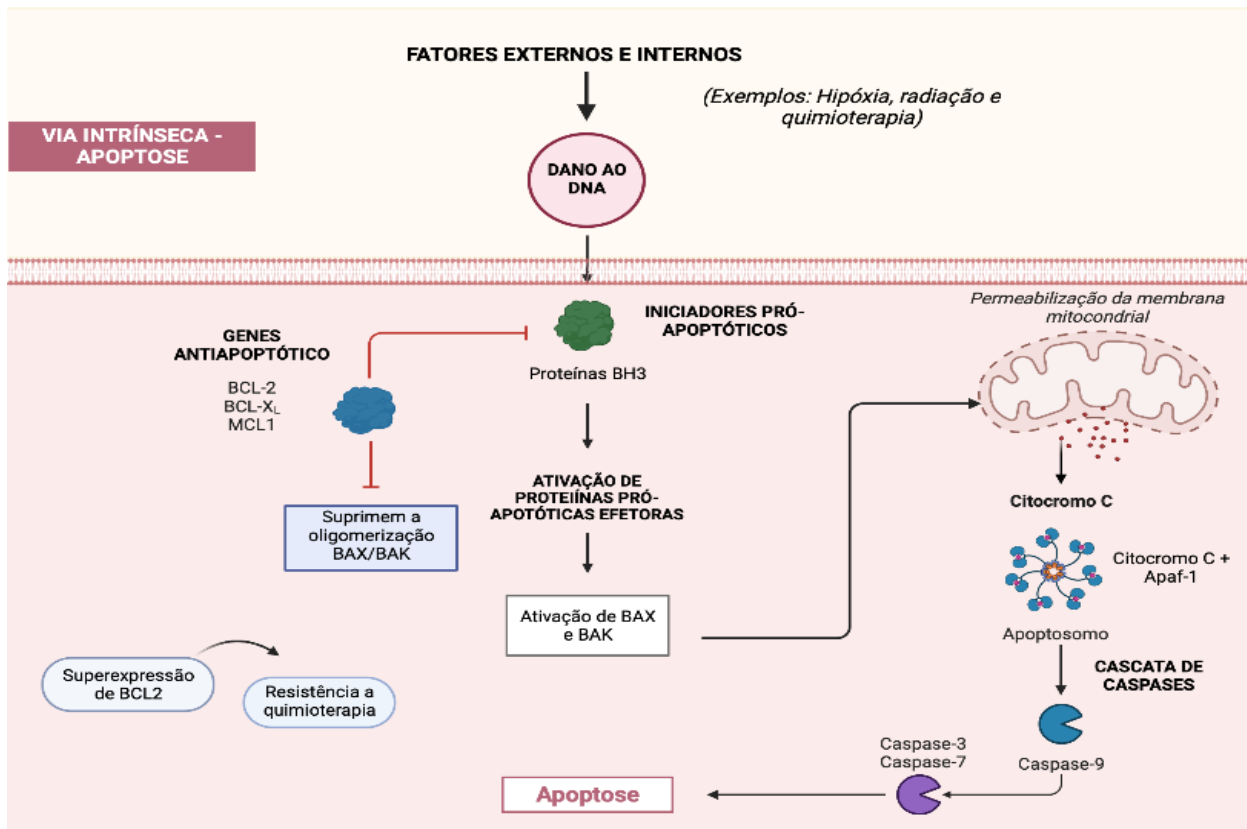
Cai et al (2020), demonstrou que a atividade da p53 influencia na iniciação da leucemia e sensibilidade terapêutica aos inibidores farmacológicos(75). Segundo Mattsson et al (2018), a alta expressão de *TP53* em pacientes após transplante de células-tronco hematopoiéticas sinalizam uma recaída em pacientes pediátricos com LLA, sugerindo um potencial marcador para prognóstico adicional afim de, prever recidiva após Transplante(74).

### 2.9.2. *BCL2*

O gene *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*) (ID HGNC: 990; Refseq NM\_000633 e OMIM:151430) de localização citogenética: 18q21.33, se trata de um proto-oncogene que codifica a proteína BCL2 e tem função de regulador-chave da via apoptótica mitocondrial intrínseca. Ngan et al. (1988) encontraram a proteína BCL2 imunorreativa em células neoplásicas de quase todos os linfomas foliculares, enquanto nenhuma proteína BCL2 foi detectada em tecido linfoide normal ou folículos afetados por processos não neoplásicos(77).

Em estudos de imunolocalização desenvolvidos por Hockenbery et al. (1990) demonstraram que a proteína BCL2 localiza-se na membrana mitocondrial interna. A proteína atua estabilizando o potencial de membrana e reduzindo a permeabilidade(78). Estudos apontam que o gene *BCL2* é um proto-oncogene regulador crítico de morte celular programada cuja expressão frequentemente se torna alterada em cânceres humanos (79,80). Em situações de estresse celular como processo de hipóxia, radiação e até mesmo a quimioterapia, como demonstrado na figura 5 ocorre a inativação dos membros antiapoptóticos da família BCL2 e ativação do membros pró-

apoptóticos efetores desta mesma família. Esta mudança reflete no aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e assim na liberação de proteínas que ativam a cascata de caspases resultando na apoptose (81).



**Figura 5.** Ativação da via intrínseca da apoptose regulada por membros da família Bcl-2. Fatores externos e internos podem acarretar em dano ao DNA, culminando na ativação de iniciadores pró-apoptóticos como proteínas BH3 que ligam-se a proteínas antiapoptóticas e ativam proteínas pró-apoptóticas efectoras (BAX/BAK) acarretando na permeabilização da membrana, liberação do citocromo C e consequentemente uma cascata de caspases resultando na apoptose. Genes antiapoptóticos como o *BCL2* também, está sendo demonstrado na figura, atuante na supressão da oligomerização BAK/BAX e evitando a apoptose. A superexpressão desse gene pode culminar na resistência quimioterápica.

**Fonte:** Adaptado de Adams et al. (2018).

Altos níveis de *BCL2* têm sido correlacionados com fenótipos mais agressivos, tanto no caso de neoplasias hematológicas como em tumores sólidos. Na LMA, a superexpressão do *BCL2* foi associada ao prognóstico ruim, conferindo um aumento na sobrevivência das células neoplásicas e

resistência a toxicidade dos agentes quimioterápicos (82,83). Shman et al (2008) observou que pacientes infantis com LMA foram menos sensíveis à apoptose espontânea e tiveram níveis de expressão de *BCL2* até 5 vezes maiores (84). Por outro lado, os níveis de expressão do gene *BCL2* tiveram uma correlação negativa em pacientes com leucemia linfoblástica aguda(85). Outro estudo demonstrou que a expressão de *BCL2* foi correlacionada a sensibilidade à apoptose após exposição à radiação ionizante em pacientes com LLA pediátricos (86).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Caracterizar a expressão de genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*) e antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) na resposta a terapia de indução em pacientes com leucemia linfoblástica aguda atendidos na Fundação HEMOAM.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar os níveis de expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*) e antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) em pacientes com leucemia linfoblástica aguda ao D0 e D35;
- Comparar os níveis de expressão dos genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*) e antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) em pacientes com leucemia linfoblástica aguda com os níveis expressão em crianças saudáveis atendidas na Fundação HEMOAM;

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. TIPO DE ESTUDO**

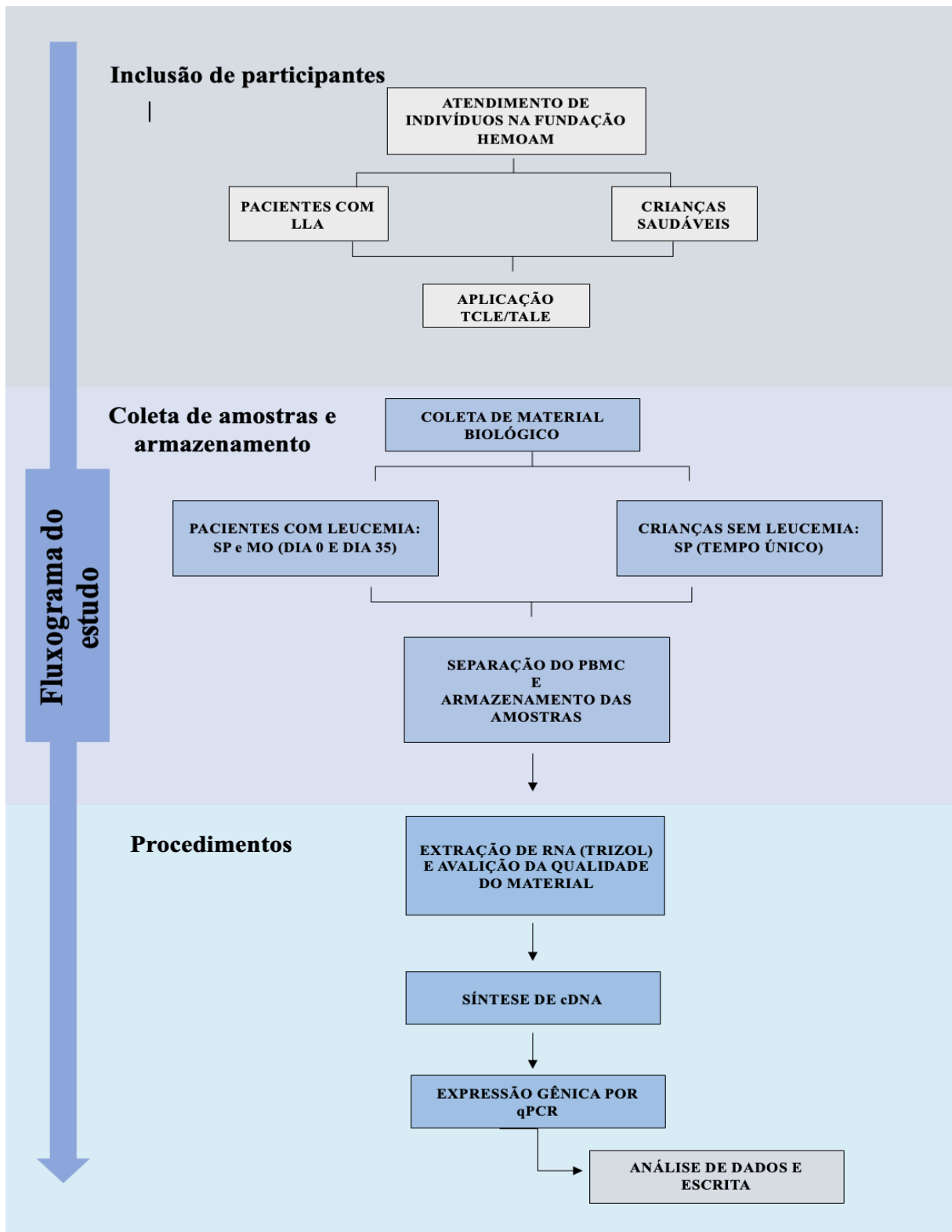
Trata-se de um estudo longitudinal do tipo prospectivo a fim de avaliar a influência da expressão de genes de resistência a múltiplas drogas (*ABCB1*, *ABCC1*, *MVP*) e antiapoptóticos (*TP53* e *BCL2*) no prognóstico de pacientes com leucemia linfoblástica aguda.

## 4.2. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto faz parte de um projeto maior intitulado “Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica” coordenado pelo Dr. Allyson Guimarães da Costa, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM) sob o seguinte número do parecer: 4.982.395 e data de parecer: 17/09/2021 (Apêndice 02).

## 4.3. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

O fluxograma de atividades realizadas no estudo, está sendo demonstrado na **Figura 6**. No qual foi dividido em 3 etapas: Inclusão de participantes ( seguindo os critérios de elegibilidade do grupo caso e grupo controle); Coleta e armazenamento de amostras, para o grupo caso fizemos a coleta em dois momentos (D0 e D35) sendo amostras de sangue periférico e medula óssea. Para o grupo controle foram realizadas coletas em tempo único e apenas amostras de sangue periférico; A etapa de Procedimento abrangeu as atividades como extração de RNA, síntese de cDNA, expressão gênica por qPCR, análise e escrita da tese.



**Figura 6.** Representação esquemática do fluxograma do estudo dividido em três etapas: Inclusão dos participantes; Coleta de amostras e armazenamento; Procedimento.

#### 4.4. PACIENTES E AMOSTRAGEM

No grupo caso, foram incluídos 17 pacientes diagnosticados com leucemia linfoblástica aguda do subtipo B, que procuraram atendimento na Fundação HEMOAM, no período de outubro de 2021 a dezembro de 2022. Realizamos as coletas de amostras (medula óssea e sangue periférico) em dois diferentes estágios (D0 e D35) a fim de avaliar os níveis de expressão gênica, durante as fases de tratamento. No grupo controle, incluímos 17 crianças (menores de 18 anos) que foram atendidas em consulta ambulatorial de rotina da Fundação HEMOAM, entre novembro de 2022 a abril de 2023 e que não apresentavam alterações na série leucocitária. Para o grupo controle, realizamos apenas coleta de amostra do sangue periférico em um único estágio.

#### 4.5. CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Foram incluídos no grupo caso, pacientes diagnosticados com LLA (menores de 18 anos), ambos os sexos e que estavam na fase de indução, conforme protocolos médicos estabelecidos e que procuraram atendimento na Fundação HEMOAM, no período de outubro de 2021 a dezembro de 2022. No grupo controle, foram incluídas crianças (menores de 18 anos) que deram entrada na Fundação HEMOAM entre novembro de 2022 a maio de 2023, para a realização de consulta ambulatorial de rotina e que não apresentavam alterações na série leucocitária. Os participantes de ambos os grupos, foram incluídos mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ao decidirem participar da pesquisa.

##### 4.5.1. CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO

Serão cessados do estudo portadores de qualquer outra doença hematológica, pacientes maiores de 18 anos, indígenas e que não se enquadrem aos nossos critérios de inclusão.

##### 4.5.2. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Serão excluídas amostras coaguladas ou insuficientes para a realização do experimento e amostras com má qualidade após extração do material genético.

#### 4.6. COLETA DE DADOS

Os dados foram coletados através de prontuários da Fundação HEMOAM, através do Setor de atendimento médico e estatístico (SAME) e sistema idocor sendo eles: dados sociodemográficos (Idade, gênero e residência), laboratoriais (hemograma, mielograma e imunofenótipo) e clínicos (protocolo de tratamento, manifestações clínicas e óbito).

#### 4.7. COLETA DE AMOSTRAS

Para o grupo caso, foram coletados aproximadamente 2 mL de amostra ( 2mL medula óssea e 2 mL de sangue periférico) ao D0 e D35. Para o grupo controle, foram coletados aproximadamente 2mL de amostra de sangue periférico. As amostras foram coletadas em tubos com sistema a vácuo contendo EDTA (*BD Vacutainer<sup>®</sup> EDTA K2*), pela equipe multidisciplinar da Fundação HEMOAM.

Assim realizamos a confirmação do diagnóstico no grupo caso e análise do hemograma do grupo controle, convidamos os indivíduos a participarem da pesquisa e posteriormente aplicação e assinatura do TCLE, em seguida as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Genômica da Fundação HEMOAM para processamento e armazenamento pela equipe do projeto.

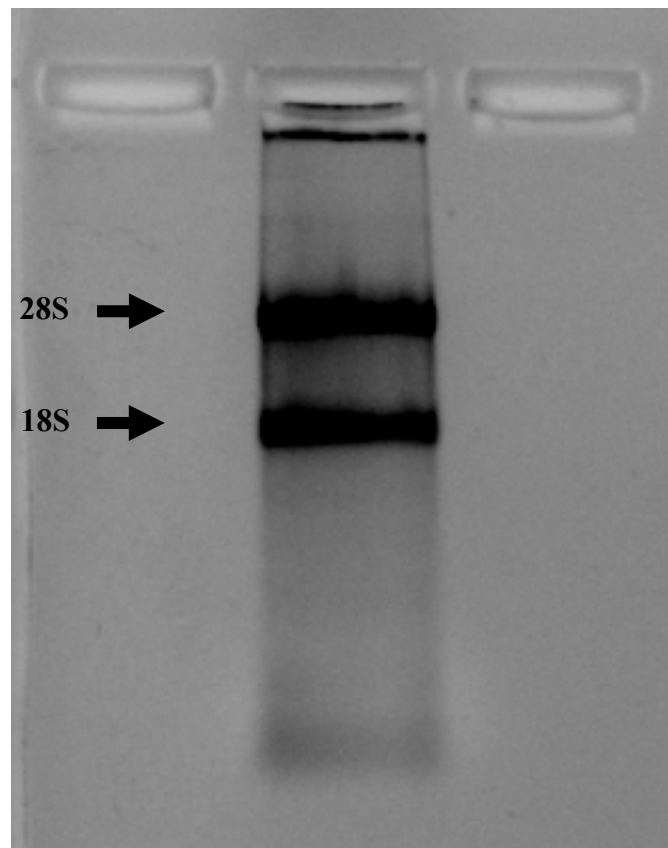
#### 4.8. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEADAS

Após a coleta das amostras de medula óssea e sangue periférico, realizamos o isolamento das células mononucleadas de sangue periférico (PBMC) com a lise de hemácias utilizando tampão de lise. Com o precipitado livre de hemácias, ressuspendemos o *pellet* com solução salina, homogenizamos, centrifugamos e foi desprezado o sobrenadante. Após ser retirada a solução salina, foi adicionado RNAlater para conservar as amostras em *pellet* e armazenadas em criotubos até o momento da extração do material genético.

#### 4.9. EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA (Ácido Ribonucleico) será extraído usando o reagente Trizol<sup>®</sup>, conforme descrito no POP01 presente em apêndice 04. A quantificação de RNA foi determinada usando o

espectrofotômetro *Nanodrop 2000c*, estabelecendo como valor de concentração aceitável um valor acima  $>60 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . A pureza do RNA foi determinada pelas relações 260/280 e 260/230, estabelecendo um valor  $>1,8$  como o parâmetro aceitável. Além disso a qualidade do RNA extraído foi posteriormente avaliada em gel de agarose não desnaturante a 0,8% corado com brometo de etídio (Figura 7).



**Figura 7.** Avaliação da integridade do RNA por gel de agarose não desnaturante a 0,8%. Observou-se na imagem a presença das bandas 28S e 18S, indicando que não houve degradação e contaminação por DNA genômico.

Fonte: Acervo pessoal.

#### 4.10. SÍNTESE DE cDNA

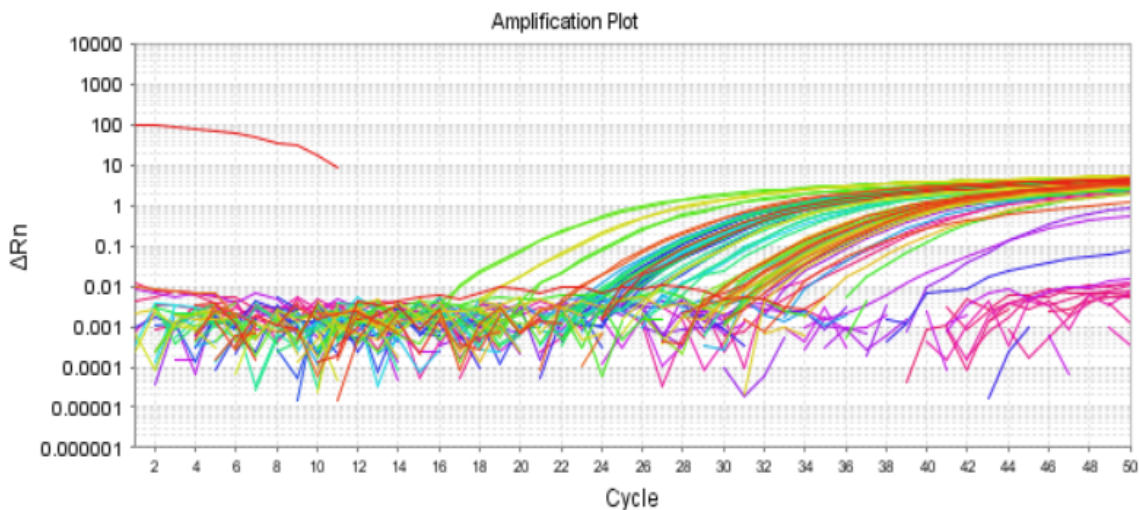
Foram convertidos 100ng de RNA total em cDNA (DNA complementar) utilizando o Kit *GoScript Reverse Transcription System*, conforme o protocolo do fabricante (POP02 - apêndice



05), para utilização no ensaio de expressão gênica os cDNAs sintetizados foram armazenados a -20°C até a realização da técnica.

#### 4.11. EXPRESSÃO GÊNICA

A detecção da expressão dos transcritos gênicos ocorreu através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR – Real Time) na qual, utiliza como marcador quantitativo as sondas fluorescentes *TaqMan*<sup>TM</sup> da *Applied Biosystems*, específicas para os genes de interesse (*ABCBI*, *ABCC1*, *MVP*, *TP53* e *BCL2*). Como controle para a comparação da expressão relativa, utilizamos indicadores para o gene *GAPDH*. As reações foram realizadas em duplicatas, em microplacas de 96 poços sendo adicionado água ultrapura (1,25µl), *Master Mix* universal (8µM) 2x (2,5 µl), sondas *TaqMan 20x* (0,25 µl), e cDNA (1µl) de cada paciente (O procedimento está descrito em detalhes no POP03, em apêndice 06).



**Figura 8.** Curva de amplificação gerada para o gene *GAPDH* de 96 amostras, ilustrando a razão entre o nível de emissão de luz com o número de ciclos.

Fonte: Acervo pessoal.

A amplificação das sequências de interesse será realizada no termociclador *StepOnePlus* e a leitura da fluorescência será realizada a partir do *software StepOne v2.0*, o qual gerará um gráfico exponencial que relaciona o nível de emissão de luz com o número de ciclos, está sendo

demonstrado na **Figura 8**, na qual ilustra a curva de amplificação gerada para o gene *GPDH* de 96 amostras. As sondas utilizadas no estudo estão descritas na **Tabela 1**, conforme a descrição dos genes de interesse. Para calcular a expressão relativa da expressão gênica, será utilizado o método de comparação de Ct ( $-\Delta\Delta CT^2$ ).

**Tabela 3.** Gene de referência, localização e kit de expressão gênica.

Gene	Localização	Kit de expressão gênica
<i>ABCB1</i>	7q21.12	Hs00184500_m1
<i>ABCC1</i>	16p13.11	Hs01561518_m1
<i>MVP</i>	16p11.2	Hs00250049_m1
<i>TP53</i>	17p13.1	Hs00153349_m1
<i>BCL2</i>	18q21.33	Hs04986394_s1
<i>GAPDH</i>	12p13.31	Hs02786624_g1

#### 4.12. ANÁLISE DE DADOS

Utilizamos o Excel para tabulação dos dados em planilhas. Análises descritivas foram realizadas para caracterizar a população do estudo. As variáveis categóricas foram comparadas usando o teste qui-quadrado de Pearson (correção de Yate) ou o teste bicaudal de Fisher e apresentadas como número e frequência (%) nas tabelas. Variáveis contínuas foram exibidas como mediana e intervalo interquartil (IQR) e testadas para distribuição Gaussiana usando o teste D'Agostino-Pearson. As comparações dos valores entre dois grupos independentes foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney, enquanto as comparações entre dois grupos dependentes foram feitas por meio do teste de postos assinados de pares combinados de Wilcoxon. Além disso, comparações múltiplas entre três ou mais grupos foram realizadas usando os testes de Kruskal-Wallis seguidos pelo teste de Dunn's. Em todos os casos, foi considerada significância  $p < 0,05$ . As análises foram realizadas usando o software *Graph Pad Prism v.8.0*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO EM ESTUDO

As características da população em estudo estão demonstradas na **Tabela 2**. Foram incluídos no estudo 17 indivíduos no grupo controle, com idade mediana de 10 anos, além de 17 indivíduos no grupo caso, com idade mediana de 6 anos. Foram predominantes, em ambos os grupos de estudo, os indivíduos do sexo masculino (53% e 71%).

Em relação a residência, 76% dos indivíduos que fizeram parte do grupo caso eram residentes na capital Manaus, enquanto 24% eram do interior do Amazonas. Todos os indivíduos do grupo controle eram provenientes da cidade de Manaus. 65% dos indivíduos do grupo caso apresentaram manifestações clínicas tais como, anemia (53%) adenomegalia (30%), febre (41%), outros (18%) (infecções, sangramentos, dor óssea, fadiga, dentre outros) e 35% dos pacientes não apresentaram manifestações clínicas aparentes. 2 (12%) pacientes incluídos no estudo, sofreram óbito durante o tratamento.

Os dados laboratoriais dos pacientes com LLA-B demonstraram uma mediana de Hemoglobina de 7,4 g/dL, Hematócrito de 21,40 g/dL, Leucócitos de 6.660 g/dL e Plaquetas de 27.000 g/dL. Em relação aos dados laboratoriais do grupo controle, foi demonstrado uma mediana de Hemoglobina de 13,70 g/dL, Hematócrito 40g/dL, Leucócitos 7.860 g/dL e Plaquetas 257.000 g/dL.

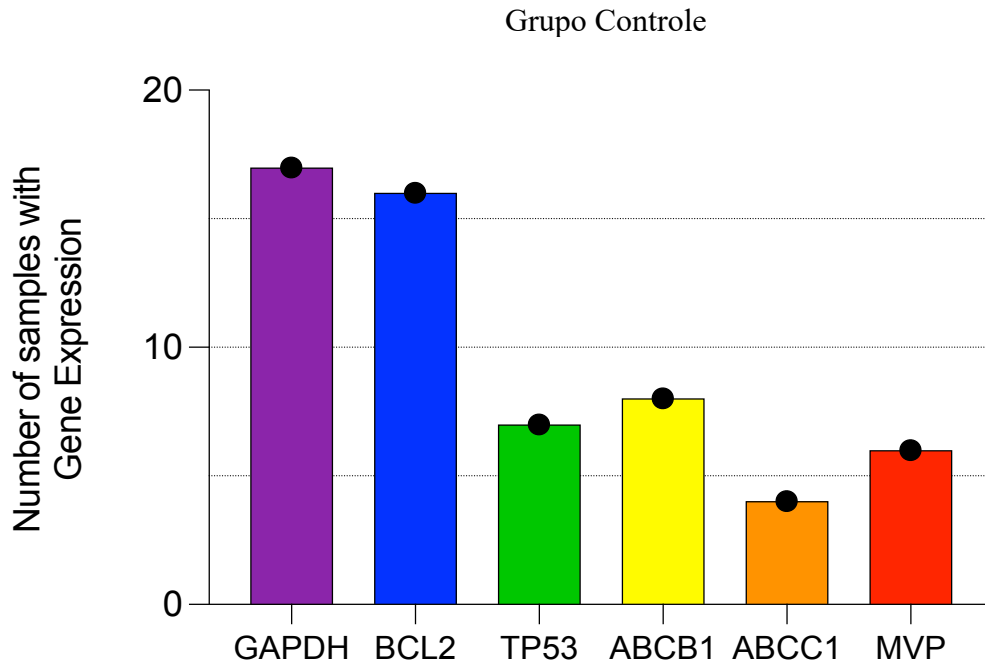
**Tabela 4.** Avaliação dos dados sociodemográfico, clínicos e laboratoriais dos pacientes com leucemia linfoblástica aguda e do grupo controle.

<b>Variáveis</b>	<b>Grupo Controle (n = 17)</b>	<b>Grupo Casos LLA-B (n = 17)</b>
Idade (idade, median [IQR])	10 [6-14]	6 [3-9]
<b>Gênero</b>		
Masculino, n(%)	9 (53%)	12 (71%)
Feminino, n(%)	8 (47%)	5 (29%)
<b>Residência</b>		
Manaus, n(%)	17 (100%)	13 (76%)
Interior do Estado do Amazonas, n(%)	-	4 (24 %)
Outro Estado, n(%)	-	-
<b>Manifestações clínicas</b>		
Sim, n(%)	-	11 (65%)
Anemia, n(%)	-	9 (53%)
Adenomegalia, n(%)	-	5 (30%)
Febre, n(%)	-	7 (41%)
Outros, n(%)	-	3 (18%)
Não, n(%)	-	6 (35%)
<b>Óbito</b>		
Sim, n(%)	-	2 (12%)
Não, n(%)	-	15 (88%)
<b>Hemoglobina</b> (g/dL, median [IQR])	13,70 [12,88 -14,25]	7,4 [6,3 - 8,9]
<b>Hematócrito</b> (g/dL, median [IQR])	40 [38,4 - 43,5]	21,40 [18,45 - 26,40]
<b>Leucócitos</b> (g/dL, median [IQR])	7.860 [6.095 - 8.580]	6.660 [2.305 -119.900]
<b>Plaquetas</b> (g/dL, median [IQR])	257.000 [19.500 -340.000]	27.000 [16.000 - 63.000]

## 5.2. EXPRESSÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Na **Figura 9.** está demonstrado o número de amostras presentes no grupo controle, que expressaram os genes em estudo. Das quais, 17 (100%) amostras expressaram nosso gene de

controle endógeno *GAPDH*, 16 (96%) expressaram o gene *BCL2*, 7 (41%) *TP53*, 8 (47%) *ABCB1*, 4 (23%) *ABCC1* e 6 (35%) *MVP*.

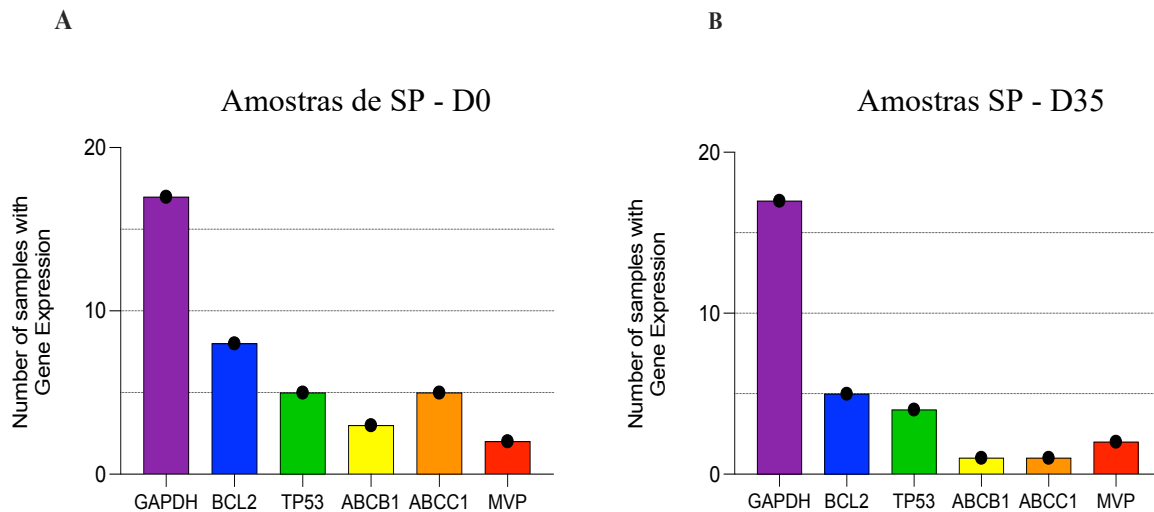


**Figura 9.** Representação gráfica do número de amostras controles de sangue periférico que expressaram os genes: *GAPDH*, *BCL2*, *TP53*, *ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*.

A **Figura 10** representa o número amostras de sangue periférico (SP) do grupo caso ao diagnóstico (D0) (representação A) e dia 35 (D35) (representação B) que expressaram os genes *GAPDH*, *BCL2*, *TP53*, *ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*. Em ambos os dias (D0 e D35), 100% dos pacientes expressaram o controle endógeno *GAPDH*. Em relação aos genes antiapoptóticos houve uma diminuição do número de amostras que expressaram os genes, ao D0 quando comparadas ao D35. 8 (47%) amostras expressaram o gene *BCL2* ao D0 e 5 (29%) amostras expressaram o gene ao D35. Para o *TP53*, 5 (29%) e 4 (23%) amostras foram expressas ao D0 e D35 respectivamente.

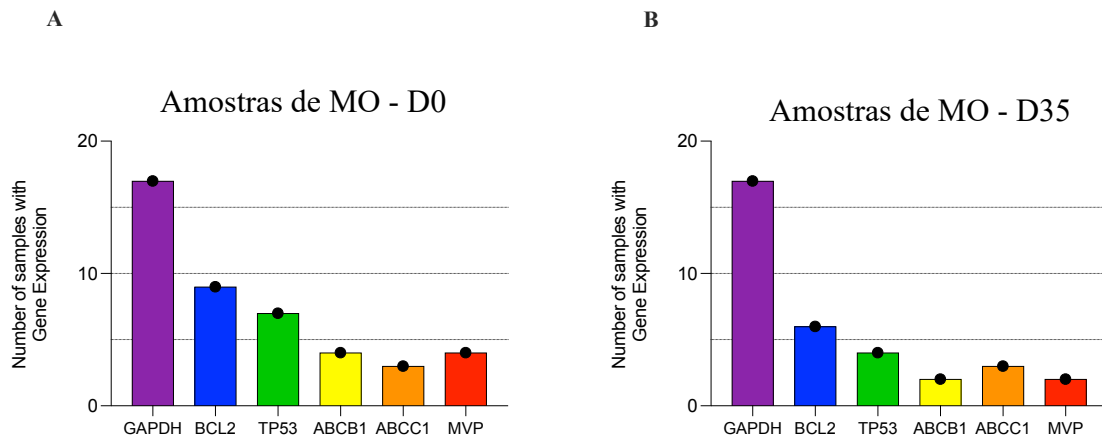
A quantidade de amostras de sangue periférico que expressaram os genes de resistência *ABCB1* e *ABCC1* no grupo caso também diminuíram no decorrer do D0 ao D35. No dia 0, 18% (3) das amostras expressaram o gene *ABCB1* e 29% (5) o gene *ABCC1* porém, ao dia 35 houve a expressão de apenas 1 (6%) amostra de sangue periférico para ambos os genes. O número de

amostras que expressaram o gene *MVP* permaneceu o mesmo ao compararmos ambos os dias, sendo 12% (2) das amostras que expressaram este gene (**Figura 10**).



**Figura 10.** Representação gráfica do número de amostras do grupo caso ao D0 (A) e D35 (B) do sangue periférico que expressaram o genes em estudo.

O número de amostras de medula óssea (BM) que expressaram os genes em estudo, estão representadas na **Figura 11**. Pode ser observado que todas as amostras expressaram o gene GAPDH em ambos os dias 0 e 35. Também foi possível observar uma diminuição na quantidade de amostras que expressaram os genes *BCL2*, *TP53*, *ABCB1* e *MVP* no D35 ao compararmos com D0. Foram expressas para o gene *BCL2* (9/6), *TP53* (7/4), *ABCB1* (4/2), *MVP* (4/2) amostras ao D0 e D35 respectivamente. O número de amostras de medula óssea que expressaram o gene de resistência *ABCC1*, demonstrou-se igual tanto dia 0 quanto no dia 35, sendo equivalente a 3 amostras (18%).

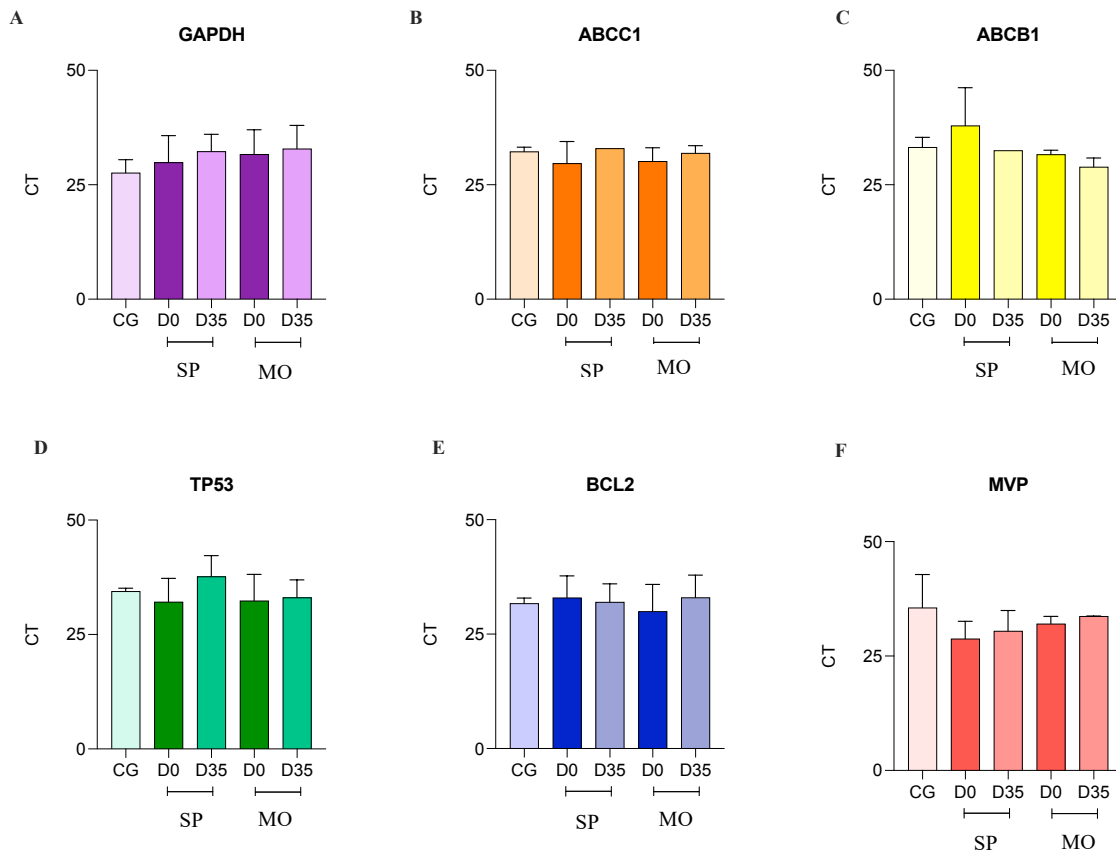


**Figura 11.** Representação gráfica do número de amostras do grupo caso ao D0 (A) e D35 (B) da medula óssea que expressaram o genes em estudo.

### 5.3. AVALIAÇÃO DOS CICLOS THRESHOLD (CT) POR GENES

A avaliação dos ciclos de Ciclo Threshold (Ct) por Genes (*GAPDH*, *BCL2*, *TP53*, *ABCB1*, *ABCC1* e *MVP*), dias (D0 e D35) e tipos de amostras (sangue periférico e medula óssea) está sendo representado na **Figura 12**. O Ct reflete ao número do ciclo no qual a fluorescência emitida em uma reação cruza o Threshold (linha limiar), equivalente a uma medida relativa da concentração do alvo na reação de qPCR. No qual observamos que, para o grupo controle do gene *GAPDH* (**Fig. 12A**) a média do Ct foi 27. Enquanto no grupo caso, a média do Ct para o D0 e D35 sangue periférico (PB) foi 28 e 30 respectivamente. As amostras medula óssea apresentaram o Ct 29 (D0) e 30 (D35).

A média do Ct do gene *ABCC1* (**Fig. 12B**) no grupo controle e amostras D35 do sangue periférico e medula óssea do grupo caso, foram de 30 para ambos os grupos. As amostras D0 apresentaram média de Ct igual a 29. O gene *ABCB1* (**Fig. 12C**) apresentou as seguintes médias de Ct: 29 (grupo controle), 32 (D0 - PB), 28 (D35 - PB) e (D0 - BM), 27 (D35 - BM). Em relação a média do Ct para o grupo controle dos genes *TP53* e *BCL2*, ambos apresentaram média de aproximadamente 28. O D0 (PB e BM) do gene *TP53* teve como Ct médio 27 e ao D35 (PB) a média foi de 32 enquanto, o D35 BM foi 29 (**Fig. 12D**). O Ct médio do grupo caso para os genes *BCL2* (**Fig. 12E**) e *MVP* (**Fig. 12F**) foi de aproximadamente 29 (PB e BM). No grupo controle as médias do Ct foram *BCL2* (27) e *MVP* (29).

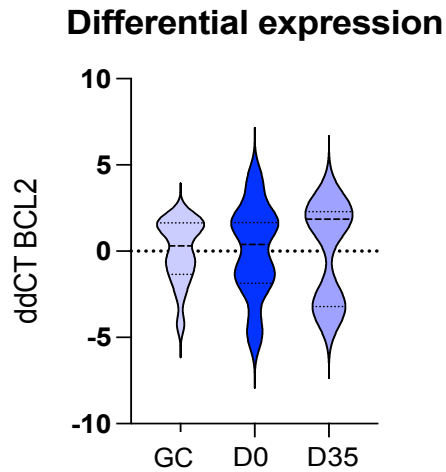


**Figura 12.** Avaliação da média do Ciclo Threshold (CT) por gene, representados pelas letras: A - *GAPDH*; B - *ABCC1*; C - *ABCB1*; D - *TP53*; E - *BCL2*; F- *MVP*. Os Ct dos genes alvo foram subdivididos conforme os dias (D0 e D35) e tipos de amostras: sangue periférico (SP) e medula óssea (MO).

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ANTIAPOPTÓTICOS

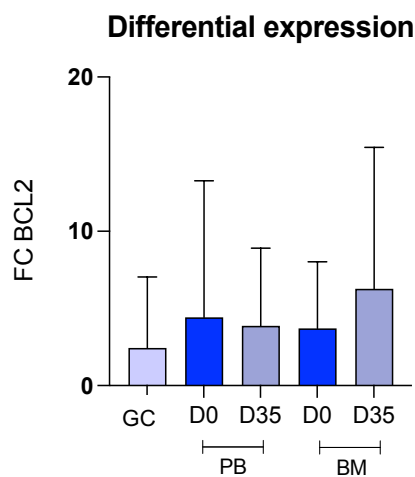
Para a quantificação relativa foi utilizado o método de Ct comparativo, no qual realizamos o cálculo 2- $\Delta\Delta C_t$  para avaliação da expressão gênica em amostras de sangue periférico (D0 e D35) e comparamos entre os grupos controle e caso (**Figura 13**). A expressão do gene *BCL2* foi estatisticamente menor em indivíduos saudáveis quando comparada com a expressão em pacientes com LLA ao D0 (Diagnóstico) e D35 (Durante a fase de indução do tratamento). Ao dia 35 observou-se que os pacientes com LLA apresentaram níveis mais altos de *BCL2* em amostras de sangue periférico quando comparadas ao dia 0, mas as diferenças não foram significativas.





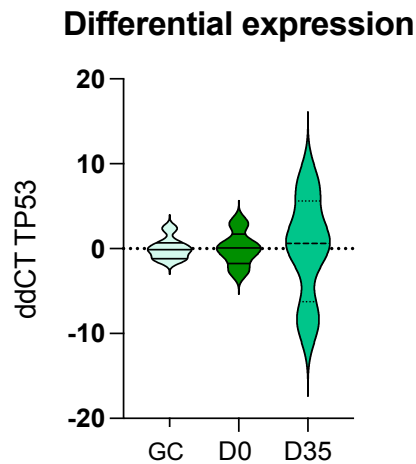
**Figura 13.** Avaliação da expressão do gene *BCL2* em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle.

Em seguida, realizamos a análise dos resultados finais da expressão gênica em valores log. Englobamos todas as amostras (sangue periférico e medula óssea) e seus respectivos tempos (D0 E D35). Utilizamos análise em base log afim de que, tornaria a distribuição dos dados simétrica. Na **Figura 14**, avaliamos a expressão do gene *BCL* no qual demonstrou que os níveis de expressão do gene eram inferiores em crianças saudáveis quando comparados aos níveis de pacientes com LLA, tanto em amostras de medula óssea quanto sangue periférico. Além disso, ao fazermos uma comparação entre os tipos de amostras percebemos que, os níveis de expressão em sangue periférico decaíram entre o dias 0 e 35 enquanto, na medula óssea a expressão aumentou no dia 35 ao compararmos com o dia do diagnóstico.



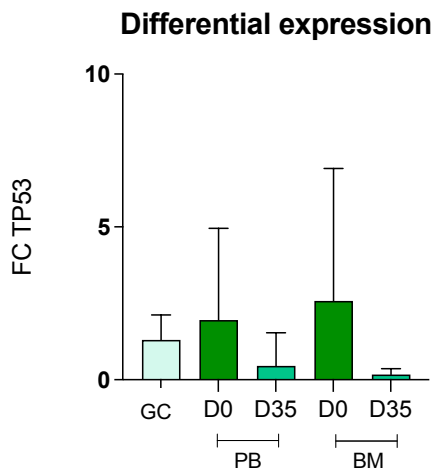
**Figura 14.** Avaliação da expressão diferencial de *BCL2* em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.

Na **Figura 15** podemos observar os níveis de expressão de *TP53* em amostras de sangue periférico. Demonstrou-se que, a expressão de *TP53* em indivíduos do grupo controle foram inferiores aos níveis expressos pelos pacientes de LLA ao D0 e D35. Além disto, ao dia 35 os pacientes apresentaram níveis mais elevados de *TP53* quando comparamos ao dia do diagnóstico.



**Figura 15.** Avaliação da expressão do gene *TP53* em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle.

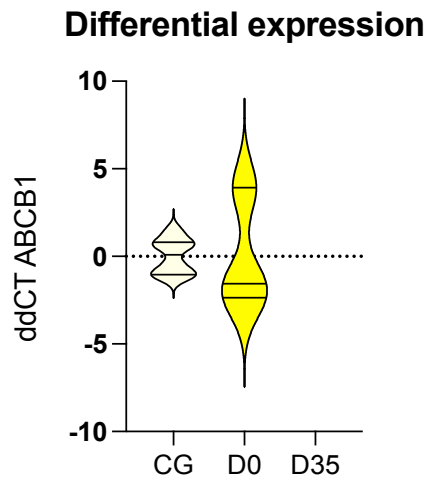
Ao compararmos os níveis de expressão de *TP53* através da análise por FC log (**Figura 16**), o grupo controle apresentou níveis de expressão mais baixos que o D0 (medula óssea e sangue periférico) dos pacientes com LLA. No entanto, ao D35 os níveis de expressão de *TP53* foram significadamente menores tanto nas amostras de sangue periférico quanto medula óssea de pacientes com LLA.



**Figura 16.** Avaliação da expressão diferencial de *TP53* em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.

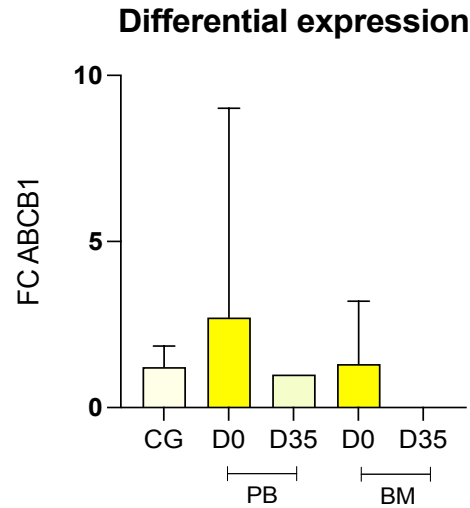
### 5.5. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Na análise da expressão gênica pelos valores de 2-ddCt para o gene *ABCB1* foi possível observar que o grupo controle expressou o gene em níveis menores quando comparados ao D0 de pacientes com LLA. No entanto, ao D35 durante o tratamento os pacientes com LLA não expressaram mais o gene *ABCB1* em amostras de sangue periférico (**Figura 17**).



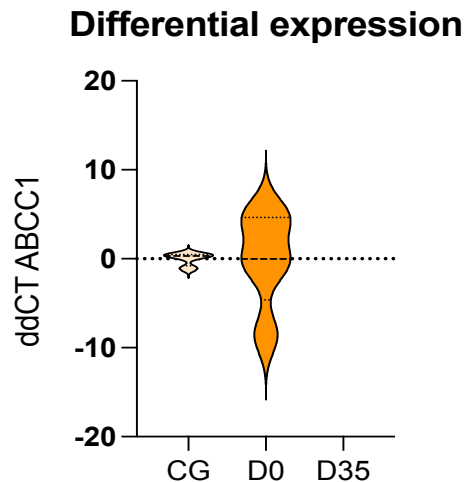
**Figura 17.** Avaliação da expressão do gene *ABCB1* em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle.

Ao fazermos a análise dos resultados finais da expressão por FC log (representados na **Figura 18**), foi possível confirmar que os níveis de *ABCB1* em crianças saudáveis foram inferiores quanto aos de pacientes de LLA. No entanto, ao compararmos a data de diagnóstico e o dia 35 do tratamento, os níveis de expressão de *ABCB1* no sangue periférico foram consideravelmente mais baixos e ao analisarmos as amostras medula óssea, esses pacientes não expressaram os genes no dia 35.



**Figura 18.** Avaliação da expressão diferencial de *ABCB1* em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.

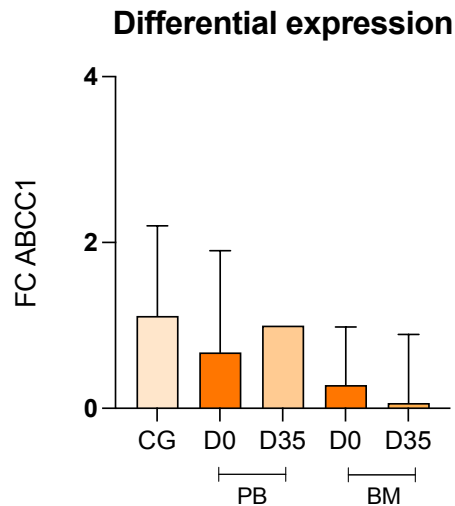
Os níveis de *ABCC1* em amostras de sangue periférico de crianças saudáveis foram inferiores aos de pacientes com LLA no diagnóstico, porém, esse pacientes não expressaram o gene *ABCC1* no sangue periférico ao dia 35, esses dados estão sendo demonstrados na **Figura 19**.



**Figura 19.** Avaliação da expressão do gene *ABCC1* em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle.

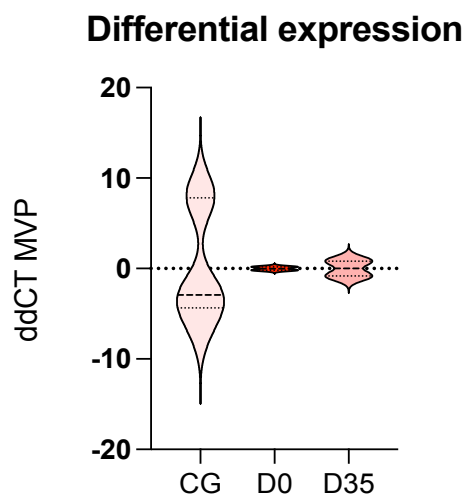
Ao fazermos a análise por FC log obtivemos um outro parâmetro dos dados (**Figura 20**). O qual demonstrou que o grupo controle obteve uma expressão maior do que o grupo caso e os níveis

de expressão em amostras de sangue periférico foram superiores aos da medula óssea. Os níveis de *ABCC1* no sangue periférico aumentou no D35 enquanto na medula óssea, esses níveis foram aproximadamente zero.



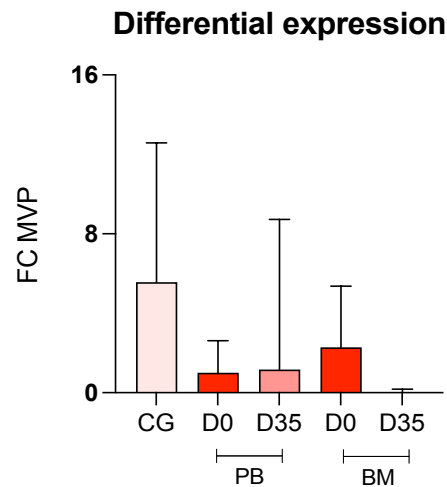
**Figura 20.** Avaliação da expressão diferencial de *ABCC1* em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.

Na avaliação da expressão diferencial de *MVP* em amostras de sangue periférico (**Figura 21**), o grupo controle apresentou níveis mais elevados do gene quando comparados ao grupo caso. Os níveis de *MVP* desmonstraram-se superiores ao dia 35 quanto ao dia 0.



**Figura 21.** Avaliação da expressão do gene *MVP* em amostras de sangue periférico no grupo caso e controle.

Através dos parâmetros apresentados pela análise por FC log na **Figura 22**, observamos que os níveis foram mais elevados em crianças saudáveis e que ao D35 os pacientes apresentaram níveis baixos em comparação ao D0 no sague periférico. No entanto, ao olharmos para as amostras de medula óssea desses pacientes percebemos que ao D35 não estava ocorrendo expressão do gene *MVP*.



**Figura 22.** Avaliação da expressão diferencial de *ABCC1* em amostras de sangue periférico e medula óssea, ao dia 0 e 35 de crianças saudáveis e pacientes com LLA.

## 6. DISCUSSÃO

A manutenção da homeostase em tecidos normais reflete um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular. Os membros da família *BCL2* e o gene *TP53* possuem um papel central na regulação da morte celular programada, controlando sinais intracelulares pró-apoptóticos e antiapoptóticos. No câncer, a evasão da apoptose através da desregulação de genes é um evento recorrente, portanto, a inibição seletiva de proteínas específicas antiapoptóticas representa uma oportunidade terapêutica promissora (87). A expressão aberrante de genes que controlam a apoptose, como os membros da família *BCL2*, representam uma característica recorrente das células leucêmicas que pode levar ao aumento da sobrevivência celular e resistência à quimioterapia (88).

Em um estudo realizado por Cahyadi et al. (2018), avaliando a expressão de *BCL2* em 17 crianças com LLA durante a fase de terapia de indução, foi observado que 6 crianças foram ao óbito e 11 conseguiram finalizar a terapia de indução. Em concordância aos resultados apresentados em nosso estudo, a maioria das crianças também eram do gênero masculino e apresentavam manifestações clínicas como adenomegalias. Nesse estudo foi observada diminuição da expressão de *BCL2* em medula óssea ao diagnóstico (22,6%) quando comparado com o final da quimioterapia (9,9%), no entanto, sem diferença significativa ( $p=0,075$ )(89). Em nosso estudo, houve essa diminuição apenas em amostras do sangue periférico, na medula óssea os níveis de *BCL2* aumentaram ao dia 35.

Em outro estudo, realizado com pacientes de LMA, o *BCL2* foi superexpresso em 56,6% (137/242) dos casos e foi associado ao pior prognóstico (90). Segundo Zhou et al. (2019) a expressão de *BCL2* foi aumentada em pacientes com LMA recém-diagnosticados em comparação com os controles saudáveis (91). Em nosso estudo também observamos que o grupo controle apresentou níveis mais baixos de *BCL2* do que os pacientes com LLA-B. Isso pode estar relacionado aos agentes inibidores de *BCL2*, que são agentes promissores durante o tratamento e acompanhamento de pacientes com LMA (92). Embora esses dados sejam interessantes, nota-se na LLA-B ainda há uma carência de estudos envolvendo a expressão de *BCL2*.

O gene da proteína supressora de tumor *TP53* é um supressor de tumor crucial, responsável pela maior defesa contra o crescimento tumoral, pois promove autofagia, sinalização de apoptose, transcrição, respostas imunes ou inflamatórias e está associado a vários tipos de câncer no entanto, pouco se sabe sobre sua expressão em pacientes com leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) (93,94). No presente estudo, os níveis de *TP53* foram mais altos em pacientes com LLA-B quando comparados a indivíduos saudáveis porém, esses níveis diminuem significativamente ao D35 durante a terapia de indução.

Weng et al. (2020) realizou um estudo com 146 crianças com LLA e 23 crianças doadoras com púrpura trombocitopênica idiopática (PTI) e demonstrou resultados semelhantes aos nossos, o nível de mRNA de *TP53* em pacientes com LLA foi maior em comparação com os doadores PTI ( $P = 0,019$ ) e o associou como um marcador de prognóstico ruim em pacientes com LLA (95). Na LMA a expressão de *TP53* é utilizada como uma ferramenta de leitura global sensível e específica

para mutações *TP53* (96). Estudos apontam que pacientes de LMA com mutações no gene *TP53* e que recebem quimioterapia convencional têm resultados desfavoráveis no tratamento (97).

A quimiorresistência é um fator importante na falha do tratamento em pacientes com leucemia linfoblástica aguda, este mecanismo envolve transportadores de efluxo de drogas dependentes de ATP como os da família dos transportadores ABC e MVP (98). Segundo Organista-Nava et al. (2019), os níveis de *ABCB1* foram mais baixos em indivíduos com Leucemia Aguda em comparação a indivíduos saudáveis e não foi observado diferenças significativas entre a expressão de *ABCC1* entre os grupos. No entanto, os pacientes que apresentavam altos níveis de *ABCC1* (OR= 5,50, IC 95% = 1,12-27,06) tiveram maior chance de recaírem durante o tratamento (99). Outro estudo, realizado com pacientes de LMA também associaram a alta expressão de transportadores ABC à resistência a quimioterapia (100).

Nossas descobertas no presente estudo demonstraram que os indivíduos saudáveis apresentaram menor expressão de *ABCB1* em comparação com pacientes com LLA-B, sendo que esses níveis diminuem ao dia 35 (tanto no sangue periférico quanto na medula óssea). Em relação aos níveis de *ABCC1*, o grupo controle apresentou maior expressão do que os pacientes com LLA-B e os níveis de *ABCC1* em sangue periféricos ao dia 35 aumentam enquanto na medula óssea os níveis diminuíram. Nosso estudo apresentou ainda resultados semelhantes ao estudo realizado por Gurbuxani et al. (2001) que avaliou a expressão de *ABCB1* e *ABCC1* em 167 pacientes com LLA em diferentes estágios (novos casos, remissão completa e recaídas). Seus resultados mostraram que o nível de expressão de *ABCC1* foi maior em pacientes com LLA que recaíram e aqueles indivíduos que expressaram altos níveis de *ABCC1* não atingiram a remissão completa (101).

O aumento da expressão de *MVP* foi relacionado à piora da sobrevida livre de eventos ( $p = 0,005$ ) em pacientes com LLA (39). Em nosso estudo, o grupo controle apresentou maior expressão de *MVP* em comparação ao pacientes com LLA. Além disso, os níveis de *MVP* no sangue periférico aumentou e na medula óssea diminuíram ao D35, durante a quimioterapia de indução. Em outro estudo, realizado com pacientes com LMA, foi apresentado resultados semelhantes aos nossos, com níveis de expressão do *MVP* sem diferenças significativas, sem nenhum dos parâmetros associados à sobrevida global ou livre de recidiva (102). No entanto, outro estudo demonstrou que a expressão de mRNA de *MVP* foi significativamente associada à resistência à quimioterapia de indução em pacientes com leucemia aguda (103).



A avaliação da expressão de genes de resistência e antiapoptóticos estão sendo associadas ao desenvolvimento de diversos tumores e a criação de inibidores desses genes como de BCL2 já estão sendo apontados como potenciais estratégias terapêuticas em leucemias agudas. Esses inibidores podem atuar em mecanismos de escape da quimiorresistência terapêutica (104,105). O desenvolvimento desse estudo nos proporcionou um novo olhar para estes genes, apesar dos seus mecanismos ainda não estarem totalmente elucidados na literatura. As funções e localizações específicas desses genes e seu uso como biomarcadores moleculares promissores na avaliação do prognóstico desses pacientes, pode contribuir para a criação de terapias alvos e agregar a quimioterapia atual, em busca da remissão medular nesses pacientes, resultando no aumento da taxa de sobrevida e cura de doenças malignas agressivas como a LLA.

O presente estudo apresentou algumas limitações, tais como o número de participantes do estudo ser relativamente menor, quando comparado a outros estudos prospectivos e a ausência de algumas informações em prontuários dos pacientes, tais como etnia, renda familiar e recaída. Embora o presente estudo forneça dados relevantes acerca da expressão de genes de resistência e antiapoptóticos na LLA, se faz necessário outros estudos que busquem contribuir com dados clínicos e laboratoriais sobre a influência desses genes na Leucemia Linfoblástica Aguda de células B

## 7. CONCLUSÃO

Ao término deste estudo, podemos concluir que os genes antiapoptóticos *BCL-2* e *TP53* foram mais expresso em indivíduos com LLA-B em comparação ao grupo controle. Além disso, observou-se que os genes *ABCB1*, *ABCC1* e *MVP* tiveram sua expressão reduzida na medula óssea ao término da terapia de indução. Evidenciou ainda que em amostras de sangue periférico, os níveis de expressão dos genes *ABCC1* e *MVP* foram mais elevados ao D35 em contraste com o D0. Visualizou-se também, que o grupo controle expressou valores mais elevados do gene *MVP* em comparação aos pacientes com LLA. No entanto, devido as limitações deste projeto, estudos prospectivos são necessários a fim de elucidar a influência destes genes em pacientes portadores de Leucemia Linfoblástica Aguda de células B.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Cavalcante MS, Santana Rosa IS, Torres F. Leucemia linfóide aguda e seus principais conceitos. *Rev Científica FAEMA*. 2017;8(2):151.
2. Ketelut-Carneiro N, Silva GK, Rocha FA, Milanezi CM, Cavalcanti-Neto FF, Zamboni DS, et al. IL-18 Triggered by the Nlrp3 Inflammasome Induces Host Innate Resistance in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *J Immunol* [Internet]. 2015 May 1 [cited 2020 Feb 10];194(9):4507–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25825440>
3. Silva-Junior AL, Alves FS, Kerr MWA, Xabregas LA, Gama FM, Rodrigues MGA, et al. Acute lymphoid and myeloid leukemia in a Brazilian Amazon population: Epidemiology and predictors of comorbidity and deaths. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221518.
4. Pereira Leite E, Tereza Cartaxo Muniz M, da Cunha Andrade Cirne de Azevedo A, Ribeiro Souto F, Cristina Lopes Maia Â, Marilda da Fonseca Gondim C, et al. Fatores prognósticos em crianças e adolescentes com Leucemia Linfóide Aguda Prognostic factors in children and adolescents with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Rev Bras Saúde Matern Infant*. 2007;7(4):413–21.
5. Kuster L, Grausenburger R, Fuka G, Kaindl U, Krapf G, Inthal A, et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood*. 2011 Mar 3;117(9):2658–67.
6. BARBOSA TDC. Identificação de alterações genéticas submicroscópicas em leucemias linfoblásticas pediátricas Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Identificação de alterações genéticas submicroscópicas em leucemias linfoblásticas pediátricas. 2014;153.
7. Neves Junior I. Avaliação da expressão do gene MDR1 (Glicoproteína-P) e atividade de efluxo em células do sangue periférico de pacientes sob tratamento da tuberculose multirresistente. 2013;1:56. Available from: [http://157.86.8.8/reports/doutorado\\_bibcb/ivan\\_junior\\_ipecc\\_dout\\_2013.pdf](http://157.86.8.8/reports/doutorado_bibcb/ivan_junior_ipecc_dout_2013.pdf)
8. Feyzi AAHP, Hagh MF, Ebadi T, Asanjan KS, Akbari AM, Talebi M, et al. The effect of resveratrol on the expression of MDR1 gene in leukemic lymphoblast's of acute lymphoblastic leukemia patients. *Casp J Intern Med*. 2015;6(2):113–5.
9. Chauhan PS, Bhushan B, Singh LC, Mishra AK, Saluja S, Mittal V, et al. Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: Response to induction chemotherapy. *Exp Mol Pathol*. 2012;92(1):44–9.
10. Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA. Lung resistance-related protein (LRP) predicts favorable therapeutic outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-36780-8>
11. Hof J, Krentz S, Van Schewick C, Körner G, Shalapur S, Rhein P, et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3185–93.

12. Tognon R, Nunes N de S, Castro FA de. Desregulação da apoptose em neoplasias mieloproliferativas crônicas. *Einstein* (São Paulo). 2013;11(4):540–4.
13. Hersh EM, Whitecar JP, Mccredie KB, Bodey GP, Freireich EJ. Chemotherapy, Immunocompetence, Immunosuppression and Prognosis in Acute Leukemia. *N Engl J Med*. 1971 Nov 25;285(22):1211–6.
14. Elman I, Silva MEMP e. Crianças Portadoras de Leucemia Linfóide Aguda : Análise dos Limiares de Detecção dos Gostos Básicos Acute Lymphocytic Leukemia in Children : Analysis of Detection Thresholds. *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):297–303.
15. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012 Jan 12;481(7380):157–63.
16. Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, Matsuda EI, Otubo R, Yunes JA, et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: Randomized trial from the Brazilian childhood cooperative group - Protocol ALL-99. *J Clin Oncol*. 2010;28(11):1911–8.
17. Lyengar V, Shimanovsky A. Leukemia [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2021 [cited 2021 Jul 17]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560490/>
18. Szczepański T, Van Der Velden VHJ, Waanders E, Kuiper RP, Van Vlierberghe P, Gruhn B, et al. Late recurrence of childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia frequently represents a second leukemia rather than a relapse: First evidence for genetic predisposition. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 20;29(12):1643–9.
19. Silva FF da, Latorre M do RD de O. Sobrevida das leucemias linfóides agudas em crianças no Município de São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2020 Mar 23 [cited 2021 Jul 16];36(3). Available from: <http://www.scielo.br/j/csp/a/kXGjvz6fFzrww5JXxqsvbw/?lang=pt>
20. Navarrete-Meneses M del P, Pérez-Vera P. Alteraciones epigenéticas en leucemia linfoblástica aguda. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2017 Jul 1;74(4):243–64.
21. Kinlen L. Childhood leukaemia and ordnance factories in west Cumbria during the Second World War. *Br J Cancer*. 2006;95(1):102–6.
22. Follini E, Marchesini M, Roti G. Strategies to overcome resistance mechanisms in t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci*. 2019;20(12):1–28.
23. Juárez-Avendaño G, Méndez-Ramírez N, Luna-Silva NC, Gómez-Almaguer D, Pelayo R, Balandrán JC. Molecular and cellular markers for measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2021 Jun 21;78(3).
24. Estimativa 2020 - Leucemias (taxas ajustadas) | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [cited 2020 Mar 30]. Available from: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/leucemias>

25. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol*. 2018 Jan;5(1):e14–24.
26. Severson C. Hematologic Malignancies in Adults. *Can Oncol Nurs J*. 2016;26(2):177.
27. Da Rocha Paiva Maia R, Filho VW. Infection and childhood leukemia: Review of evidence. *Rev Saude Publica*. 2013;47(6):1172–85.
28. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2018 Feb 17;75(3):417–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-017-2620-z>
29. Chessells JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: Results of MRC UKALL X. *Br J Haematol*. 1997;99(1):93–100.
30. Malouf C, Ottersbach K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(3):417–46.
31. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017 Mar 20;35(9):975–83. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.70.7836>
32. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia [Internet]. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2012 [cited 2021 Jun 28]. p. 3407–15. Available from: </pmc/articles/PMC3461902/>
33. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* [Internet]. 2014;6(1):e2014073. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25408859>
34. Attarbaschi A, Mann G, Panzer-Grümayer R, Röttgers S, Steiner M, König M, et al. Minimal residual disease values discriminate between low and high relapse risk in children with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia and an intrachromosomal amplification of chromosome 21: The Austrian and German Acute Lymphoblastic Leukemia Berl. *J Clin Oncol*. 2008;26(18):3046–50.
35. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Vol. 157, *Cell*. Cell Press; 2014. p. 1013–22.
36. Ritter JM, Frep D, Fmedsci F. Rang & Dale: Farmacologia.
37. TD S, YA F, EB A, CM F, EV DP, MT M, et al. Role of peripheral blood minimum residual disease at day 8 of induction therapy in high-risk pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Aug 16 [cited 2021 Jul 18];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27526794/>
38. Crump C, Sundquist J, Sieh W, Winkleby MA, Sundquist K. Perinatal and familial risk factors for acute lymphoblastic leukemia in a Swedish national cohort. *Cancer*. 2015;121(7):1040–7.

39. Terci Valera E, Scrideli CA, Gomes de Paula Queiroz R, Ortelli Mori BM, Gonzaga Tone L. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* [Internet]. 2004 Jul 1 [cited 2022 May 25];122(4):166–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15543372/>
40. Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci*. 1987 Jan;84(1):265–9.
41. Huh HJ, Park C, Jang S, Seo E, Chi H, Lee J, et al. Prognostic Significance of Multidrug Resistance Gene 1 (MDR1), Multidrug Resistance-related Protein (MRP) and Lung Resistance Protein (LRP) mRNA Expression in Acute Leukemia. 2006;1(8):253–8.
42. Rahgozar S, Moafi A, Abedi M, Entezar-E-Ghaem M, Moshtaghian J, Ghaedi K, et al. mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol Ther* [Internet]. 2014 Jan [cited 2022 Feb 20];15(1):35. Available from: </pmc/articles/PMC3938522/>
43. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of efflux pumps in multidrug-resistant cancer. 2019;18(7):452–64. Available from: [file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan PhD/Pgp/nihms-1034842.pdf](file:///C:/Users/ASUS/Desktop/Rujukan%20PhD/Pgp/nihms-1034842.pdf)
44. Cole SPC. Multidrug resistance protein 1 (mrp1, abcc1), a “multitasking” atp-binding cassette (abc,) transporter. *J Biol Chem*. 2014;289(45):30880–8.
45. Nakanishi T, Ross DD. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. *Chin J Cancer*. 2012;31(2):73–99.
46. Seo J, Lee C, Paeng JC, Kwon HW, Lee D, Kim S, et al. Biallelic mutations in ABCB1 display recurrent reversible encephalopathy. *Ann Clin Transl Neurol*. 2020 Aug 5;7(8):1443–9.
47. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1976 Nov;455(1):152–62.
48. Ueda K, Pastan I, Gottesman MM. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene. *J Biol Chem*. 1987 Dec 25;262(36):17432–6.
49. Leschziner GD, Andrew T, Pirmohamed M, Johnson MR. ABCB1 genotype and PGP expression, function and therapeutic drug response: A critical review and recommendations for future research. *Pharmacogenomics J*. 2007;7(3):154–79.
50. Abraham EH, Prat AG, Gerweck L, Seneveratne T, Arceci RJ, Kramer R, et al. The multidrug resistance (mdr1) gene product functions as an ATP channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(1):312–6.

51. Marchetti S, Mazzanti R, Beijnen JH, Schellens JHM. Concise Review: Clinical Relevance of Drug–Drug and Herb–Drug Interactions Mediated by the ABC Transporter ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Oncologist*. 2007;12(8):927–41.
52. El-Sharnouby JA, Abou El-Enein AM, El Ghannam DM, El-Shanshory MR, Hagag AA, Yahia S, et al. Expression of lung resistance protein and multidrug resistance-related protein (MRP1) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Oncol Pharm Pract* [Internet]. 2010 Sep [cited 2022 May 25];16(3):179–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19969624/>
53. Drach J, Zhao S, Drach D, Körbling M, Engel H, Andreeff M. Expression of MDR1 by Normal Bone Marrow Cells and its Implication for Leukemic Hematopoiesis. <https://doi.org/10.3109/10428199509054428> [Internet]. 2009 [cited 2022 May 25];16(5–6):419–24. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428199509054428>
54. Li M, Mei L, He C, Chen H, Cai X, Liu Y, et al. Extrusion pump ABCC1 was first linked with nonsyndromic hearing loss in humans by stepwise genetic analysis. *Genet Med* [Internet]. 2019 Dec;21(12):2744–54. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1098360021012284>
55. Riganti C, Giampietro R, Kopecka J, Costamagna C, Abatematteo FS, Contino M, et al. Mrp1-collateral sensitizers as a novel therapeutic approach in resistant cancer therapy: An in vitro and in vivo study in lung resistant tumor. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
56. Yi YJ, Jia XH, Zhu C, Wang JY, Chen JR, Wang H, et al. Solanine reverses multidrug resistance in human myelogenous leukemia K562/ADM cells by downregulating mrp1 expression. *Oncol Lett*. 2018;15(6):10070–6.
57. Mahjoubi F, Akbari S. Multidrug resistance-associated protein 1 predicts relapse in Iranian childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2012;13(5):2285–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22901208>
58. Mehrvar N, Abolghasemi H, Rezvany MR, Esmail Akbari M, Saberynejad J, Mehrvar A, et al. Pattern of ABCC Transporter Gene Expression in Pediatric Patients with Relapsed Acute Lymphoblastic Leukemia. *Reports Biochem Mol Biol* [Internet]. 2019 Jul;8(2):184–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31832444>
59. da Silveira Júnior LS, Soares V de L, Jardim da Silva AS, Gil EA, Pereira de Araújo M das G, Mercedes Gonçalves CA, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein-1 expression in acute myeloid leukemia: Biological and prognosis implications. *Int J Lab Hematol* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2022 May 25];42(5):594–603. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijlh.13241>
60. Gurbuxani S, Singh Arya L, Raina V, Sazawal S, Khattar A, Magrath I, et al. Significance of MDR1, MRP1, GSTpi and GSTmu mRNA expression in acute lymphoblastic leukemia in Indian patients. *Cancer Lett* [Internet]. 2001 Jun 10 [cited 2022 May 25];167(1):73–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11323101/>

61. Taheri M, Motalebzadeh J, Mahjoubi F. Expression of LRP gene in breast cancer patients correlated with MRP1 as two independent predictive biomarkers in breast cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2018;19(11):3111–5.
62. Bhatia P, Masih S, Varma N, Bansal D, Trehan A. High expression of lung resistance protein mRNA at diagnosis predicts poor early response to induction chemotherapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2015;16(15):6663–8.
63. Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollán M, Lucas R, Tejerina A, Martin M, et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2001;3(3):183–91.
64. Izquierdo MA, Scheffer GL, Flens MJ, Giaccone G, Broxterman HJ, Meijer CJ, et al. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* [Internet]. 1996 Mar;148(3):877–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774142>
65. Chetty C, Khumalo T, Da Costa Dias B, Reusch U, Knackmuss S, Little M, et al. Anti-LRP/LR specific antibody IgG1-iS18 impedes adhesion and invasion of liver cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(5):1–10.
66. Terci Valera E, Scrideli CA, Gomes de Paula Queiroz R, Orтели Mori BM, Gonzaga Tone L. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J*. 2004;122(4):166–71.
67. Siddiqui WA, Ahad A, Ahsan H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Arch Toxicol* [Internet]. 2015 Mar;89(3):289–317. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618543>
68. Zörnig M, Evan GI. Cell cycle: On target with Myc. Vol. 6, *Current Biology*. Cell Press; 1996. p. 1553–6.
69. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. Vol. 73, *Infection and Immunity*. 2005. p. 1907–16.
70. Wei Y, Cao Y, Sun R, Cheng L, Xiong X, Jin X, et al. Targeting Bcl-2 Proteins in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol*. 2020;10(November):1–11.
71. Quintás-Cardama A, Hu C, Qutub A, Qiu YH, Zhang X, Post SM, et al. P53 pathway dysfunction is highly prevalent in acute myeloid leukemia independent of TP53 mutational status. *Leukemia*. 2017;31(6):1296–305.
72. Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. A família do p53: aspectos estruturais e funcionais do p73 e do p63. *J Bras Patol e Med Lab*. 2003;39(2).
73. Barabutis N, Schally A V., Siejka A. P53, GHRH, inflammation and cancer. *EBioMedicine*. 2018;37:557–62.

74. Mattsson K, Honkaniemi E, Ramme K, Barbany G, Sander BM, Gustafsson BM. Strong expression of p53 protein in bone marrow samples after hematopoietic stem cell transplantation indicates risk of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients. *Pediatr Transplant* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2022 May 25];23(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30955249/>
75. Nagla dr madhu, Melissa A. Furlong, PhDa, Dana Boyd Barr, PhDb, Mary S. Wolff, PhDc, and Stephanie M. Engel P, Cross, Sarah J. Linker, Kay E. Leslie FM. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2016;176(1):100–106.
76. Ahn IE, Tian X, Wiestner A. Ibrutinib for Chronic Lymphocytic Leukemia with TP53 Alterations . *N Engl J Med*. 2020;383(5):498–500.
77. Ngan B-Y, Chen-Levy Z, Weiss LM, Warnke RA, Cleary ML. Expression in Non-Hodgkin's Lymphoma of the bcl -2 Protein Associated with the t(14;18) Chromosomal Translocation. *N Engl J Med* [Internet]. 1988 Jun 23;318(25):1638–44. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198806233182502>
78. Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* [Internet]. 1990 Nov;348(6299):334–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/348334a0>
79. Korsmeyer SJ. Bcl-2: an antidote to programmed cell death. *Cancer Surv* [Internet]. 1992;15:105–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1451107>
80. Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* [Internet]. 1997 Oct;34(4 Suppl 5):9–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408956>
81. Bilbao-Sieyro C, Rodríguez-Medina C, Florido Y, Stuckey R, Sáez MN, Sánchez-Sosa S, et al. BCL2 Expression at Post-Induction and Complete Remission Impact Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Diagnostics* [Internet]. 2020 Dec 4;10(12):1048. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4418/10/12/1048>
82. Warren CFA, Wong-Brown MW, Bowden NA. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell Death Dis* [Internet]. 2019;10(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1407-6>
83. Van Delft MF, Huang DCS. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis. *Cell Res*. 2006;16(2):203–13.
84. Shman T V., Fedasenka UU, Savitski VP, Aleinikova O V. CD34+ leukemic subpopulation predominantly displays lower spontaneous apoptosis and has higher expression levels of Bcl-2 and MDR1 genes than CD34- cells in childhood AML. *Ann Hematol* [Internet]. 2008 May [cited 2022 May 25];87(5):353–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18228020/>
85. Mofidi M, Rahgozar S, Pouyanrad S. Increased level of long non coding RNA H19 is correlated with the downregulation of miR-326 and BCL-2 genes in pediatric acute lymphoblastic leukemia, a possible hallmark for leukemogenesis. *Mol Biol Rep* [Internet].



- 2021 Feb 1 [cited 2022 May 25];48(2):1531–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33580459/>
86. Findley HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xl, and Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* [Internet]. 1997 Apr 15 [cited 2022 May 25];89(8):2986–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9108419/>
  87. Ashkenazi A, Fairbrother WJ, Levenson JD, Souers AJ. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2017 Apr;16(4):273–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28209992>
  88. Pravdic Z, Vukovic NS, Gasic V, Marjanovic I, Karan-Djurasevic T, Pavlovic S, et al. The influence of BCL2, BAX, and ABCB1 gene expression on prognosis of adult de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype patients. *Radiol Oncol* [Internet]. 2023 Jun 1;57(2):239–48. Available from: <https://www.sciendo.com/article/10.2478/raon-2023-0017>
  89. Cahyadi A, Ugrasena IDG, Andarsini MR, Larasati MCS, Aryati A, Arumsari DK. Relationship between Bax and Bcl-2 Protein Expression and Outcome of Induction Phase Chemotherapy in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev* [Internet]. 2022 May 1;23(5):1679–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35633553>
  90. Tiribelli M, Michelutti A, Cavallin M, Di Giusto S, Fanin R, Damiani D. Impact of Concomitant Aberrant CD200 and BCL2 Overexpression on Outcome of Acute Myeloid Leukemia: A Cohort Study from a Single Center. *Turkish J Haematol Off J Turkish Soc Haematol* [Internet]. 2021 Jun 1;38(2):119–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33596632>
  91. Zhou J-D, Zhang T-J, Xu Z-J, Gu Y, Ma J-C, Li X-X, et al. BCL2 overexpression: clinical implication and biological insights in acute myeloid leukemia. *Diagn Pathol* [Internet]. 2019 Jun 29;14(1):68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31253168>
  92. Bilbao-Sieyro C, Rodríguez-Medina C, Florido Y, Stuckey R, Sáez MN, Sánchez-Sosa S, et al. BCL2 Expression at Post-Induction and Complete Remission Impact Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Diagnostics (Basel, Switzerland)* [Internet]. 2020 Dec 4;10(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33291851>
  93. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2016 May 2;6(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27141080>
  94. Stengel A, Schnittger S, Weissmann S, Kuznia S, Kern W, Kohlmann A, et al. TP53 mutations occur in 15.7% of ALL and are associated with MYC-rearrangement, low hypodiploidy, and a poor prognosis. *Blood* [Internet]. 2014 Jul 10;124(2):251–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829203>
  95. Weng W, Zhang P, Ruan J, Zhang Y, Ba D, Tang Y. Prognostic significance of the tumor suppressor protein p53 gene in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*

- [Internet]. 2019 Nov 7; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.11064>
96. Tashakori M, Kadia T, Loghavi S, Daver N, Kanagal-Shamanna R, Pierce S, et al. TP53 copy number and protein expression inform mutation status across risk categories in acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2022 Jul 7;140(1):58–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35390143>
  97. Welch JS, Petti AA, Miller CA, Fronick CC, O’Laughlin M, Fulton RS, et al. TP53 and Decitabine in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 24;375(21):2023–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27959731>
  98. Robey RW, Pluchino KM, Hall MD, Fojo AT, Bates SE, Gottesman MM. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018 Jul 11;18(7):452–64. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41568-018-0005-8>
  99. Organista-Nava J, Gomez Y, del Moral-Hernandez O, Illades-Aguar B, Gomez-Santamaria J, Ramirez A, et al. Deregulation of folate pathway gene expression correlates with poor prognosis in acute leukemia. *Oncol Lett* [Internet]. 2019 Jul 22; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10650>
  100. Ho MM, Hogge DE, Ling V. MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* [Internet]. 2008 Apr;36(4):433–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301472X07006893>
  101. Gurbuxani S, Singh Arya L, Raina V, Sazawal S, Khattar A, Magrath I, et al. Significance of MDR1, MRP1, GST $\pi$  and GST $\mu$  mRNA expression in acute lymphoblastic leukemia in Indian patients. *Cancer Lett* [Internet]. 2001 Jun;167(1):73–83. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383500006844>
  102. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, et al. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia. A Southwest Oncology Group study. *Blood* [Internet]. 1999;94(3):1086–99. Available from: [http://dx.doi.org/10.1182/blood.V94.3.1086.415k32\\_1086\\_1099](http://dx.doi.org/10.1182/blood.V94.3.1086.415k32_1086_1099)
  103. Hee JH, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, et al. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci* [Internet]. 2006 [cited 2022 May 25];21(2):253–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16614510/>
  104. Ryan CE, Davids MS. BCL-2 Inhibitors, Present and Future. *Cancer J* [Internet]. 2019 Nov;25(6):401–9. Available from: <https://journals.lww.com/10.1097/PPO.0000000000000408>
  105. Bueno M, Artico L, Santos A, Bastos A, Yunes J, Saad S, et al. INIBIDORES DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA BCL-2 CONTRA NEOPLASIAS HEMATOLÓGICAS E SEUS EFEITOS NA COMBINAÇÃO COM CITARABINA, VENETOCLAX E

DOXORRUBICINA. Hematol Transfus Cell Ther [Internet]. 2022 Oct;44:S144–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2531137922003583>

## 9. APÊNDICE

### 9.1.APÊNDICE 01- EQUIPE DO PROJETO

Nome	Formação	Instituição	Atividade no Projeto de Pesquisa
Daniele de Sá Pereira	Biomedicina	HEMOAM/ UEA	Mestranda
Allyson Guimarães da Costa	Enfermeiro	HEMOAM/UEA	Orientador
Adriana Malheiro Alle Marrie	Bióloga	HEMOAM/UFAM	Coorientadora
Andréa Monteiro Tarragô	Farmacêutica- Bioquímica	HEMOAM/UFAM	Colaboradora
Fabiola Silva Alves Hanna	Biomédica	HEMOAM/ UFAM	Colaboradora
Gláucia Lima de Souza	Biomédica	HEMOAM	Colaboradora
João Paulo Diniz Pimentel	Farmacêutico- Bioquímico	HEMOAM	Colaborador
Maria do Perpétuo Socorro Sampaio Carvalho	Médica	HEMOAM	Colaboradora

### 9.2.APÊNDICE 02 – FINANCIAMENTO DO PROJETO

Material	Quantidade	Valor unitário	Valor final
Microtubos 0,1ml	1 pct (1000)	R\$ 900,09	R\$ 900,09
Luvras de procedimento	5	R\$ 20,00	R\$ 100,00
Ponteiras com filtro 200µl	30	R\$ 70,00	R\$ 2.100,00

Ponteiras com filtro 10µl	50	R\$ 60,00	R\$ 3.000,00
Kit paxgene blood rna	1	R\$ 4.487,00	R\$ 4.487,00
Kit quantitec reverse transcription	1	R\$ 1.934,62	R\$ 1.934,62
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	1	R\$ 2.809,00	R\$ 2.809,00
Placas oticas 96 poços cod barras enduraplate	1 pct (20)	R\$1.036,02	R\$ 1.036,02
Sondas Taqman Expression Assay	5	R\$ 1.273,60	R\$ 6.368,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 22.734,73</b>

**Financiamento:** Este projeto foi desenvolvido com recursos indiretos provenientes de Projeto de Pesquisa aprovado no Âmbito do Programa de Apoio à Consolidação das Instituições Estaduais de Ensino e/ou Pesquisa (PRÓ-ESTADO), Resolução N° 002/2008, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

### 9.3. APENDICE 03 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-HEMOAM

Este projeto faz parte de um projeto maior denominado Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com leucemia linfoblástica aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

FUNDAÇÃO DE  
HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Biomarcadores celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com Leucemia Linfoblástica Aguda: Novas abordagens aplicadas ao diagnóstico, prognóstico e terapêutica

**Pesquisador:** Allyson Guimarães da Costa

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51257921.2.0000.0009

**Instituição Proponente:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - HEMOAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

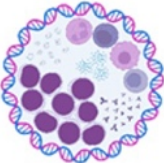
### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.982.395

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de um estudo observacional, do tipo longitudinal, retrospectivo e prospectivo para avaliação dos componentes celulares e moleculares envolvidos na resposta imunológica de pacientes com LLA, durante a terapia de indução da remissão e terapia de consolidação da remissão dos protocolos de tratamento. As amostras serão coletadas na Fundação HEMOAM, durante os procedimentos de rotina dos pacientes. As coletas ocorrerão em 4 momentos da quimioterapia de remissão, referidos como: diagnóstico (D0), dia 15 da terapia de indução da remissão (D15), final da terapia de indução da remissão (D35) e no dia 84 da terapia de consolidação da remissão (D84) dos protocolos de tratamento, sendo coletados 2 mL de MO e 3mL de SP em tubos com sistema a vácuo, contendo anticoagulante EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) pela Equipe Médica da Fundação HEMOAM. Serão incluídas no estudo 158 amostras de DNA e plasma de pacientes com LLA criopreservadas e 203 amostras de DNA e plasma de doadores de sangue. A identificação de biomarcadores imunológicos como instrumento preditivo de prognóstico e resposta terapêutica fornecerá meios para identificar os pacientes que apresentarão uma boa resposta à quimioterapia ou a ausência dela, indicando neste último caso, a necessidade de intervenções terapêuticas alternativas ou mais assertivas de maneira antecipada, diminuindo a duração da exposição a terapias ineficazes e potencialmente tóxicas, o que proporcionará melhores resultados e maior qualidade de vida aos pacientes.

## 9.4. APÊNDICE 04 - POP01 EXTRAÇÃO DE RNA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 BCM-LLA	AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA	
	EXTRAÇÃO DE RNA	Nº POP: 001
		Revisão: 001

**1. OBJETIVO**

Isolar o RNA a partir de células mononucleares de medula óssea.

**2. RESPONSABILIDADE**

2.1. Alunos de Mestrado e Doutorado (Biomédicos, Enfermeiros, Farmacêuticos-bioquímicos), e alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM-LLA.

**3. CONSIDERAÇÕES GERAIS:**

- 3.1. Antes de iniciar o procedimento, na antessala de paramentação do LABGEN 1, o executor deverá colocar os EPIs adequados como jaleco com gorro, máscara, estar usando sapato fechado adequado e ainda deverá envolver os sapatos em ~~propé~~.
- 3.2. A extração de RNA deverá ser feita na bancada de extração, na sala de ~~pré~~-PCR (LABGEN 1);
- 3.3. Equilibre o tampão de Lise com 1% de 2-mercaptoetanol.
- 3.4. Se houver formação de precipitado ao adicionar o tampão ATL ou AL, dissolver incubando à 56°C.

**4. PROCEDIMENTO:**

- 4.1. Coloque  $\leq 0,2$  mL de amostra de sangue total em um microtubo de 1,5 mL
- 4.2. Adicione 0,2 mL de tampão de lise preparado com 2-mercaptoetanol.
- 4.3. Agitar no vortex completamente para romper e lisar as células sanguíneas, então centrifugar o lisado a  $12.000 \times g$  por 2 minutos a temperatura ambiente.
- 4.4. Transfira o sobrenadante para um microtubo limpo de 1,5 mL.
- 4.5. Adicione 200  $\mu$ L de etanol 100% ao tubo da microcentrífuga.  
Dispersar qualquer precipitado por vórtex ou pipetagem e para baixo várias vezes (use ponteiros de pipeta livres de RNase).
- 4.6. Transfira a amostra (incluindo qualquer restante precipitado) para o Spin. Centrifugue a  $12.000 \times g$  por 15 segundos à temperatura ambiente. Descarte o fluxo.

4.7. Adicione 700  $\mu\text{L}$  de Wash Buffer I ao Spin. Centrifugue a  $12.000 \times g$  por 15 segundos à temperatura ambiente. Descarte o fluxo e o Tubo de coleta. Coloque o Spin em um novo tubo de coleta.

4.8. Adicione 500  $\mu\text{L}$  de Tampão de Lavagem II com etanol.

4.9. Centrifugue a  $12.000 \times g$  por 15 segundos à temperatura ambiente temperatura. Descarte o fluxo e reinsira o Girar o Cartucho no mesmo Tubo Coletor.

4.10. Repita as etapas 8–9 uma vez.

4.11. Centrifugue o Spin Cartridge a  $12.000 \times g$  por 1 minuto à temperatura ambiente para secar a membrana com RNA anexado. Descarte o tubo de coleta e insira o Spin Cartridge em um tubo de recuperação.

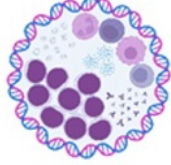
4.12. Adicione 30  $\mu\text{L}$ –3  $\times$  100  $\mu\text{L}$  de água livre de RNase ao centro do Spin Cartridge.

4.13. Incubar à temperatura ambiente durante 1 minuto.

4.14. Centrifugue o cartucho giratório e o tubo de recuperação para 2 minutos a  $\geq 12.000 \times g$  à temperatura ambiente.

Observação: Após centrifugar, quantificar a amostra utilizando o aparelho Nanodrop 2000/2000c.

## 9.5.APÊNDICE 05 - POP02 SÍNTESE DE cDNA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 <b>BCM-LLA</b>	<b>AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</b>	
	<b>SÍNTESE DE cDNA</b> <b>KIT GOSCRIPT REVERSE TRANSCRIPTION SYSTEM</b>	<b>Nº POP: 002</b>
		Revisão: 001 Data: 16/01/2023

1 - Preparar em um tubo estéril (sobre o gelo):

RNA total (>1µg)	µL
Primer (0,5 µg)	1µL
Água nuclease free q.s.p. 5 µL	µL

2 - Incubar a 70°C por 5 minutos e esfriar a 4°C (no gelo) por, no mínimo, 5 minutos;

4 - Centrifugar 10 segundos (spin) em uma microcentrífuga;

5 - Armazenar no gelo até que a mistura de transcrição reversa seja adicionada;

6 - Fazer um mix com os seguintes componentes (sobre o gelo):

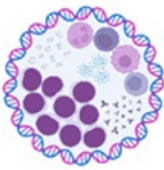
Tampão 5X	1X	4,0 µL
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3 mM	2,4 µL
dNTP (10 mM)	0,5 mM	1,0 µL
Inibidor de RNAses (20 U)	1U/µL	0,5 µL
Transcriptase Reversa		1,0 µL
Água nuclease free	q.s.p. 15 µL	6,1 µL

7 - Misturar gentilmente (batidinhas) e distribuir 15 µL do *mix* nos tubos contendo as amostras;

8 - Incubar a 25°C por 5 minutos (etapa de anelamento); 42°C por 60 minutos (etapa de extensão); 70°C por 15 minutos (inativação da enzima); Armazenar a -20°C.



## 9.6.APÊNDICE 06 – POP03 EXPRESSÃO GÊNICA

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 BCM-LLA	<b>AIS   BIOMARCADORES CELULARES E MOLECULARES NA LLA</b>	
	<b>Expressão Gênica por qPCR</b>	<b>Nº POP: 012</b>
		Revisão: 001 Data: 20/08/2021

**1. OBJETIVO**

Determinar a expressão de genes por PCR em tempo real.

**2. RESPONSABILIDADE**

2.1 Alunos de Mestrado e Doutorado (Biomédicos, Enfermeiros, Farmacêuticos-bioquímicos), e alunos de Iniciação Científica envolvidos nas pesquisas do Projeto BCM-LLA.

**3. CONSIDERAÇÕES GERAIS**

3.1. Antes de iniciar o procedimento, na antessala de paramentação do LABGEN 1, o executor deverá colocar os EPIs adequados como jaleco com gorro, máscara, estar usando **sapato fechado** adequado e ainda deverá envolver os sapatos em propé.

3.2. Limpar a área de trabalho com álcool a 70%.

3.3. Utilizar tubos de polipropileno (microtubos) de 1,5 mL que sofreram ação da U.V no fluxo laminar para o preparo do Mix.

3.4. Utilizar placa de 96 poços com lacre adesivo que sofreram ação da UV no fluxo laminar.

**4. 1º ETAPA – PREPARO DO MIX**

4.1. Retirar os reagentes necessários pela amplificação do frizer (-20°C) e colocar no gelo durante a manipulação.

4.2. No Fluxo Laminar previamente limpo – preparar a solução de reação em microtubo de 1.5mL estéril de acordo com as instruções. A solução deve ser preparada apenas para o numero de amostras a ser amplificados, pois não pode ser armazenada.

4.3. Pegar uma placa de 96 poços específica para genotipagem e colocar no suporte para placa ou sob um papel soalha para evitar que o fundo da placa arranhe;

4.4. Distribuir 4 µL/poço da solução de reação (2,5 µL Master Mix, 1,25 µL Água DNA/RNAse free, 0,25 µL sonda específica) com pipeta p-10 (ponteira branca 1-10µL) ou p-20 (ponteira amarela 2-200 µL) na placa de 96-poços adequada para o equipamento de amplificação a ser utilizado.

ATENÇÃO: utilização de uma placa não adequada ao equipamento de PCR vai resultar na quebra do equipamento!

#### 5. 2º ETAPA – ADIÇÃO DA AMOSTRA

5.1. Retirar as amostras de cDNA do freezer (-20C) e centrifugar rapidamente (spin: segurar o botão SHORT por 12’’).

5.2. Adicionar a amostra de cDNA – anteriormente centrifugado (Spin) - (segundo necessidade) a placa de reação.

ATENÇÃO: verificar sempre a presença do volume antes de transferir o cDNA. Descartar SEMPRE as ponteiros a cada nova amostra a ser transferida!

5.3. Cobrir a placa de reação com adesivo ótico para PCR em tempo real, sem tocar da parte adesiva.

ATENÇÃO: utilização de um adesivo não óptico não permite a leitura do equipamento de PCR em tempo real! Verificar que não estejam presentes bolhas de ar entre o adesivo e a placa pois as bolhas podem interferir com a leitura do equipamento de PCR em tempo real.

5.4. Centrifugar rapidamente (spin: segurar o botão SHORT por 12’’) a placa de reação na centrífuga com o rotor apropriado para rodar placas e utilizar outra placa com o mesmo peso para balancear a centrífuga.

ATENÇÃO: Ao retirar as luvas para utilizar a centrífuga lembre de não encostar no adesivo óptico da placa de reação! A placa deve ser manipulada apenas pelos lados.

5.5. Levar a placa de reação ao aparelho PCR em tempo real adequado.

ATENÇÃO: eventualmente a placa pode ser armazenada no escuro (papel alumínio) a 4°C para amplificação entre 2-4 horas ou a -20 para amplificação no dia seguinte.

5.6. Limpar a área de trabalho e as pipetas com etanol 70%.

5.7. Deixar as pipetas no valor máximo para evitar sua descalibração.

5.8. Ao final do preparo das amostras, ligar a UV para a esterilização dos fluxos.

Reagentes	Quantidade para:	
	1 amostra	1 placa de 96 poços*
Master Mix (20x)	2,5 µL	240 µL
H2O	1,25µL	120 µL
SONDA	0,25 µL	24 µL
TOTAL	4,0 µL	384 µL

## 10. ANEXOS

### 10.1. RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS 2021-2022

1. CRESPO NETO, J. A.; ALVES, F. S.; SOUZA, GLÁUCIA LIMA; **PEREIRA.D.S.**; COSTA, ALLYSON GUIMARÃES; LIMA, A. ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IL1B RS16944 COM PARÂMETROS LABORATORIAIS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022,, 2022, SP. hematol transfus cell ther, 2022.

CERTIFICADO

HEMO<sup>®</sup>  
2022

Certificamos que o trabalho "ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IL1B RS16944 COM PARÂMETROS LABORATORIAIS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA" de autoria de "Neto JAC, Hanna FSA, Nogueira GM, Fonseca JRF, Souza GL, Pereira DS, Lima AB, Tarragô AM, Marie AMA, Costa AG" foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022, realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2022 no Transamérica Expo Center/SP, na categoria Painel - Visita Guiada.

São Paulo, 29 de outubro de 2022.



**ABHH**<sup>®</sup>  
Associação Brasileira  
de Hematologia, Hemoterapia  
e Terapia Celular

*Rodrigo T. Calado*  
Rodrigo Calado  
Presidente do HEMO 2022

*José Francisco Comenalli Marques Júnior*  
José Francisco Comenalli Marques Júnior  
Presidente da ABHH

prevalente ao considerar as doações com sorologia reagente, nos casos de soroconversão o marcador Anti-HCV (hepatite C) aparece em primeiro lugar. Vale ressaltar que os procedimentos de retrovigilância devem verificar se existem hemocomponentes oriundos daquela doação sororeagente no estoque para proceder o descarte, repetir os testes laboratoriais na mesma amostra da doação para validar o resultado inicial, bem como identificar o destino de todos os hemocomponentes das doações anteriores, respeitados os prazos preconizados de acordo com a legislação vigente. Conclusão: Os procedimentos de retrovigilância permitem a rastreabilidade do sangue doado e são cruciais para a segurança transfusional, assim como o acompanhamento da soroconversão contribui para que os doadores sejam prontamente encaminhados para elucidação de diagnóstico e início imediato do tratamento (se for o caso). Demonstrou-se a importância da melhoria das estratégias de promoção da saúde, em especial para a prevenção de infecções como hepatites B e C e sífilis na região do estudo. Como desfecho secundário, o IHHS implementou a distribuição de preservativos e folders informativos sobre doenças transmissíveis pelo sangue e como preveni-las, para pacientes, doadores, acompanhantes, visitantes, fornecedores e colaboradores, pois se trata de uma questão de responsabilidade social e de saúde.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.111>

#### ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO IL1B RS16944 COM PARÂMETROS LABORATORIAIS EM PACIENTES DIAGNOSTICADOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

JAC Neto<sup>a</sup>, FSA Hanna<sup>b</sup>, GM Nogueira<sup>c</sup>, JRF Fonseca<sup>c</sup>, GL Souza<sup>d</sup>, DS Pereira<sup>d</sup>, AB Lima<sup>b</sup>, AM Tarragó<sup>c,d</sup>, AMA Marie<sup>b,c,d</sup>, AG Costa<sup>b,c,d,e</sup>

<sup>a</sup> Faculdade Estácio do Amazonas (UNESA), Manaus AM, Brasil

<sup>b</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>c</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

<sup>e</sup> Escola de Enfermagem de Manaus (EEM), Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

Fundação HEMOAM e 192 amostras de indivíduos controles. Os polimorfismos em estudo foram analisados através da amplificação da região de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida pela *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) e a coleta de dados a partir de prontuários médicos físicos. Foi realizada regressão linear simples e múltipla para investigar a associação entre o polimorfismo em estudo com os seguintes parâmetros laboratoriais: Blastos (<60% e >60%), leucócitos (<50.000 mm<sup>3</sup> e >50.000 mm<sup>3</sup>), plaquetas (<150 mm<sup>3</sup> e >150 mm<sup>3</sup>) e hemoglobina <10 g/dL e >10 g/dL. **Resultados:** É possível observar que o grupo caso é composto majoritariamente por 47% pacientes de idade entre ≥0 a <10 anos, 63% do sexo masculino e 37% do sexo feminino. Enquanto no grupo controle, cerca de 67% dos pacientes correspondem a indivíduos acima de 30 anos. O imunofenótipo prevalente foi LLA B comum representando 85% dos casos. Quanto ao grupo de risco dos pacientes, 23% dos casos foram classificados como pacientes de baixo risco e 77% possuem como estratificação o grau de alto risco. Nesse estudo os pacientes com genótipos C/T foram associados com menos chances de apresentar leucocitose >50.000 mm<sup>3</sup> ao diagnóstico (C/C vs. C/T [OR: 0,20, IC 95%: 0.05-0,73, p=0,009]), entretanto, não encontramos associação com os outros parâmetros avaliados. **Discussão:** A IL-1β é responsável por ampliar as respostas inflamatórias e possui um papel importante na proliferação de células B, regulando a expressão de moléculas de adesão e inflamatórias (Xu et al, 2013). Em nosso estudo, o polimorfismo IL1B rs16944 foi associado com menos chances de os pacientes apresentarem leucocitose >50.000 mm<sup>3</sup>, sendo estes, possivelmente realocados no grupo Baixo Risco, conforme o protocolo GBTL1-2009. Embora esse polimorfismo seja associado na literatura com o risco de desenvolvimento de LLA (Alves et al, 2021), este pode ser considerado um fator de bom prognóstico em relação à estratificação de risco, como demonstrado aqui. **Conclusão:** Pacientes portadores do genótipo C/T possuem menos chances de ter leucocitose >50.000 mm<sup>3</sup> que é considerado um fator determinante para realocação no grupo Alto Risco. Entretanto, em função do baixo número amostral, outros estudos prospectivos são necessários para melhor elucidar o papel desse polimorfismo com parâmetros laboratoriais.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.112>

#### SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICA - RELATO DE CASO

MB Carneiro, MC Silva, FC Domingos, JVP Cunha, IA Siqueira, NS Castro, IZ Gonçalves, GF Colli

2. ALVES, F. S. ; **PEREIRA.D.S.**; SOUZA, GLÁUCIA LIMA; GAMA, F. M.; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO ; COSTA, A. G. . ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NLRP3 C/T RS10754558 COM O AUMENTO DE BLASTOS NA MÉDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA. In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022,, 2022, SP. hematol transfus cell ther, 2022. v. 44. p. S155-S156.

CERTIFICADO

# HEMO<sup>®</sup>

## 2022

Certificamos que o trabalho “ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NLRP3 C/T RS10754558 COM O AUMENTO DE BLASTOS NA MÉDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA” de autoria de “Hanna FSA, Pereira DS, Souza GL, Lima AB, Magalhães-Gama F, Tarragô AM, Malheiro A, Costa AG” foi apresentado no Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular - HEMO 2022, realizado no período de 26 a 29 de outubro de 2022 no Transamérica Expo Center/SP, na categoria PAINEL.

São Paulo, 29 de outubro de 2022.



**ABHH**  
Associação Brasileira  
de Hematologia, Hemoterapia  
e Terapia Celular

*Rodrigo T. Calado*

Rodrigo Calado  
Presidente do HEMO 2022

*José Francisco Cömenalli Marques Júnior*

José Francisco Cömenalli Marques Júnior  
Presidente da ABHH



diversas dificuldades e desafios enfrentados desde a descoberta da doença até o impacto em suas atividades cotidianas. Os impactos foram mais acentuados, sobretudo, para pacientes do sistema público de saúde que demoraram mais para receber o diagnóstico e iniciar o tratamento. **Conclusão:** Os resultados indicam os desafios enfrentados pelos pacientes com LMA rastreados através da jornada do paciente. Entender a necessidade de realizar um mapeamento envolve ouvir o processo do cuidado e os dados levantados são fundamentais para colocar em prática essas transformações. A jornada é essencial, principalmente, para identificar gargalos que podem gerar ainda mais transtornos no futuro e para pontuar estratégias e soluções para que mudanças efetivas ocorram em favor da promoção de uma oncologia mais efetiva, que realmente priorize o paciente.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.260>

#### LEUCEMIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS SECUNDÁRIA: RELATO DE CASO E REVISÃO DA LITERATURA

KMM Ribeiro, MFCB Valente, AA Ferreira,  
STF Grunewald

*Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares  
(EBSERH), Hospital Universitário, Universidade  
Federal de Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, MG,  
Brasil*

**Introdução:** A leucemia de células plasmáticas (LCP) é uma forma rara, porém muito agressiva, de mieloma múltiplo (MM) caracterizada por altos níveis de células plasmáticas circulantes no sangue periférico. Pode ser primária ou secundária (LCPs), quando ocorre como progressão de um MM previamente diagnosticado. A LCPs ocorre em 1 a 4% de todos os pacientes com MM. **Caso clínico:** Paciente do sexo masculino, 70 anos, diagnosticado com MM em agosto de 2020, submetido a 6 ciclos do esquema quimioterápico CTD (ciclofosfamida, talidomida e dexametasona). Último ciclo em março de 2021, alcançando resposta parcial muito boa sendo encaminhado ao transplante de medula óssea (TMO) autólogo. Durante a internação para TMO intercorreu com paroxismos de fibrilação atrial, tendo sido iniciado betabloqueador e anticoagulação terapêutica. Sem outras intercorrências graves durante a internação. Em junho de 2021 teve uma queda da própria altura evoluindo com hematoma subdural crônico com necessidade de drenagem, e suspensão da anticoagulação. Manteve acompanhamento ambulatorial pós-TMO com recuperação completa do hemograma. Em junho de 2022 paciente é admitido na urgência com insuficiência cardíaca perfil C (frio e úmido) com necessidade de noradrenalina e dobutamina. Exames laboratoriais evidenciaram anemia e plaquetopenia graves (hemoglobina de 4,7 g/dL e plaquetas de 12.000) e leucócitos totais de 7.200. Em lâmina de sangue periférico presença de 66% de células ovais,

quando os pacientes preenchem os critérios diagnósticos para MM e têm 5% ou mais de células plasmáticas circulantes na avaliação do esfregaço de sangue periférico. Os achados laboratoriais incluem anemia, plaquetopenia, leucocitose e níveis elevados de LDH e beta-2-microglobulina. Os pacientes podem apresentar linfonodomegalias, novas lesões líticas, hepatoesplenomegalia, derrame pleural e alterações neurológicas por envolvimento do sistema nervoso central. Como a LCP é uma doença rara, as recomendações sobre seu tratamento são baseadas em relatos de caso e em estudos retrospectivos. É recomendado para pacientes menores de 65 anos e com bom performance status uma terapia de indução agressiva seguida de TMO autólogo. Para os que são inelegíveis ao TMO, a quimioterapia isolada é a principal opção terapêutica. Atualmente vem sendo estudado esquemas quimioterápicos baseados principalmente no uso do bortezomibe em associação à dexametasona e à talidomida ou lenalidomida (VTD ou VRD). Outras associações estudadas são com a vincristina, doxorubicina, prednisona e/ou melfalan. Devido ao esquema quimioterápico agressivo é importante sempre analisar idade, comorbidade e funcionalidade do paciente antes do início do tratamento. **Conclusão:** O prognóstico da LCP é ruim e relativamente pior quando comparado ao MM de alto risco. A sobrevida mediana foi de 6 a 11 meses em pacientes com LCP primária e de 2 a 7 meses para a LCP secundária. Devido ao prognóstico reservado da doença, à quimioterapia agressiva e às características clínicas do paciente do caso clínico relatado (idade > 65 anos, múltiplas comorbidades e instabilidade hemodinâmica), foi optado juntamente com a família por não realizar tratamento quimioterápico.

<https://doi.org/10.1016/j.htct.2022.09.261>

#### ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NLRP3 C/T RS10754558 COM O AUMENTO DE BLASTOS NA MÉDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

FSA Hanna <sup>a,b</sup>, DS Pereira <sup>b,c</sup>, GL Souza <sup>b,c</sup>,  
AB Lima <sup>a,b</sup>, F Magalhães-Gama <sup>b,d</sup>,  
AM Tarragó <sup>b,c</sup>, A Malheiro <sup>a,b,c</sup>, AG Costa <sup>a,b,c,e</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Imunologia  
Básica e Aplicada, Universidade Federal do  
Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>b</sup> Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação  
Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do  
Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil

<sup>c</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Aplicadas a Hematologia, Universidade do Estado  
do Amazonas (UEA), Manaus, Brasil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde, Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo  
Cruz (Fiocruz), Belo Horizonte, MG, Brasil

3. **PEREIRA.D.S.;** COSTA, ALLYSON GUIMARÃES; MALHEIRO, ADRIANA; TARRAGO, N. M.; ALVES, F. S.; MAGALHÃES-GAMA, FÁBIO. Associação do polimorfismo no gene NLRP3 3'UTR C>G com comorbidades infecciosas em pacientes com leucemia Linfoide Aguda. In: 6o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia, 2019, Manaus. Oncologia de resolutividade: fortalecendo a prevenção e acelerando o diagnóstico, o tratamento e o acesso aos cuidados paliativos., 2021.





## ASSOCIAÇÃO DO POLIMORFISMO NO GENE *NLRP3* 3'UTR G>C COM COMORBIDADES INFECCIOSAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

Daniele de Sá Pereira<sup>1\*</sup>, Fabíola Silva Alves Hanna<sup>2</sup>, Fábio Magalhães Gama<sup>3</sup>, Gláucia Lima de Souza<sup>4</sup>, Andréa Monteiro Tarragô<sup>5</sup>, Adriana Malheiro<sup>6</sup> e Allyson Guimarães da Costa<sup>7</sup>

<sup>1\*</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil, [danieledesapereira@gmail.com](mailto:danieledesapereira@gmail.com);

<sup>2</sup> Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, [fabiolasilva@hotmail.com](mailto:fabiolasilva@hotmail.com);

<sup>3</sup> Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil, [magalhaes.gama.f7@gmail.com](mailto:magalhaes.gama.f7@gmail.com);

<sup>4</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Manaus, AM, Brasil, [glau.lima.souza@gmail.com](mailto:glau.lima.souza@gmail.com);

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, [andrea\\_s\\_monteiro@hotmail.com](mailto:andrea_s_monteiro@hotmail.com);

<sup>6</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brasil, [malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br);

<sup>7</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Escola de Enfermagem de Manaus (UFAM.), Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HDV), Manaus, AM, Brasil, [allyson.gui.costa@gmail.com](mailto:allyson.gui.costa@gmail.com);

**Introdução:** O receptor citosólico *NLRP3* é um sensor importante do sistema imunológico responsável pela formação do complexo inflamassoma que leva à ativação da caspase-1 e secreção de citocinas. *Single-Nucleotide Variants* (SNV) no gene *NLRP3* estão associadas à superativação e participação na tumorigênese em diversos tipos de câncer, entretanto, seu papel na leucemia linfóide aguda (LLA) é pouco descrito. **Metodologia:** Foi realizado um estudo caso controle a fim de identificar o polimorfismo no gene do *NLRP3* 3'UTR C>G (rs10754558) através da reação em cadeia da polimerase em tempo real. A análise estatística com foi realizada com o *software* R vs. 4.0.3 – Pacote SNPassoc. **Resultados e Discussão:** Em nosso estudo, 45% dos pacientes (72/158) com LLA apresentaram algum tipo de comorbidade ao diagnóstico, sendo a mais frequente doenças infecciosas (86%) (ex. Citomegalovírus, toxoplasmose, rubéola, varicela, doenças parasitárias, dentre outros) associada ao genótipo G/G (OR: 7.44 [95% CI: 1.44 – 38.26, p= 0.016]). A etiologia da LLA é desconhecida, entretanto, acredita-se que a baixa estimulação do sistema imunológico frente a infecções possa culminar em reações



## 10.2. ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS 2021-2022

1. XABREGAS, LILYANE AMORM; HANNA, FABIÓLA SILVA ALVES; MAGALHÃES-GAMA, FÁBIO; SOUZA, GLÁUCIA LIMA; PEREIRA, DANIELE SÁ; DE LIMA, AMANDA BARROS; TORO, DIANA MOTA; SANTIAGO, MIRIAN RODRIGUES RIBEIRO; DA MOTTA PASSOS, LENY NASCIMENTO; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO; MALHEIRO, ADRIANA; COSTA, ALLYSON GUIMARÃES. Association of Toll-like receptors polymorphisms with the risk of acute lymphoblastic leukemia in the Brazilian Amazon. *Scientific Reports*, v. 12, p. 1-8, 2022.

www.nature.com/scientificreports

## scientific reports

Check for updates

OPEN

## Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon

Fabiola Silva Alves<sup>1,2</sup>, Lilyane Amorim Xabregas<sup>1,2</sup>, Marlon Wendell Athaydes Kerr<sup>1,2</sup>, Gláucia Lima Souza<sup>1,2</sup>, Daniele Sá Pereira<sup>2</sup>, Fábio Magalhães-Gama<sup>3</sup>, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago<sup>1,2</sup>, Nadja Pinto Garcia<sup>2</sup>, Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2,4</sup>, Maurício Morishi Ogusku<sup>4,5</sup>, Aya Sadahiro<sup>3</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,3,4,6</sup> & Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,4,6,7,8</sup>✉

The immune system plays an important role in the control of cancer development. To investigate the possible association of inflammasome genes to childhood leukemia we performed a case-control study with 158 patients with acute lymphoblastic leukemia and 192 healthy individuals. The *IL1B* and *IL18* genetic polymorphisms were genotyped by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) and *NLRP1*, *NLRP3* and *P2RX7* were genotyped using Real Time quantitative PCR (qPCR). The *IL1B* C/T rs19644 genotype was associated with the risk of developing ALL (C/C vs. C/T + T/T OR: 2.48 [95% CI: 1.26–4.88,  $p = 0.006$ ]; C/C vs C/T OR: 1.37–5.51,  $p = 0.003$ ) and the *NLRP1* A/T rs12150220 (OR: 0.37 [95% CI: 0.16–0.87,  $p = 0.023$ ]) was associated with protection against infectious comorbidities. It was not found association between *NLRP3* and *P2RX7* polymorphisms and acute lymphoblastic leukemia in our study. Our results suggest that the inflammasome single-variant polymorphisms (SNVs) may play a role in the development and prognostic of childhood leukemia. However, this finds requires further study within a larger population in order to prove it.

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a hematopoietic neoplasm characterized by the exacerbated proliferation of blasts in bone marrow and affects mainly children aged 2 to 15 years old. In Brazil, according to the National Cancer Institute (INCA), it is estimated that for each year of the 2020–2022 triennium, there will be 5920 new cases of leukemia (Acute and chronic) in men and 4860 in women in Brazil, which corresponds to an estimated risk of 5.67 new cases per 100 thousand men and 4.56 for each 100 thousand women<sup>1,2</sup>.

Due to its unknown etiology, studies associate the manifestation of ALL with the interaction of genetic and environmental factors, however, less than 10% of cases are attributed to heredity<sup>3,4</sup>. New evidence indicates that inflammation plays an important role in all stages of cancer development. Since inflammation promotes the accumulation of genetic alterations that can inhibit the cell death control pathways of hematopoietic progenitor stem cells (HSPCs) and contribute to the generation of pre-leukemic clones. Mel Greaves observed that a

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM 69050-001, Brazil. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>4</sup>Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>5</sup>Laboratório de Micobacteriologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, AM, Brazil. <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>7</sup>Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), Manaus, AM, Brazil. <sup>8</sup>Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. ✉email: allyson.gui.costa@gmail.com

2. ALVES, FABIÓLA SILVA ; XABREGAS, LILYANE AMORIM; KERR, MARLON WENDELL ATHAYDES; SOUZA, GLÁUCIA LIMA; PEREIRA, DANIELE SÁ; MAGALHÃES-GAMA, FÁBIO; SANTIAGO, MIRIAN RODRIGUES RIBEIRO; GARCIA, NADJA PINTO; TARRAGÔ, ANDRÉA MONTEIRO; OGUSKU, MAURÍCIO MORISHI; SADAHIRO, AYA; MALHEIRO, ADRIANA; COSTA, ALLYSON GUIMARÃES. Genetic polymorphisms of inflammasome genes associated with pediatric acute lymphoblastic leukemia and clinical prognosis in the Brazilian Amazon. *Scientific Reports*, v. 11, p. 9869, 2021.

www.nature.com/scientificreports

## scientific reports

Check for updates

OPEN

### Association of Toll-like receptors polymorphisms with the risk of acute lymphoblastic leukemia in the Brazilian Amazon

Lilyane Amorim Xabregas<sup>1,2</sup>, Fabíola Silva Alves Hanna<sup>1,2,3</sup>, Fábio Magalhães-Gama<sup>3,4</sup>, Gláucia Lima Souza<sup>1,2</sup>, Daniele Sá Pereira<sup>1,2</sup>, Amanda Barros de Lima<sup>2,3</sup>, Diana Mota Toro<sup>3</sup>, Mirian Rodrigues Ribeiro Santiago<sup>1,2</sup>, Leny Nascimento da Motta Passos<sup>1,2</sup>, Andréa Monteiro Tarragô<sup>1,2,5</sup>, Adriana Malheiro<sup>1,2,3,5</sup> & Allyson Guimarães Costa<sup>1,2,3,4,5,6,7</sup>✉

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common hematologic malignancy in children in childhood. Single-nucleotide polymorphism (SNPs) in key molecules of the immune system, such as Toll-like receptors (TLRs) and CD14 molecules, are associated with the development of several diseases. However, their role in ALL is unknown. A case-control study was performed with 152 ALL patients and 187 healthy individuals to investigate the role of SNPs in TLRs and the CD14 gene in ALL. In this study, *TLR6 C > T rs5743810* [OR: 3.20, 95% CI: 1.11–9.17,  $p = 0.003$ ] and *TLR9 C > T rs187084* [OR: 2.29, 95% CI: 1.23–4.26,  $p = 0.000$ ] seems to be a risk for development of ALL. In addition, the *TLR1 T > G rs5743618* and *TLR6 C > T rs5743810* polymorphisms with protection against death [OR: 0.17, 95% CI: 0.04–0.79,  $p = 0.008$ ; OR: 0.48, 95% CI: 0.24–0.94,  $p = 0.031$ , respectively]. Our results show that SNPs in TLRs genes may be involved in the pathogenesis of ALL and may influence clinical prognosis; however, further studies are necessary to elucidate the role of *TLR1*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR6*, *TLR9* and *CD14* polymorphisms in this disease.

Leukemia (acute and chronic) represents the 10th most frequent cause of cancer worldwide<sup>1</sup>. In Brazil, for the triennium 2020–2022, approximately 10,810 new cases in women and men are expected and approximately 300 new cases in North region of Brazil, where leukemia (acute and chronic) is the fifth most frequent cancer<sup>2,3</sup>. The most common type of leukemia in childhood is acute lymphoblastic leukemia (ALL) with a prevalence up to 25% of cancers in children who are under the age of 15 years<sup>4</sup>.

The neoplastic process results from genetic errors that contribute to blocking cell maturation and accumulation of leukemic clones (blasts) in the bone marrow microenvironment. Its etiology is still unknown; however, some risk factors are associated, including environmental, genetic and infectious factors<sup>5,6</sup>. Evidence from previous studies suggests that ALL is related to a deficit in immune system regulation in early childhood<sup>7–12</sup>. Furthermore, it is suggested that polymorphisms or genetic variations in the genes of molecules that are important in the development and progression of diseases may be important factors in the increase of intrinsic biological differences, influencing clinically distinct results and conferring genetic susceptibility to cancer<sup>13,14</sup>.

Toll-like receptors make up the main family of pattern recognition receptors (PRRs) of the innate immune system, and are involved in fighting pathogens and inflammation, and recognizing pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs), which thus modulates the immune response via the activation of cells that mediate the immune response. In addition, TLRs are vital molecules

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>2</sup>Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM), Av. Constantino Nery, 4397, Chapada, Manaus, AM 69050-001, Brazil. <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Instituto René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) Minas, Belo Horizonte, Brazil. <sup>5</sup>Rede Genômica de Vigilância em Saúde do Amazonas (REGESAM), Manaus, AM, Brazil. <sup>6</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Manaus, AM, Brazil. <sup>7</sup>Escola de Enfermagem de Manaus, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brazil. ✉email: allyson.gui.costa@gmail.com