



Universidade de Brasília - UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Departamento de Farmácia

ALESSANDRO SOUSA CAMPOS

**Análise *in silico* da expressão de membros da família PDLIM na Leucemia
Linfoblástica Aguda**

Brasília
Dezembro/2020

ALESSANDRO SOUSA CAMPOS

**Análise *in silico* da expressão de membros da família PDLIM na Leucemia
Linfoblástica Aguda**

“Trabalho de conclusão de curso,
apresentado à UnB como requisito parcial
para a conclusão do curso de graduação em
Farmácia”.

Orientador: Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Co-orientador: Daniel Freitas da Costa

**Brasília
Dezembro/2020**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DHFR – Dihidrofolato redutase

DNA – Ácido Desóxirribonucleico

EGIL – *European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias*

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*

HSTC – *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda

LLA-B – Leucemia Linfoblástica Aguda de Células B

LLA-T – Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T

LLC – Leucemia Linfóide Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

MDM2 – *Murina Double Minute 2*

MILE – *Microarray Innovations in Leukemia*

MO – Medula Óssea

mRNA – RNA mensageiro

NK – (células) natural killer

NF- κ B – Fator Nuclear kappa B

OMS/WHO – Organização Mundial de Saúde/*World Health Organization*

Ph – Cromossomo Filadélfia

RNA – Ácido Oxirribonucleico

SNC – Sistema Nervoso Central

STAT3 - *Signal Transducers and Activators of Transcription*

TGI – Trato Gastrointestinal

TMO – Transplante de Medula Óssea

Agradecimentos

A meus pais, Jesus e Jairo, por terem me fornecido toda a base e todo o apoio para que eu conseguisse não somente entrar na graduação, mas também para que eu pudesse concluí-la. Sem a força de vocês nada disso teria sido possível.

Aos meus irmãos, Anderson e Aline, por também terem me apoiado durante todos esses anos. Fizeram muito pelos nossos pais enquanto eu estava fora, para que eu pudesse me dedicar integralmente aos meus estudos.

Ao professor doutor Felipe Saldanha, por ter me apresentado o maravilhoso mundo da hematologia. Sou grato por todos os ensinamentos, dentro e fora da disciplina e pela confiança em ter aceitado trabalhar comigo ao longo desse ano. Agradeço demais também pela paciência em prontamente tirar todas as minhas dúvidas de maneira rápida e objetiva.

Aos meus amigos da graduação: Amanda, Andressa, Juan, Nathália, Ruth e Thamires. São quase seis anos de muitas risadas, reprovações, aprovações, choros, festas, desespero e conquistas. Uma verdadeira montanha russa. Não poderia ter conhecido pessoas melhores que tornassem todo esse processo muito mais leve e cheio de vida.

Ao meu namorado, Breno. Sou muito grato por todo o suporte emocional que tem me dado ao longo desses últimos três anos. A sua amizade, confiança, carinho e cuidado seguraram na minha mão todas as vezes em que eu achei que perderia o caminho.

À Carolina Gonçalves, amiga há quase dez anos. Apesar da distância, sei que você sempre esteve comigo e torceu para que eu chegasse onde eu cheguei hoje. Obrigado por tudo.

Às professoras doutoras Djane Braz, Adriana Lofrano, Angélica Amato e Dayde Lane, e ao professor doutor Rodrigo Fonseca, que são para mim um exemplo de profissionais, comprometidos com a educação e com a arte de ensinar o que há de melhor em si para os seus alunos. Vocês me inspiram.

Ao professor doutor Vicente e todo o pessoal do Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, que abriram as portas para o início da minha carreira científica já no meu primeiro semestre, onde pude começar a aprender muito sobre fazer ciência.

Às pessoas que se dispuseram a ser estudadas para a obtenção dos dados utilizados neste trabalho e todos os cientistas que os compilaram.

Resumo

A Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é uma neoplasia maligna que afeta a linhagem progenitora de linfócitos e carece de marcadores laboratoriais para melhor estratificação prognóstica. A família PDLIM é uma família de proteínas de andaime (*scaffold proteins*) com os domínios PDZ e LIM em sua estrutura e é composta por seis membros no genoma humano, sendo estes PDLIM1, PDLIM2, PDLIM3, PDLIM4, PDLIM5 e PDLIM7. Existem evidências da relação entre os membros dessa família e alguns tipos de cânceres sólidos e hematológicos da linhagem mieloide. Por isso, neste trabalho o objetivo foi comparar o padrão de expressão dos membros dessa família em células obtidas da medula óssea (MO) de indivíduos saudáveis e em amostras de indivíduos subdivididos em oito tipos de LLA. Além disso, discutir o possível papel da família PDLIM na fisiopatologia dessa doença. Interessantemente, os pacientes com LLA apresentam expressão reduzida dos genes PDLIM1, PDLIM4 e PDLIM5. Não encontramos diferença de expressão dos genes PDLIM2, PDLIM3 e PDLIM7 entre as amostras leucêmicas e controle. Importante destacar que para alguns tipos de câncer existem apontamentos para uma possível função de PDLIM como gene supressor tumoral. Acreditamos que essa função possa ocorrer também na LLA e destacamos que a LLA t(1:19) é o subtipo leucêmico que mais sofre influência da família PDLIM, tendo em vista que todos os genes analisados (exceção de PDLIM 7) estão com expressão reduzida nesses pacientes. Mais estudos são necessários para validar nossa análise e descrever funcionalmente o papel dessa família na LLA.

Palavras-chave: Leucemia; Leucemia Linfoblástica Aguda; PDLIM; PDZ; LIM; Hematologia; Oncologia.

Sumário

1. Introdução	8
1.1 Leucemia Linfoblástica aguda (LLA)	8
1.1.1 Conceito, Classificação e Fisiopatologia	8
1.2 Epidemiologia da LLA.....	9
1.3 Diagnóstico da LLA.....	12
1.4 Tratamento da LLA.....	18
1.5 Família PDLIM.....	22
2. Objetivos	28
3. Metodologia	29
3.1 Obtenção de dados.....	29
3.2 Análise de dados	30
4. Resultados	31
4.1 PDLIM1	30
4.2 PDLIM2.....	31
4.3 PDLIM3.....	33
4.4 PDLIM4.....	33
4.5 PDLIM5.....	34
4.6 PDLIM7.....	35
5. Discussão e Conclusão	37
6. Referências Bibliográficas	41

1. Introdução

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

1.1.1 Conceito, Classificação e Fisiopatologia

As leucemias são um grupo de doenças proliferativas que afetam células leucocitárias. Nessas patologias, alterações nos processos de divisão e morte celular podem ocorrer tanto na linhagem mieloide, quanto na linhagem linfoide. As células em multiplicação podem invadir, se instalar e se propagar em outros órgãos e tecidos, como a própria medula óssea (MO), ou sítios não hematogênicos, como rins, meninges, trato gastrointestinal e pele. Apesar das alterações laboratoriais demonstrarem leucocitose, essas células não são funcionais como as normais, tornando as pessoas acometidas mais suscetíveis a processos infecciosos (Arber et al., 2016).

A leucemia linfoblástica é uma neoplasia maligna que afeta a linhagem progenitora de linfócitos (Mansouri et al., 2020). O termo “aguda” é utilizado para diferenciá-la da Leucemia Linfoide Crônica (LLC). A diferença entre as duas se encontra na classificação, pois na Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) encontram-se predominantemente células imaturas (blastos), havendo contagens dessas células acima de 20% tanto na MO, quanto no sangue periférico (Zago et al., 2014). Ao contrário, na LLC existe maior proliferação de células maduras (Hoffbrand et al., 2013). A LLA é denominada de acordo com as células afetadas, podendo ser LLA-T ou LLA-B (Zago et al., 2014). Existem diversas alterações genéticas que podem afetar precursores linfoides diferentes, o que leva a manifestação de diferentes tipos de leucemias agudas.

Além da classificação pelos tipos LLA-B e LLA-T, há as subclassificações das LLA do tipo B, de acordo com as alterações genéticas que envolvem a

patogênese da doença. Tal subclassificação foi estabelecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, com a finalidade de orientar os profissionais da saúde em relação ao prognóstico da doença e também quanto ao melhor protocolo de tratamento para cada caso (Arber et al., 2016). Na tabela 1 está disposta a classificação da LLA de acordo com a OMS (2016).

Tabela 1 – Classificação das Leucemias Linfoblásticas Agudas segunda OMS (2016).

LLA-B
LLA-B com anormalidades genéticas recorrentes
LLA-B com t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
LLA-B com t(v;11q23.3);KMT2A rearranjado
LLA-B com t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
LLA-B Hiperdiploide
LLA-B Hipodiploide
LLA-B com t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
LLA-B com t(1;19)(q23;p13.3); TCF3-PBX1
Provisional Entity: LLA-B BCR-ABL1–like
Provisional Entity: LLA-B com iAMP21
LLA-T
Provisional Entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia
Provisional Entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leucemia/lymphoma

1.2 Epidemiologia da LLA

A LLA é uma doença que afeta majoritariamente pessoas abaixo dos 20 anos de idade. Nos Estados Unidos, são diagnosticados cerca de 6.000 casos anualmente, sendo aproximadamente metade em crianças e jovens. A LLA é considerada o câncer mais comum entre jovens e também a principal causa de morte relacionada ao câncer nas duas primeiras décadas de vida. Apesar de haver uma incidência maior entre brancos (Hunger & Mullighan, 2015; Linabery & Ross, 2008), os índices de recaída em afro-americanos se mostram maiores do que em outras etnias. Isso se dá pelo fato de que crianças afro-americanas apresentam várias características que indicam um prognóstico adverso, como imunofenótipo de células T desfavoráveis, translocações 1;19 com fusão E2A-PBX1 e altas contagens de leucócitos pela demora no diagnóstico (Burke & Thummel, 2019). Outro grupo que também se encontra com um maior risco epidemiológico para desenvolver LLA, é o grupo dos portadores da trissomia do cromossomo 21, a “Síndrome de Down”. Apesar da LLA não ser o tipo de neoplasia mais prevalente nessa parcela da população, a taxa ainda é significativamente maior do que na população saudável em geral (Zago et al., 2014).

No Brasil são esperados para os próximos três anos (2020-2022), cerca de 10.820 novos casos de leucemias diagnosticados, sendo destes, 5.920 em pessoas do sexo masculino e 4.890 em pessoas do sexo feminino. Estes valores indicam que há uma taxa de risco de 5,67 a cada 100 mil homens e 4,56 a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva & Ministério da Saúde, 2019). A incidência por sexo e região do Brasil pode ser visualizada na tabela 2.

Tabela 2 – Estimativa de novos casos de leucemia no Brasil entre 2020 e 2022 por região. Os valores representam o número de casos para cada 100 mil indivíduos.

Região	Homens	Mulheres
Norte	4,45	3,55
Nordeste	5,02	4,06
Centro-oeste	4,29	3,85
Sudeste	5,70	4,15
Sul	8,34	7,76

Fonte: INCA, 2019.

De acordo com um estudo do INCA e do Ministério da Saúde em 2019, as leucemias correspondem aos 5 tipos mais frequentes de câncer em algumas regiões do país. Ainda que sejam escassas as compilações de dados específicos sobre a distribuição da LLA no Brasil, com base nesse levantamento, é possível inferir que o país não possui um perfil epidemiológico muito distinto de outros países.

Mesmo que possa ser considerada uma doença relativamente comum, as taxas de cura da LLA vêm aumentando ao longo dos últimos anos. Um estudo europeu mostrou que em sessenta anos a taxa de sobrevivência de pacientes com LLA cresceu de 1,2% para 90,7%, enquanto a taxa de reincidência diminuiu de 98,8% para 9,9% (DEMIDOWICZ et al., 2019).

1.3 Diagnóstico da LLA

As manifestações clínicas primárias costumam ser compatíveis com a fisiopatologia da doença. Devido à alta proliferação celular, há diminuição do espaço medular para produção de outros tipos celulares. Como consequência, é muito comum que os pacientes com LLA apresentem no hemograma, anemia e trombocitopenia de graus variados, a depender do estadiamento da doença. Também é comum que ocorram sucessivas infecções em um pequeno espaço de tempo, ocasionadas pelo mau funcionamento do sistema imunitário, mesmo com o número de células acima do estabelecido como normal (Hoffbrand et al., 2013).

No exame físico, é possível determinar hepato, linfonodo e esplenomegalias oriundas do acúmulo de células neoplásicas nesses locais. Em crianças, os pais geralmente relatam prostração e letargia, que têm relação íntima com o desenvolvimento da anemia. Além disso, também é comum o aparecimento de equimoses, sangramentos gengivais e petéquias, que sugerem a trombocitopenia. A febre persistente é outro achado clínico importante, entretanto, ela pode ser causada pelas infecções pré-existentes ou pela produção excessiva de citocinas e interleucinas tanto das células saudáveis, quanto das células cancerosas. Cerca de 5% dos pacientes podem apresentar infiltrações celulares no sistema nervoso central, mas poucos apresentam sinais clínicos de aumento da pressão intracraniana. Em meninos, cerca de 1% também pode apresentar envolvimento testicular uni ou bilateral. É importante ressaltar que esses sinais e sintomas indicam apenas a presença da leucemia, não havendo um diagnóstico clínico diferencial entre a LMA e a

LLA, por isso, faz-se necessário o uso de técnicas laboratoriais para confirmar a hipótese. (Zago et al., 2014)

Nos achados laboratoriais, é comum o aparecimento de anemias normocíticas normocrômicas, já que este quadro é causado pela falta de espaço na MO para produção de eritrócitos e não necessariamente por um defeito estrutural das células. Quanto às células brancas, estas podem se mostrar em contagem baixa, normal ou alta, chegando a níveis de 200.000 células/ μ L em quadros mais graves. Em análise microscópica, a distensão sanguínea também costuma apresentar blastos em quantidade variável (Hoffbrand et al., 2013; McPherson & Pincus, 2011).

Na bioquímica do sangue periférico também é possível encontrar níveis elevados da enzima desidrogenase láctica e do ácido úrico. Ambos indicadores metabólicos, fornecem a informação de que há intenso processo de destruição e regeneração celular ocorrendo naquele organismo. Pode haver também aumento da proteína C reativa, indicando um processo inflamatório crônico não específico. Apesar disso, outros marcadores metabólicos raramente se mostram significativamente alterados. Em alguns raros casos de LLA-T, é possível detectar sinais de coagulopatias ocasionadas pela presença de material procoagulante na célula neoplásica que pode se intensificar com o desenvolvimento de linfocitoses mais agudas (Zago et al., 2014).

A punção medular também é fundamental na elucidação do diagnóstico do paciente com suspeita de LLA. Geralmente, ela apresenta hipercelularidade ou hiperplasia de blastos, com contagens acima de 20%, não respeitando a proporção considerada normal de células (figura 1). Ainda que o hemograma, a distensão sanguínea e o mielograma sejam ferramentas muito úteis no

rastreio e na triagem da doença, mesmo juntos, não fecham o diagnóstico da LLA. Para definir a LLA e seus subtipos, hoje existem testes imunofenotípicos, citotóxicos e genéticos que garantem um diagnóstico mais preciso e, por consequência, uma conduta médica mais adequada para cada paciente (McPherson & Pincus, 2011; Silva et al., 2016).

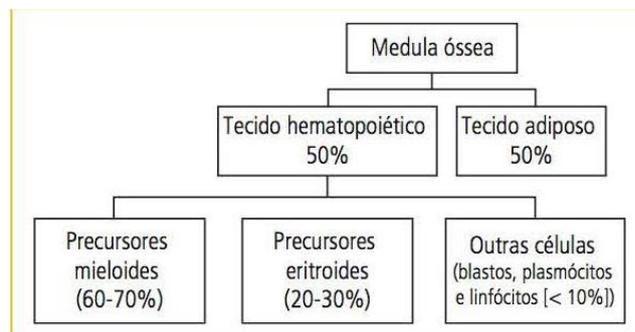


Figura 1 - Proporção de células em uma medula óssea saudável (Silva et al., 2016).

A imunofenotipagem é uma técnica que vem ganhando cada vez mais importância dentro de laboratórios de análises clínicas, principalmente nos setores de hematologia. Essa técnica auxilia a detectar tipos específicos de células com boa precisão e exatidão. Anticorpos monoclonais são conjugados a agentes fluorescentes e são ligados a antígenos específicos na superfície celular. Essa reação consegue ser analisada pelo citômetro de fluxo, que pelo tamanho das células e a conjugação com os anticorpos, consegue diferenciá-las umas das outras. Esse ensaio se popularizou após a disseminação do vírus HIV, já que é necessário realizar contagens precisas de linfócitos T CD4+ e CD8+. Hoje, o exame consegue diferenciar células de linhagem mielocítica da linhagem linfocítica, além de subtipos das células de cada linhagem. Ter essa definição é importante não somente para o diagnóstico, mas cada expressão de células leucêmicas costuma ter relação com a síndrome clínica apresentada

pelo paciente e também interfere diretamente no prognóstico e no tratamento do paciente (Silva et al., 2016). A técnica é padronizada pelo *British Committee for Standards in Haematology* e o *European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias* (EGIL). As entidades preconizam o uso de testes preliminares para diferenciação dos grandes grupos celulares e, posteriormente, testes mais específicos e complementares para o fechamento do diagnóstico (tabela 3).

Tabela 3 – Imunofenotipagem preliminar e complementar proposta pelo EGIL e *British Committee for Standards in Haematology*

	Preliminar	Complementar
Linfoide B	CD10, CD19, CD20	CD5, CD10, CD11c, CD22, CD23, CD25, CD38, Ccd79a, CD103, FMC7, cyBcl-2, IgMc, KAPPA e LAMBDA
Linfoide T	CD2, CD3, CD7	CD1a, cCD3, CD4, CD5, CD8, CD45, CD45RA, CD45RO, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$
NK	CD3, CD16, CD56	CD11b, CD38, CD57, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$
Ativadas	Não há	CD25, CD38, HLA-DR
Mieloide	CD13, CD33, cMPO	CD11b, CD14, CD15, CD36, CD38, CD41, CD56, CD61, CD64, GPA
Células precursoras	CD34	CD117, nTdT, CD133

Adaptado de (Silva et al., 2016).

A análise citogenética e a genética molecular são exames fundamentais não somente para concluir o diagnóstico, mas também porque são bons

indicadores do prognóstico do paciente. Os exames consistem em verificar a quantidade de cromossomos nas células tumorais (ploidia) e (ou) alterações estruturais em nos cromossomos das células neoplásicas. Existem diferentes alterações quantitativas e qualitativas, e sua recorrência é diferente em lactentes, crianças e adultos. Isso também tem íntima relação com o prognóstico mais frequente em cada uma dessas faixas etárias (Hoffbrand et al., 2013). O exame de cariótipo é um dos mais comuns para essa finalidade. A técnica consiste, de maneira resumida, em impedir com que as células prossigam além da metáfase durante a realização da mitose (figura 2). Dessa forma, o fuso mitótico é impedido de concluir o processo de separação das cromátides irmãs. Como estão no estágio de condensação máxima, torna-se mais fácil visualizar os cromossomos e detectar alterações constitucionais e numéricas nos mesmos. Apesar de ser considerado um exame demorado para fechamento do diagnóstico de doenças agudas, como a LLA, o exame ainda possui valor significativo na determinação do prognóstico e do tratamento a ser adotado (Silva et al., 2016). No resultado, células que apresentam hiperploidia (> 50 cromossomos) costumam ter bom prognóstico, enquanto células que apresentam hipoploidia (< 44 cromossomos) geralmente significam prognósticos ruins (Hoffbrand et al., 2013).

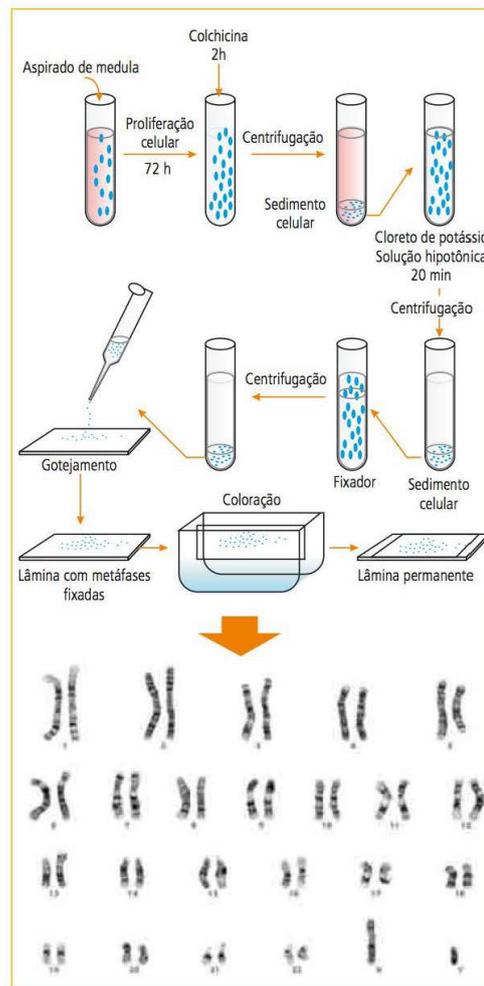


Figura 2 – Esquema da técnica utilizada exame de cariótipo. Adaptado de (Silva et al., 2016).

Uma outra técnica molecular que tem se tornado essencial no diagnóstico das leucemias é o *FISH* (*Fluorescence in situ hybridization*). O exame consiste no uso de sondas, que são sequências conhecidas de nucleotídeos. Essas sequências são complementares aos cromossomos em investigação. A revelação é realizada através do emprego de fluorocromos que se ligam a essas sondas e, posteriormente, observada por microscopia de fluorescência (Silva et al., 2016). O teste consegue ser mais sensível a alterações genéticas, como a fusão dos genes BCR-ABL1 ou outras anormalidades genéticas que poderiam apresentar resultados falsos-negativos na citogenética convencional (Hoffbrand et al., 2013).

Novas técnicas para definição do diagnóstico e do prognóstico das leucemias vêm sendo desenvolvidas para tentar tornar o diagnóstico mais acessível, mais rápido, mais específico e mais sensível (DEMIDOWICZ et al., 2019). Técnicas como o uso de micro RNAs (miRNA) vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de aperfeiçoar o diagnóstico das leucemias. Atualmente, existem pesquisas voltadas para o uso de miRNAs no diagnóstico diferencial entre LLA-T e LLA-B, visto que os métodos usados atualmente não permitem uma separação adequada na linhagem linfocitária em investigação. Contudo, apesar de se mostrarem promissoras, ainda não são adotadas pelas sociedades científicas (Sabarimurugan et al., 2019).

Dessa forma, se mostram necessárias as pesquisas voltadas para a descoberta de novos marcadores estruturais, bioquímicos, genéticos ou fisiológicos que possam servir ao diagnóstico ou prognóstico da LLA e seus subtipos.

1.4 Tratamento da LLA

A oncologia clínica deu passos muito importantes nos últimos cinquenta anos. Doenças antes consideradas inevitavelmente fatais, como câncer testicular, linfomas e leucemias, agora possuem tratamento farmacológico e um índice de cura considerado alto. Embora o tratamento farmacológico da maioria dos cânceres seja eficiente, ele pode ser longo (de dois a cinco anos), dispendioso financeiramente e possuem janela terapêutica muito estreita. Sintomas como náuseas, dores, distúrbios do sono e transtornos psiquiátricos como a depressão são muito comuns durante a realização da maior parte do tratamento em muitos pacientes. Atualmente, as terapias anticancerígenas consistem atacar, de forma específica, estruturas presentes nas células

tumorais e vias bioquímicas exclusivas dessas mesmas células. Ainda existem poucos fármacos disponíveis que também não afetem células saudáveis, mas as pesquisas que estão sendo feitas se guiam para uma terapêutica cada vez mais segura e livre de efeitos adversos em seus usuários. Dessa forma, faz-se necessário o conhecimento profundo da farmacodinâmica e farmacocinética clínica dos agentes quimioterápicos para um uso racional e seguro em seres humanos (Brunton et al., 2012; Rodgers et al., 2019).

O tratamento da LLA, abrange os períodos de indução, consolidação e manutenção com o uso de diferentes mecanismos de ação. O tempo total da terapêutica quimioterápica costuma durar entre dois anos e meio a três anos antes da remissão do câncer (Zago et al., 2014). Até 1948, crianças diagnosticadas com LLA possuíam, em média, três meses de vida após a realização do diagnóstico. Hoje, com o advento do metotrexato, os índices de cura são bem mais altos (Katzung et al., 2014). O metotrexato é um fármaco classificado como antimetabólito, em que a ação consiste na inibição da enzima diidrofolato redutase (DHFR). O resultado da sua inibição é o impedimento da síntese de purinas e do timidilato. Essa inibição afeta diretamente o processo de replicação do DNA das células. Como as células leucêmicas estão em constante processo de divisão, são as mais afetadas pela inibição dessa enzima. Todavia, como citado anteriormente, os efeitos adversos sobre outros tecidos em constante divisão, como o epitélio das mucosas do TGI, são pronunciados (Brunton et al., 2012). Além disso, esse fármaco também tem papel essencial no impedimento da ocorrência da recidiva do câncer quando usado em terapia intratecal, visto que a metástase no SNC é um importante meio da ocorrência da recidiva desse tipo de malignidade. Com seu uso, é

quase zero o índice de recidiva nas pessoas tratadas. Existem também outros fármacos utilizados, como corticosteroides, vincristina, ciclofosfamida e a L-asparaginase. A prednisona e a vincristina se apresentam muito eficientes no processo de remissão do câncer, com índice de sucesso próximo aos 90% (Katzung et al., 2014).

Algumas mutações que ocasionam a LLA já possuem prognóstico e tratamento bem definido. Uma das mutações mais comuns, a t(9;22), gera o chamado cromossomo Filadélfia (Ph+). Essa alteração genética é também comum em outros tipos de leucemia, principalmente na LMC. Por isso, o ministério da saúde liberou duas portarias, uma de 2012 e outra em 2013 que definem as diretrizes terapêuticas a serem preferencialmente adotadas. Apesar de haverem particularidades entre os tratamentos entre adultos, crianças e adolescente, o medicamento denominado Mesilato de Imatinibe é tido como padrão-ouro para o tratamento da doença com Ph+(Ministério de Saúde, 2012; Ministério da Saúde, 2013.) O Mesilato de Imatinibe é um inibidor da tirosina quinase BCR-ABL, proteína resultado da translocação presente no cromossomo Filadélfia. Essa proteína é característica fenotípica das células malignas, pois é uma fusão entre o proto-oncogene cinase de Abelson (ABL) e a BCR (região de pontos de grupo de quebra), sendo uma proteínocinase constitutivamente ativa. Existem fármacos análogos ao Imatinibe, sendo estes o Desatinibe e Nilotinibe (Brunton et al., 2012).

Assim como nas doenças infecciosas, os seres humanos enfrentam a resistência das células neoplásicas ao tratamento quimioterápico (Hunger & Mullighan, 2015). Existem diversos mecanismos envolvidos no processo. No caso do Imatinibe e moléculas análogas, há a ocorrência de mutações

aleatórias e contínuas que impedem a ligação do fármaco ao seu sítio. Modificações que gerem alterações específicas nos resíduos de aminoácidos onde o medicamento tem a sua ação, podem impedir sua ligação e, conseqüentemente, a ineficácia desse tratamento farmacológico. No caso deste medicamento, alterações nos aminoácidos 255 e 315 são críticas para o seu efeito. No que diz respeito ao nilotinibe e desatinibe, a mutação 255 não interrompe sua atividade, mas a 315, sim (Brunton et al., 2012). Há também outro mecanismo importante para a resistência ao tratamento: as bombas de efluxo. Algumas células cancerígenas conseguem expressar transportadores em sua membrana, que aumentam a saída do fármaco no sentido intra-extracelular. Dessa forma, o medicamento não consegue chegar em concentração suficiente em seu alvo farmacológico para garantir o sucesso do tratamento (Katzung et al., 2014).

O transplante de medula óssea (TMO) não é uma das medidas mais utilizadas no tratamento desse tipo de neoplasia. Em crianças e adolescentes, a resposta ao tratamento quimioterápico costuma ser suficiente e apresentar índices suficientes de remissão. No caso de adultos, geralmente a doença se apresenta mais grave, com prognóstico ruim e evolução rápida. Por isso, usualmente, o TMO não é uma alternativa empregada de maneira ampla. Até mesmo pacientes classificados como “alto risco” dificilmente são encaminhados ao transplante (DEMIDOWICZ et al., 2019; Hoffbrand et al., 2013; Rodgers et al., 2019; Zago et al., 2014).

Outra possibilidade de tratamento que tem ganhado cada vez mais destaque nas pesquisas e nos hospitais é o transplante de células tronco hematopoiéticas (HSTC, do inglês *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*).

Essa alternativa tem se mostrado muito eficiente principalmente nos casos de leucemias e linfomas que apresentam genótipos mais raros e, por consequência, não possuem linhas de tratamento quimioterápico e diretrizes terapêuticas muito bem definidas (Young, 2019). O tratamento consiste no transplante de células tronco para a pessoa doente, em substituição às células neoplásicas. No caso da LLA, o tipo de transplante mais adotado é o alogênico, modalidade em que o genótipo do doador e do receptor precisam ser idênticos para evitar reações imunológicas (doença do enxerto vs. Hospedeiro). Todavia, também existe a possibilidade de transplante autólogo, onde as células que serão transplantadas são oriundas do próprio paciente. Embora também apresente resultados muito bons, é mais usada nos casos de LMA (Copelan, 2006).

Por fim, uma nova metodologia de tratamento tem ganhado destaque nos últimos anos, a técnica é denominada como *CAR-T cell (Chimeric Antigen Receptor)*. O princípio dessa tecnologia é a extração de linfócitos T do próprio paciente e realizar a sua reprogramação genética para expressarem em sua superfície receptores para antígenos específicos relacionados às células cancerígenas (Pehlivan et al., 2018). Após tratamento quimioterápico para promover a depleção de células T tumorais, são transfundidas as células modificadas, geralmente com alvo em CD19, no indivíduo para que estas exerçam seu papel citotóxico de maneira direta. (Maude et al., 2018) É apontado que esse tipo de tratamento é promissor até mesmo nos casos em que o prognóstico da LLA não é favorável, como ocorre nos casos dos pacientes de LLA Ph+, ou seja, que possuem a translocação BCR-ABL1 (Davila et al., 2014). Recentemente, em um determinado estudo (Samra et al., 2020),

foi demonstrado que esse tipo de tratamento promoveu a remissão do câncer em mais de 80% das pessoas estudadas, ainda que muitas tenham apresentados efeitos adversos considerados comuns para esse tipo de intervenção. Outros estudos caminham para desenvolver novos receptores quiméricos com alvos diferenciados, além de CD19, para que o tratamento da LLA através das CAR-T possa ser direcionado de maneira mais precisa para cada subtipo. (He et al., 2020; Hosseinkhani et al., 2020; Shi et al., 2020)

1.5 Família PDLIM

Diversos marcadores moleculares vêm sendo descobertos com o avanço nas pesquisas sobre o câncer. Muitos desses marcadores podem ser identificados por mutações ou pelas proteínas expressas como resultado de diversas dessas mutações. A família PDZ and LIM *protein* (PDLIM) é composta por cinco membros (1, 2, 3, 4, 5 e 7) em humanos e vem sendo recentemente estudada como alvo para determinação diagnóstica e prognóstica de diversos tipos de neoplasias, não somente hematológicas. Os domínios PDZ e LIM são estruturas comuns a várias proteínas, inclusive de outras famílias. O domínio PDZ é composto por cerca de cem aminoácidos na porção N-terminal e três domínios LIM na porção C-terminal. Esse grupo de proteínas, funcionalmente é conhecido por proteínas de andaime (do inglês, *scaffold protein*), que participam da formação de complexos intracelulares direcionados para melhoramento de alguma via de sinalização (Cui et al., 2019; Wei et al., 2018).

O domínio PDZ pode ser verificado em vários grupos taxonômicos diferentes, desde organismos menos complexos, como vírus e bactérias, a organismos mais complexos, como mamíferos. Esses domínios são muito

importantes para que proteínas que agem como receptores sejam ancoradas na membrana através da ligação com componentes do citoesqueleto. Dessa forma, apresentam papel fundamental na formação de complexos proteicos que atuam na transdução da cascata de sinalização intracelular (Boxus et al., 2008; Ponting, 2008). Esse domínio é um acrônimo das três proteínas nas quais foi primariamente descoberto, sendo estas *Post synaptic density protein (PSD95)* (figura 3), *Drosophila disc large tumor supressor (Dig1)* e *zonula-occludens-1 protein (Zo-1)* (Kennedy, 1995). A estrutura de um domínio PDZ geralmente é composta por cinco a seis folhas-beta e uma longa e uma curta alfa-hélice. Ainda que essa estrutura seja conservada, a estrutura secundária pode adquirir formas diferentes de acordo com os tipos de domínio PDZ. Essas diferenças ocorrem porque há diferentes tipos de proteínas com esse domínio que empregam funções distintas umas das outras (Lee & Zheng, 2010). Uma única proteína pode possuir um ou vários desses domínios, sendo do mesmo tipo ou de tipos diferentes. As diferenças existem porque, funcionalmente, os domínios PDZ são conhecidos por duas atividades: regulação de vias intracelulares e manutenção de complexos servindo como “proteína andaime” (Harris & Lim, 2001).

Já o domínio LIM, é reconhecido por possuir muitas cisteínas em sua composição, com cerca de 50 a 60 aminoácidos que formam a sua estrutura primária. Nesse domínio, há também dois locais onde é possível realizar ligação com o íon zinco (Zn^{2+}). Assim como o domínio PDZ, o domínio LIM também é um acrônimo de outras proteínas, nas quais foi primeiramente descrito. Essas proteínas são Lin-11 de *C. elegans*, Isl-1 de rato e Mec-3

também de *C. elegans* (Zhou et al., 1999). As proteínas que contêm o domínio LIM são relacionadas ao citoesqueleto da célula. Basicamente, suas funções são relativas a estarem presentes na membrana celular, em regiões de adesão e oclusão, participando de processos que envolvem o crescimento, motilidade, divisão e diferenciação celular (Koch et al., 2012). Por isso, há uma abundância deste tipo de domínio em tecidos ricos em interações celulares, desta forma, não é surpreendente que esteja envolvido com diversos tipos de cânceres (Dahéron et al., 2001).

A proteína PDLIM1 está associada ao citoesqueleto celular. Já é comprovada a sua íntima relação com a espermatogênese, devido à sua localização e envolvimento na organização do citoesqueleto. Ela funciona como uma proteína de andaime (*scaffold protein*) e age na regulação de complexos proteicos de sinalização intracelular. Seu envolvimento com o câncer não é muito bem elucidado, já que há controvérsias sobre o seu papel oncogênico ou supressor de tumor. Alguns estudos (Ahn et al., 2016; Liu et al., 2015) mostram que há uma superexpressão dessa proteína em cânceres de mama e glioblastomas. Entretanto, também há indícios que indicam que essa proteína possui um papel importante na supressão de metástase do câncer colorretal. (Chen et al., 2016) Mesmo assim, um estudo recente mostra que essa proteína cumpre papel importante na inibição de câncer hepático, já que se mostra infraregulada (do inglês, *downregulated*) no processo de metástase dessa malignidade (Huang et al., 2020). Já a proteína PDLIM2, também conhecida como SLIM ou mystique, tem como suas funções principais a ubiquitinação e degradação proteossomal de dois principais fatores de transcrição nucleares:

NF- κ B RelA e STAT3. Estudos recentes (Qu, Fu, et al., 2010; Qu, Yan, et al., 2010; Sun et al., 2015) mostram que essa proteína pode ter uma importante função como supressora de tumores, justamente por estar envolvida a esses dois fatores, que já foram relacionados ao câncer de pulmão e de outros órgãos. Apesar de não haver estudos que estabeleçam uma ligação dessa proteína com a fisiopatologia dessa doença, sabe-se também que ela é mais expressa em pulmões saudáveis. A proteína também já foi relacionada com a resistência ao tratamento quimioterápico e sua infraregulação geralmente resulta em um prognóstico adverso (Sun et al., 2019). As proteínas PDLIM3 e 4 são outras proteínas que têm papel fundamental em papéis biológicos e sua hipoexpressão também está relacionada com processos oncogênicos (Hunter & Rhodes, 2005). A PDLIM5 é a única proteína dessa família que já foi relacionada com doenças não neoplásicas, como desordens mentais e problemas cardíacos. Diferentemente das isoformas 2 e 4, esta isoforma parece funcionar como oncogene, não como um gene supressor de tumor. Isso ocorre porque estudos afirmam que sua expressão é relacionada com o desenvolvimento de cânceres gástricos, cânceres de pulmão e cânceres de mama. Contudo, seu papel na carcinogênese é melhor conhecida no câncer papilar de tireóide, pela expressão aumentada nesse tecido. Apesar dessa relação, a forma como a proteína PDLIM5 está envolvida na fisiopatologia ainda precisa ser elucidada (Wei et al., 2018), sabe-se apenas que ela está envolvida com a regulação da via Ras-ERK (Cui et al., 2019). Por fim, a proteína PDLIM7 está relacionada com outro fator bastante conhecido na oncologia, a proteína p53. A PDLIM7 é um estabilizador da MDM2 (*Murine Double Minute 2*). Ela age impedindo a autoubiquitinação da MDM2, permitindo-a trans-ubiquitar a p53.

Dessa forma, ao estar intimamente relacionada com o aumento ou diminuição da p53, é estabelecida a conexão entre essa proteína e processos do ciclo celular, como a divisão e a apoptose (Jung et al., 2010; Klein et al., 2018).

Além disso, no último ano, houve a publicação de um trabalho (Cui et al., 2019) em que os pesquisadores estabelecem uma relação entre a expressão de membros da família PDLIM como marcadores prognósticos na Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

Como pode ser visto, existe claramente uma associação entre membros da família PDLIM e diversos tipos de câncer, incluindo hematológicos. Entretanto, não existe informação até o momento de qual seria o impacto desses membros na LLA.

2. Objetivos

Analisar a expressão de membros da família PDLIM na LLA e discutir possíveis funções desses membros na fisiopatologia ou progressão desse câncer.

3. Metodologia

A metodologia consistiu na avaliação estatística da expressão dos genes da família PDLIM em amostras de MO saudável (controle) e oito subtipos de LLA.

3.1 Obtenção dos dados

Os dados foram obtidos a partir do *Microarray Innovations in Leukaemia (MILE) study*, cujos dados estão depositados na base Bloodspot.eu. A base de dados fornece informações a respeito da hematopoese saudável e anormal, disponibilizando dados a partir de uma série de estudos em hematologia. Além disso, essa base possui algumas ferramentas que auxiliam os interessados na análise de seus dados, como a expressão dos genes (quantitativamente na base log 2), aplicação estatística e curva de Kaplan-Meier para LMA que permitem inferir o impacto prognóstico de alguns genes nesse câncer (Bagger et al., 2019).

As informações fornecidas pelo MILE study foram coletadas entre os anos de 2005 e 2008 por laboratórios de pesquisa na Europa, nos Estados Unidos da América e em Singapura. O objetivo foi analisar o perfil de expressão genômico (n total=3252), através de microarranjo, para 17 subtipos de leucemias, de origem mieloide, linfóide e mista, além de medulas ósseas saudáveis (n= 73) (Haferlach et al., 2008).

As informações coletadas foram referente aos oito subtipos de LLA que estavam disponíveis na base, sendo estas: LLA T t(1;19) (n = 36), LLA t(12;21) (n = 58), LLA Hiperdiploide (n = 40), LLA Pro B t(11q23) (n = 70), LLA Pre B t(9;22) (n = 122), LLA T (n = 174), LLA Pre B sem t(9;22) (n = 237) e LLA B t(8;14) (n = 13).

3.2 Análise de dados

Os dados foram analisados através do software GraphPad Prism® 7.00 (San Diego, EUA). As informações exportadas da base de dados para cada gene foram submetidas ao teste t de Student não pareado para análise da expressão entre a MO saudável e a LLA, sem subdivisões. Em seguida, fez-se a Análise de Variância (ANOVA) para comparação entre todos os grupos, seguido pelo pós-teste de Dunn para múltiplas comparações a fim de comparar cada subgrupo com o controle, tendo como referência o nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises.

4. Resultados

4.1 PDLIM1

O teste T mostrou que PDLIM1 encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p < 0,0001$) (figura 3A). É interessante, pois PDLIM1 apresenta expressão reduzida nos subtipos de LLA t(1;19) ($p < 0,0396$), Hiperdiploide ($p < 0,001$) e Pre B sem t(9;22) ($p < 0,0003$), comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 3B).

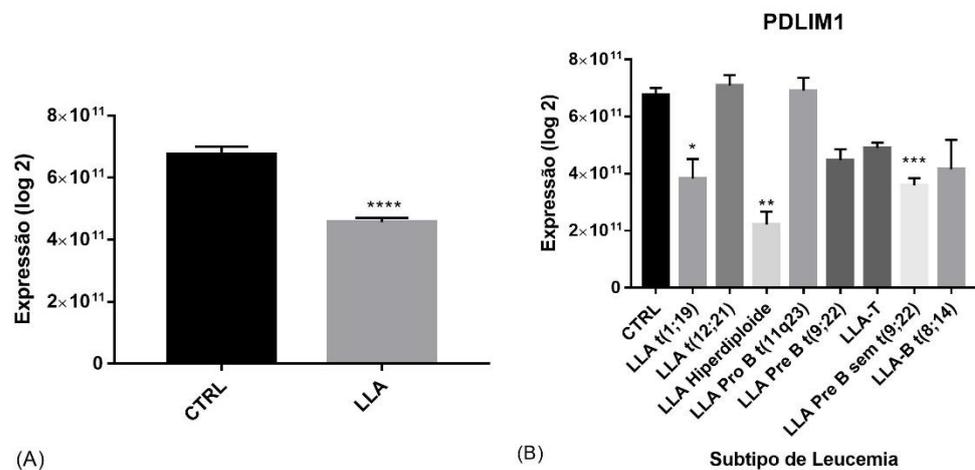


Figura 3A - Expressão (log 2) do gene PDLIM1 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. **Figura 3B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM1 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(1;19), a LLA Hiperdiploide e a LLA Pre B sem t(9;22) apresentam expressão reduzida de PDLIM. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,002$; *** = $p < 0,0002$; **** = $p < 0,0001$)

4.2 PDLIM2

O teste T mostrou que PDLIM2 não encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p = 0,06$) (figura 4A). É interessante, pois PDLIM2 apresenta expressão reduzida nos subtipos de LLA t(1;19) ($p < 0,0001$) e LLA Pro B t(11q23) ($p < 0,001$) comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 4B).

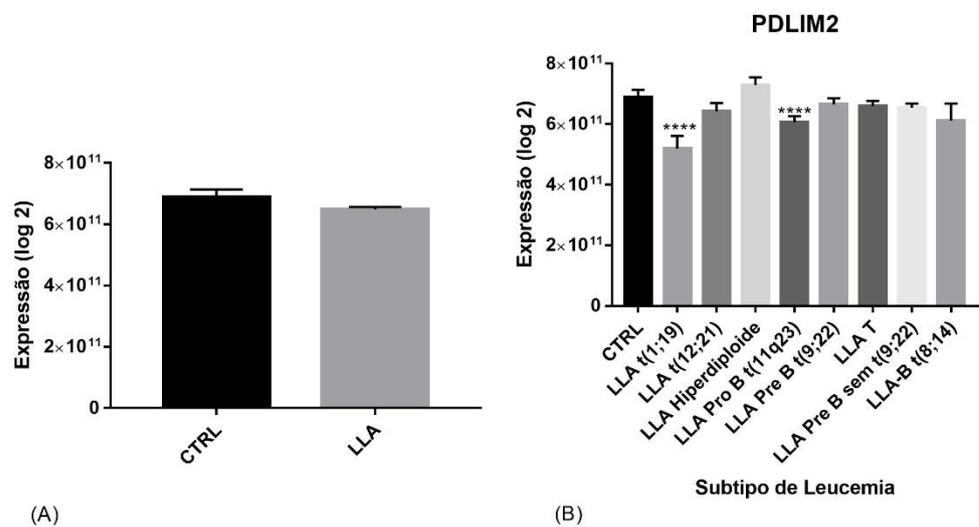


Figura 4A - Expressão (log 2) do gene PDLIM2 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM **Figura 4B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM2 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(1;19) e a LLA Pre t(11q23) apresentam expressão reduzida de PDLIM. (**** = $p < 0,0001$)

4.3 PDLIM3

O teste T mostrou que PDLIM3 não encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p = 0,3058$) (figura 5A). Contudo, PDLIM3 apresenta expressão discretamente reduzida nos subtipos de LLA t(1;19) ($p < 0,0288$) e

LLA T ($p < 0,0288$) comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 5B).

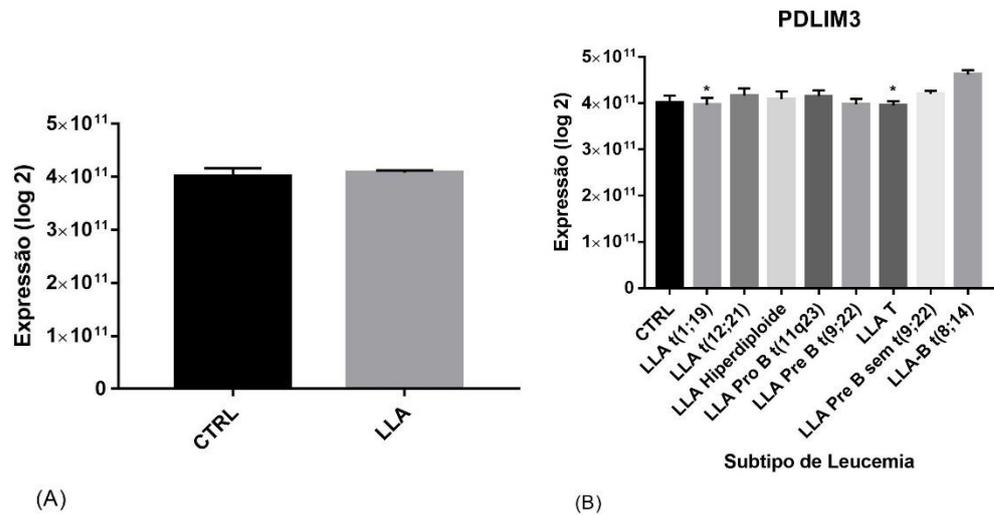


Figura 5A - Expressão (log 2) do gene PDLIM3 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM **Figura 5B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM3 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(1;19) e a LLA T apresentam expressão reduzida de PDLIM. (* = $p < 0,05$)

4.4 PDLIM4

O teste T mostrou que PDLIM4 encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p = 0,04$) (figura 6A). É interessante, pois PDLIM4 apresenta expressão discretamente reduzida nos subtipos de LLA t(1;19) ($p < 0,0001$), LLA t(12;21) ($p < 0,0001$), LLA Hiperdiploide ($p < 0,0008$) e LLA T ($p < 0,0027$) comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 6B).

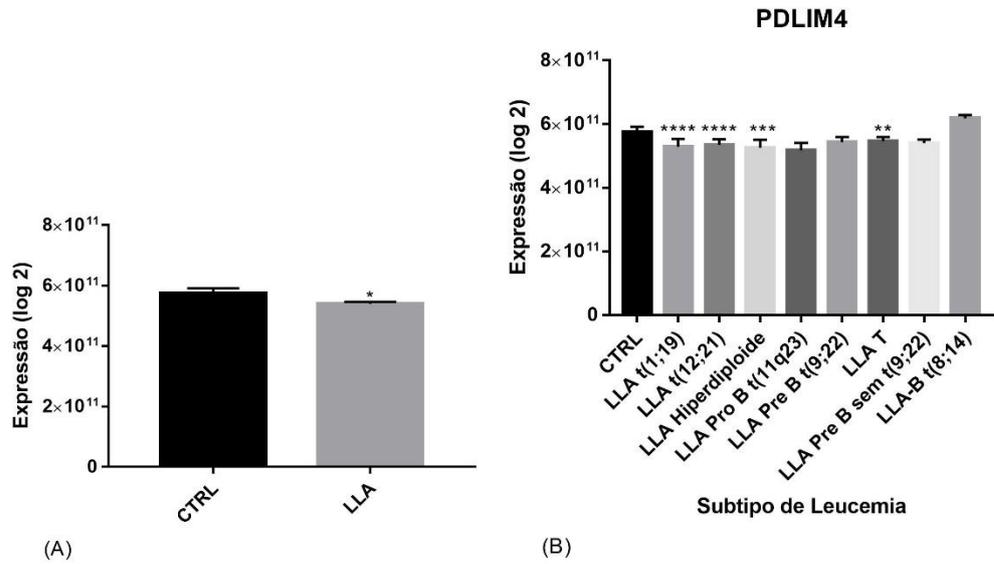


Figura 6A - Expressão (log 2) do gene PDLIM4 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM **Figura 6B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM4 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(1;19), LLA t(12;21), LLA Hiperdiploide e a LLA T apresentam expressão reduzida de PDLIM. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,002$; *** = $p < 0,0002$; **** = $p < 0,0001$)

4.5 PDLIM5

O teste T mostrou que PDLIM5 encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p < 0,0001$) (figura 7A). É interessante, pois PDLIM5 apresenta expressão significativamente reduzida em todos os subtipos de LLA ($p < 0,0001$), com exceção do subtipo LLA-B t(8;14) ($p = 0,2812$), comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 7B).

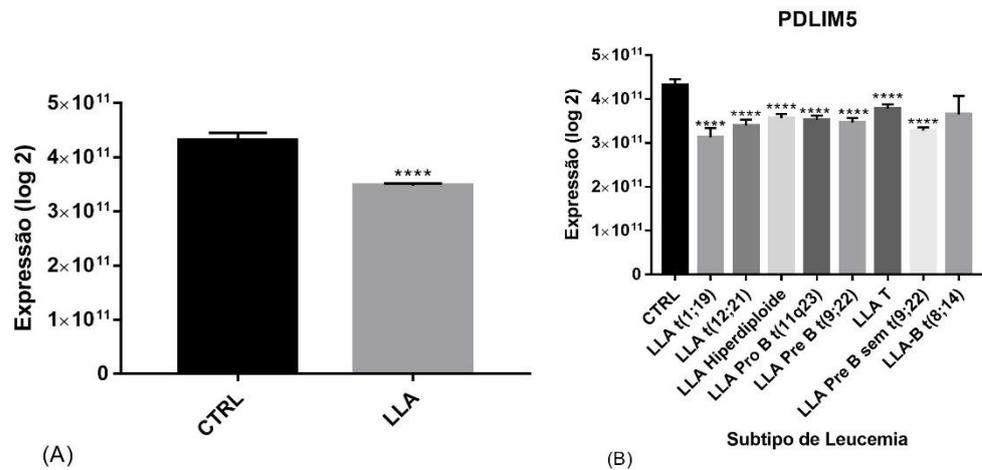


Figura 7A - Expressão (log 2) do gene PDLIM5 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM **Figura 7B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM5 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(1;19), LLA t(12;21), LLA Hiperdiploide e a LLA T apresentam expressão reduzida de PDLIM. (**** = $p < 0,0001$).

4.6 PDLIM7

O teste T mostrou que PDLIM7 não encontra-se diferencialmente expresso na LLA ($p = 0,05$) (figura 8A). É interessante, pois PDLIM7 apresenta expressão discretamente reduzida em LLA t(12;21) ($p = 0,01$), LLA Hiperdiploide ($p = 0,002$) e LLA T ($p = 0,04$) comparados ao grupo controle pelo pós-teste de Dunn (figura 8B).

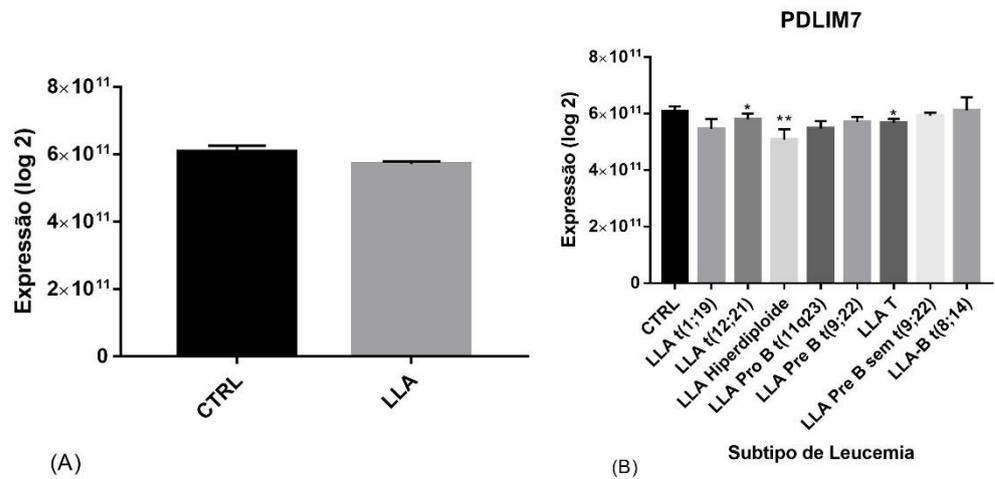


Figura 8A - Expressão (log 2) do gene PDLIM7 na LLA. Os dados estão apresentados como média \pm SEM **Figura 8B** - Expressão (log 2) do gene PDLIM7 em cada um dos subtipos de LLA selecionados. Os dados estão apresentados como média \pm SEM. A LLA t(12;21), LLA Hiperdiploide e a LLA T apresentam expressão reduzida de PDLIM. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,002$;))

5. Discussão e Conclusão

De acordo com os resultados obtidos, os genes PDLIM1, PDLIM4 e PDLIM5 se mostraram com expressão reduzida na LLA, quando todos os genótipos são colocados em apenas um grupo. Já para PDLIM2, PDLIM3 e PDLIM7, não há diferença estatística entre o controle e o grupo de LLA.

Os dados concordam com outros estudos que apontam o importante papel desses genes da família PDLIM como proteínas supressoras de tumor. (Chen et al., 2016; Qu, Fu, et al., 2010; Sun et al., 2015) Ainda que não haja literatura suficiente que aponte essa ligação de forma segura com os cânceres hematológicos, diversos outros tipos de neoplasias já possuem essa relação bem estabelecida, como é o caso do PDLIM1, onde Huang et. al (2020) apontam que essa proteína tem sua expressão reduzida nos tumores colorretais e metástase hepática.

. Ainda que diferentemente da PDLIM1, PDLIM 2 não tenham ainda uma sólida relação estabelecida com o câncer, sabe-se que sua hipoexpressão ocorre em pulmões afetados por neoplasias e maior dificuldade de obtenção de sucesso em tratamentos quimioterápicos nessas pessoas. (Sun et al., 2019). No nosso estudo a expressão de PDLIM2 está reduzida nos subtipos de LLA t(1;19) e Pro B t(11q23).

Já as proteínas PDLIM3 e 4, apesar de não haver muita informação disponível sobre quais seriam os seus papéis de maneira precisa dentro das células, sabe-se que ambas estão relacionadas com o processo de desenvolvimento em mamíferos, incluindo humanos (Barnes et al., 1994; DONG et al., 1997). Sabe-se também que a menor expressão de ambos os genes está ligada ao aparecimento de neoplasias (Hunter & Rhodes, 2005).

Contudo, a PDLIM4 parece ter uma diminuição de sua expressão relativamente mais significativa que a PDLIM3 nos diversos tipos de LLA quando comparadas com o controle. Isso aponta que é possível que PDLIM4 esteja mais relacionada com a supressão de tumor que a PDLIM3. Essa informação é muito relevante, pois já foi descrito que translocações cromossômicas como t(1;14) (q25;q32) relacionadas ao aparecimento de alguns tipos de LLA alteram a função do domínio LIM, mais especificamente a isoforma 4 (Kawamata et al., 2002; Yamaguchi et al., 2003).

Por outro lado, a isoforma 5 apresentou um resultado na LLA muito diferente do esperado, pois já foi confirmada que sua expressão está aumentada em diversos tipos de câncer, atuando na via contrária dos outros membros da família, como oncogene (Wei et al., 2018) Contudo, o que as análises estatísticas apresentam é que esse gene, assim como os outros, está consideravelmente hipoexpresso em todos os tipos de LLA quando comparados ao grupo controle, com exceção da LLA-B t(8;14). É possível que essa diferença aconteça porque a proteína desempenha papéis diferentes nos diversos tipos de tecidos ou por esse oncogene não ter papel central no desenvolvimento da LLA. As informações que existem e estabelecem a relação de PDLIM5 com o câncer são de células epiteliais de revestimento ou células epiteliais glandulares (Edlund et al., 2012; Eeckhoutte, 2006; Heiliger et al., 2012). Assim, é possível que em células de tecido conjuntivo seu papel não tenha relação direta com o aparecimento de neoplasias, podendo até mesmo atuar como gene supressor de tumor nesse tecido.

Por fim, PDLIM7 apresentou padrão de expressão na LLA que parece concordante com outros tipos de câncer. PDLIM 7 apresenta íntima relação

com a proteína p53, que é ponto fundamental na elucidação da fisiopatologia de diversos tipos de neoplasias (Jung et al., 2010; Klein et al., 2018). Todavia, apesar de haver uma diferença estatística entre o controle e alguns tipos de LLA, esperava-se que, de todas, a isoforma 7 traria os resultados com maior diferença significativamente estatística em relação ao controle, dada a sua relação com a proteína p53.

De uma forma geral, não há um padrão bem estabelecido de expressão da família PDLIM na LLA, pois os membros apresentam uma frequência de expressão muito discrepante entre si em cada subtipo da doença. Não há uma uniformidade de expressão nem mesmo para um mesmo gene quando se analisa os oito subtipos de LLA do estudo. Por isso, é pouco provável que todos os genes dessa família cumpram o mesmo papel na fisiopatologia das leucemias, contudo, é possível estabelecer uma relação válida de que a sua expressão reduzida está ligada ao câncer, mas não é possível inferir se é uma relação de causa ou consequência.

É importante destacar que nossa análise indica que possivelmente não exista ação da família PLIM sobre o subtipo LLA-B t(8;14), tendo em vista que nenhum dos genes analisados apresentou expressão diferencial nesse subtipo da LLA. Entretanto, esse achado deveria ser validado em outras cortes, tendo em vista que é o subtipo de LLA com menor número de amostras na base de dados acessada.

A família de genes PDLIM mostrou-se efetivamente com expressão reduzida na maioria dos subtipos de LLA estudados. Isso mostra que é possível que esses genes tenham um papel de supressor tumoral, atuando como reguladores do ciclo celular do tecido hematopoiético. Mais investigações são

necessárias para que uma relação precisa possa ser estabelecida entre o processo de início ou manutenção da neoplasia com as isoformas dessa família. Dessa forma, seria possível avaliar se sua expressão poderia ser considerada como parâmetro laboratorial para auxiliar o prognóstico ou estadiamento das diversas apresentações de leucemia de linhagem linfóide em seres humanos.

6. Referências Bibliográficas

- Ahn, B. Y., Saldanha-Gama, R. F. G., Rahn, J. J., Hao, X., Zhang, J., Dang, N.-H., Alshehri, M., Robbins, S. M., & Senger, D. L. (2016). Glioma invasion mediated by the p75 neurotrophin receptor (p75NTR/CD271) requires regulated interaction with PDLIM1. *Oncogene*, 35(11), 1411–1422. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.199>
- Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127(20), 2391–2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>
- Bagger, F. O., Kinalis, S., & Rapin, N. (2019). BloodSpot: a database of healthy and malignant haematopoiesis updated with purified and single cell mRNA sequencing profiles. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D881–D885. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1076>
- Barnes, J. D., Crosby, J. L., Jones, C. M., Wright, C. V. E., & Hogan, B. L. M. (1994). Embryonic Expression of Lim-1, the Mouse Homolog of Xenopus XLim-1, Suggests a Role in Lateral Mesoderm Differentiation and Neurogenesis. *Developmental Biology*, 161(1), 168–178. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1018>
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., & Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*, 5(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-76>
- Brunton, L. L., Chabner, B. A., & Knollmann, B. C. (2012). *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman* (12th ed.). AMGH.
- Burke, W., & Thummel, K. (2019). Precision medicine and health disparities: The case

- of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nursing Outlook*, 67(4), 331–336.
<https://doi.org/10.1016/j.outlook.2019.05.003>
- Chen, H.-N., Yuan, K., Xie, N., Wang, K., Huang, Z., Chen, Y., Dou, Q., Wu, M., Nice, E. C., Zhou, Z.-G., & Huang, C. (2016). PDLIM1 Stabilizes the E-Cadherin/ -Catenin Complex to Prevent Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastatic Potential of Colorectal Cancer Cells. *Cancer Research*, 76(5), 1122–1134.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-1962>
- Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 354.
<https://static1.squarespace.com/static/5a372ca9f9a61ed6e86178a7/t/5a3dc0ac419202d4b170ec58/1513996462150/Hematopoietic+Stem-Cell+Transplantation.pdf>
- Cui, L., Cheng, Z., Hu, K., Pang, Y., Liu, Y., Qian, T., Quan, L., Dai, Y., Pang, Y., Ye, X., Shi, J., & Fu, L. (2019). Prognostic value of the PDLIM family in acute myeloid leukemia. *American Journal of Translational Research*, 11(9), 6124–6131.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31632581>
- Dahéron, L., Veinstein, A., Brizard, F., Drabkin, H., Lacotte, L., Guilhot, F., Larsen, C. J., Brizard, A., & Roche, J. (2001). Human LPP gene is fused to MLL in a secondary acute leukemia with a t(3;11) (q28;q23). *Genes, Chromosomes and Cancer*, 31(4), 382–389. <https://doi.org/10.1002/gcc.1157>
- Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., Chung, S. S., Stefanski, J., Borquez-Ojeda, O., Olszewska, M., Qu, J., Wasielewska, T., He, Q., Fink, M., Shinglot, H., Youssif, M., Satter, M., Wang, Y., Hosey, J., ... Brentjens, R. (2014). Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine*, 6(224),

224ra25-224ra25. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008226>

- DEMIDOWICZ, E., POGORZAŁA, M., ŁĘCKA, M., ŻOŁNOWSKA, H., MARJAŃSKA, A., KUBICKA, M., KURYŁO-RAFIŃSKA, B., CZYŻEWSKI, K., DĘBSKI, R., KOŁTAN, A., RICHERT-PRZYGOŃSKA, M., & STYCZYŃSKI, J. (2019). Outcome of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Sixty Years of Progress. *Anticancer Research*, 39(9), 5203–5207. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13717>
- DONG, W.-F., HENG, H. H. Q., LOWSKY, R., XU, Y., DeCOTEAU, J. F., SHI, X.-M., TSUI, L.-C., & MINDEN, M. D. (1997). Cloning, Expression, and Chromosomal Localization to 11p12-13 of a Human LIM/HOMEODOMAIN Gene, hLim-1. *DNA and Cell Biology*, 16(6), 671–678. <https://doi.org/10.1089/dna.1997.16.671>
- Edlund, K., Lindskog, C., Saito, A., Berglund, A., Pontén, F., Göransson-Kultima, H., Isaksson, A., Jirström, K., Planck, M., Johansson, L., Lambe, M., Holmberg, L., Nyberg, F., Ekman, S., Bergqvist, M., Landelius, P., Lamberg, K., Botling, J., Östman, A., & Micke, P. (2012). CD99 is a novel prognostic stromal marker in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 131(10), 2264–2273. <https://doi.org/10.1002/ijc.27518>
- Eeckhoute, J. (2006). A cell-type-specific transcriptional network required for estrogen regulation of cyclin D1 and cell cycle progression in breast cancer. *Genes & Development*, 20(18), 2513–2526. <https://doi.org/10.1101/gad.1446006>
- Haferlach, T., Kohlmann, A., Basso, G., Béné, M.-C., Chiaretti, S., Downing, J. R., Hernández, J.-M., Hofmann, W.-K., Kipps, T. J., Koay, E. S., Kronnie, G. Te, Liu, W., MacIntyre, E., Mills, K. I., Papenhausen, P., Preudhomme, C., Rassenti, L. Z., Shurtleff, S. A., De Vos, J., ... Foà, R. (2008). The Clinical Utility of Microarray-Based Gene Expression Profiling in the Diagnosis and Sub-Classification of Leukemia: Final Report on 3252 Cases from the International MILE Study Group.

- Blood*, 112(11), 753–753. <https://doi.org/10.1182/blood.V112.11.753.753>
- Harris, B. Z., & Lim, W. A. (2001). Mechanism and role of PDZ domains in signaling complex assembly. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 18), 3219–3231. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591811>
- He, X., Feng, Z., Ma, J., Ling, S., Cao, Y., Gurung, B., Wu, Y., Katona, B. W., O'Dwyer, K. P., Siegel, D. L., June, C. H., & Hua, X. (2020). Bispecific and split CAR T cells targeting CD13 and TIM3 eradicate acute myeloid leukemia. *Blood*, 135(10), 713–723. <https://doi.org/10.1182/blood.2019002779>
- Heiliger, K.-J., Hess, J., Vitagliano, D., Salerno, P., Braselmann, H., Salvatore, G., Ugolini, C., Summerer, I., Bogdanova, T., Unger, K., Thomas, G., Santoro, M., & Zitzelsberger, H. (2012). Novel candidate genes of thyroid tumorigenesis identified in Trk-T1 transgenic mice. *Endocrine-Related Cancer*, 19(3), 409–421. <https://doi.org/10.1530/ERC-11-0387>
- Hoffbrand, A. V., Moss, P. A. H., & Pettit, J. E. (2013). *Fundamentos em Hematologia* (6th ed.). Artmed.
- Hosseinkhani, N., Derakhshani, A., Kooshkaki, O., Abdoli Shadbad, M., Hajiasgharzadeh, K., Baghbanzadeh, A., Safarpour, H., Mokhtarzadeh, A., Brunetti, O., Yue, S. C., Silvestris, N., & Baradaran, B. (2020). Immune Checkpoints and CAR-T Cells: The Pioneers in Future Cancer Therapies? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21). <https://doi.org/10.3390/ijms21218305>
- Huang, Z., Zhou, J., Wang, K., Chen, H., Qin, S., Liu, J., Luo, M., Chen, Y., Jiang, J., Zhou, L., Zhu, L., He, J., Li, J., Pu, W., Gong, Y., Li, J., Ye, Q., Dong, D., Hu, H., ... Peng, Y. (2020). PDLIM1 Inhibits Tumor Metastasis Through Activating Hippo Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, hep.30930.

<https://doi.org/10.1002/hep.30930>

- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *New England Journal of Medicine*, 373(16), 1541–1552. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1400972>
- Hunter, C. S., & Rhodes, S. J. (2005). LIM-homeodomain genes in mammalian development and human disease. *Molecular Biology Reports*, 32(2), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s11033-004-7657-z>
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, & Ministério da Saúde. (2019). *Estimativa/2020 - Incidência de Câncer no Brasil*. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>
- Jung, C.-R., Lim, J. H., Choi, Y., Kim, D.-G., Kang, K. J., Noh, S.-M., & Im, D.-S. (2010). Enigma negatively regulates p53 through MDM2 and promotes tumor cell survival in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120(12), 4493–4506. <https://doi.org/10.1172/JCI42674>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2014). *Farmacologia Básica e Clínica* (12th ed.). AMGH.
- Kawamata, N., Sakajiri, S., Sugimoto, K., Isobe, Y., Kobayashi, H., & Oshimi, K. (2002). A novel chromosomal translocation t(1;14)(q25;q32) in pre-B acute lymphoblastic leukemia involves the LIM homeodomain protein gene, Lhx4. *Oncogene*, 21(32), 4983–4991. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205628>
- Kennedy, M. (1995). Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(9), 350. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89074-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89074-X)
- Klein, M. E., Dickson, M. A., Antonescu, C., Qin, L.-X., Dooley, S. J., Barlas, A., Manova, K., Schwartz, G. K., Crago, A. M., Singer, S., Koff, A., & Tap, W. D.

- (2018). PDLIM7 and CDH18 regulate the turnover of MDM2 during CDK4/6 inhibitor therapy-induced senescence. *Oncogene*, *37*(37), 5066–5078. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0332-y>
- Koch, B. J., Ryan, J. F., & Baxevanis, A. D. (2012). The Diversification of the LIM Superclass at the Base of Metazoa Increased Subcellular Complexity and Promoted Subcellular Specialization. *PLoS ONE*, *3*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033261>
- Lee, H.-J., & Zheng, J. J. (2010). PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification. *Cell Communication and Signaling*, *8*(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-8>
- Linabery, A. M., & Ross, J. A. (2008). Trends in childhood cancer incidence in the U.S. (1992–2004). *Cancer*, *112*(2), 416–432. <https://doi.org/10.1002/cncr.23169>
- Liu, Z., Zhan, Y., Tu, Y., Chen, K., Liu, Z., & Wu, C. (2015). PDZ and LIM domain protein 1(PDLIM1)/CLP36 promotes breast cancer cell migration, invasion and metastasis through interaction with α -actinin. *Oncogene*, *34*(10), 1300–1311. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.64>
- Mansouri, S., Khansarinejad, B., Mosayebi, G., Eghbali, A., & Mondanizadeh, M. (2020). Alteration in expression of mir-32 and FBXW7 tumor suppressor in plasma samples of patients with t-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Management and Research*, *12*, 1253–1259. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S238470>
- Maude, S. L., Laetsch, T. W., Buechner, J., Rives, S., Boyer, M., Bittencourt, H., Bader, P., Verneris, M. R., Stefanski, H. E., Myers, G. D., Qayed, M., De Moerloose, B., Hiramatsu, H., Schlis, K., Davis, K. L., Martin, P. L., Nemecek, E. R., Yanik, G. A., Peters, C., ... Grupp, S. A. (2018). Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *378*(5),

439–448. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866>

McPherson, R. A., & Pincus, M. R. (2011). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. In *Journal of Clinical Pathology* (22nd ed., Vol. 34, Issue 2). <https://doi.org/10.1136/jcp.34.2.228-a>

Pehlivan, K. C., Duncan, B. B., & Lee, D. W. (2018). CAR-T Cell Therapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Transforming the Treatment of Relapsed and Refractory Disease. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 13(5), 396–406. <https://doi.org/10.1007/s11899-018-0470-x>

Ponting, C. P. (2008). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Science*, 6(2), 464–468. <https://doi.org/10.1002/pro.5560060225>

Qu, Z., Fu, J., Yan, P., Hu, J., Cheng, S.-Y., & Xiao, G. (2010). Epigenetic Repression of PDZ-LIM Domain-containing Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 285(16), 11786–11792. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.086561>

Qu, Z., Yan, P., Fu, J., Jiang, J., Grusby, M. J., Smithgall, T. E., & Xiao, G. (2010). DNA Methylation–Dependent Repression of PDZ-LIM Domain–Containing Protein 2 in Colon Cancer and Its Role as a Potential Therapeutic Target. *Cancer Research*, 70(5), 1766–1772. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3263>

Rodgers, C. C., Hooke, M. C., Taylor, O. A., Koerner, K. M., Mitby, P. A., Moore, I. M., Scheurer, M. E., Hockenberry, M. J., & Pan, W. (2019). Childhood Cancer Symptom Cluster: Leukemia and Health-Related Quality of Life. *Oncology Nursing Forum*, 228–237. <https://doi.org/10.1188/19.ONF.228-237>

Sabarimurugan, S., Madurantakam Royam, M., Kumarasamy, C., Kodiveri Muthukaliannan, G., Samiappan, S., & Jayaraj, R. (2019). Prognostic miRNA classifiers in t cell acute lymphoblastic leukemia. *Medicine*, 98(9), e14569. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014569>

- Samra, B., Jabbour, E., Ravandi, F., Kantarjian, H., & Short, N. J. (2020). Evolving therapy of adult acute lymphoblastic leukemia: state-of-the-art treatment and future directions. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00905-2>
- Shi, W., Jin, W., Xia, L., & Hu, Y. (2020). Novel agents targeting leukemia cells and immune microenvironment for prevention and treatment of relapse of acute myeloid leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(11), 2125–2139. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.06.012>
- Silva, P. H. da, Alves, H. B., Comar, S. R., Henneberg, R., Merlin, J. C., & Stinghen, S. T. (2016). *Hematologia Laboratorial: teoria e procedimentos*. Artmed.
- Sun, F., Li, L., Yan, P., Zhou, J., Shapiro, S. D., Xiao, G., & Qu, Z. (2019). Causative role of PDLIM2 epigenetic repression in lung cancer and therapeutic resistance. *Nature Communications*, 10(1), 5324. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13331-x>
- Sun, F., Xiao, Y., & Qu, Z. (2015). Oncovirus Kaposi Sarcoma Herpesvirus (KSHV) Represses Tumor Suppressor PDLIM2 to Persistently Activate Nuclear Factor κ B (NF- κ B) and STAT3 Transcription Factors for Tumorigenesis and Tumor Maintenance. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7362–7368. <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.637918>
- Wei, X., Zhang, Y., Yu, S., Li, S., Jiang, W., Zhu, Y., Xu, Y., Yang, C., Tian, G., Mi, J., Bergquist, J., Zhao, M., & Song, F. (2018). PDLIM5 identified by label-free quantitative proteomics as a potential novel biomarker of papillary thyroid carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 499(2), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.159>

- Yamaguchi, M., Yamamoto, K., & Miura, O. (2003). Aberrant expression of theLHX4 LIM-homeobox gene caused by t(1;14)(q25;q32) in chronic myelogenous leukemia in biphenotypic blast crisis. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 38(3), 269–273. <https://doi.org/10.1002/gcc.10283>
- Young, K. H. (2019). Hematopoietic stem cell transplantation for adults with T-cell lymphoblastic lymphoma: can we successfully step into the era of precision medicine? *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0608-4>
- Zago, M. A., Falcão, R. P., & Pasquini, R. (2014). *Tratado de Hematologia*. Atheneu.
- Zhou, Q., Ruiz-Lozano, P., Martone, M. E., & Chen, J. (1999). Cypher, a Striated Muscle-restricted PDZ and LIM Domain-containing Protein, Binds to alfa-actinin-2 and Protein Kinase C*. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 19807–19813. https://annotation.dbi.udel.edu/image_mining/pdf3/10391924/10391924.pdf
- Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 312 - 27/03/2013.
- Ministério da Saúde. Portaria SAS/MS nº 115 - 10/02/2012.