

LUCIANA GUILHEM DE MATOS

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA EM PACIENTES
ACOMETIDOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA INFANTIL

BRASÍLIA, 2013

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIANA GUILHEM DE MATOS

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA EM PACIENTES
ACOMETIDOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA INFANTIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Prof^a. Dr^a. Andréa Barretto Motoyama

BRASÍLIA, 2013

LUCIANA GUILHEM DE MATOS

EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA EM PACIENTES
ACOMETIDOS COM LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA INFANTIL

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 31 de Julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Andréa Barretto Motoyama - Presidente
Universidade de Brasília – UnB

Angélica Amorin Amato
Univerisdade de Brasília - UnB

Rosângela Vieira de Andrade
Universidade Católica de Brasília - UCB

Robert Edward Pogue - Suplente
Universidade Católica de Brasília - UCB

*À minha família, por estar sempre ao meu lado sendo
minha direção e meu porto seguro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado vida e saúde para que eu sempre pudesse seguir em frente.

Aos meus pais que me deram o apoio necessário e dedicaram tempo precioso para me ensinar os valores que hoje permeiam minha caminhada pessoal e profissional, e que irei carregar para sempre.

Ao meu irmão, Lucas, que com seu humor inigualável sempre me ajudou a superar as dificuldades e reforçou meu ânimo para continuar essa jornada.

Ao Laércio Marques, meu namorado e companheiro, que soube entender quando precisei estar ausente e mesmo assim sempre esteve presente me apoiando e estimulando a continuar.

À professora Andréa Motoyama, minha orientadora, por me receber em seu grupo e dividir comigo esse projeto. Pela atenção, competência e pelos tantos ensinamentos durante essa empreitada.

Ao Dr. Luis Henrique Sakamoto, do Hospital da Criança de Brasília, por todo o apoio recebido e conhecimento compartilhado. Sem sua ajuda jamais teria conseguido.

À professora Rosângela Andrade que gentilmente me ofereceu sua bancada para que eu pudesse fazer meus experimentos na Universidade Católica de Brasília.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Patologia Molecular do Câncer: Dora, Maíra, Carol, Martha, Rubens, Nayara, Edna, Lucio, Alex, Tailine, Victor, Raul, Isabel, Fernanda, Rayssa, Mariana, Luana... Por estarem sempre presentes e me auxiliarem nas práticas laboratoriais quando precisei.

Aos colegas do FARMOL que também tiveram suas participações especiais nessa trajetória.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em especial a amiga Tainá, que de longe ou de perto estiveram torcendo por mim e por esse trabalho.

Aos meus amigos da "vida": Lorena, Raphael, Flávia, Adriano, Renaud, Sérgio, Dani, Matheus, Murilo, Sabrina, Manu, Lauro, Felipe, Guilherme, Deyvid,

Marília, Juliano, Bárbara, Larissa, Andressa, Léo e especialmente a Carol Torres, que sempre me aguentaram nos momentos em que eu falava apaixonadamente do meu trabalho e nos momentos que eu reclamava dele. Pelos momentos de descontração e alegria, por me apoiarem e ajudarem nos momentos difíceis e SEMPRE estarem presentes em minha vida.

Aos amigos do Coral Jovem de Brasília - CJB, aos quais é impossível enumerar. Uma família que sempre esteve ao meu lado e tirou o peso dos meus ombros semana após semana nos momentos de ensaio, cantoria e descontração.

Muito Obrigada!

*Um pouco de ciência nos afasta de
Deus, muito, nos aproxima.
(Louis Pasteur)*

RESUMO

O câncer é descrito como uma doença desencadeada por fatores genéticos, geralmente mutações. Em se tratando de crianças e adolescentes, são observados cerca de 9.890 novos casos por ano sendo a leucemia o tipo mais frequente. Dentre os tipos existentes, a Leucemia Linfóide Aguda - LLA representa o mais grave e mais comum câncer infantil. Por se tratar de uma doença na maioria das vezes de origem não conhecida, pesquisas moleculares se fazem necessárias para aprimorar os métodos diagnósticos e os tratamentos e, assim, aumentar a taxa de sobrevivência. Uma forma promissora de estudos moleculares está na pesquisa com células-tronco tumorais (CITs) que são assim chamadas por possuírem características iguais às de células tronco comuns. A existência dessas CITs em leucemias foi demonstrada primeiramente na Leucemia Mielóide Aguda, mas na LLA, a idéia de CITs é menos clara e pouco descrita. Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar a expressão dos genes *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3*, relacionados à pluripotência, em pacientes infantis acometidos com LLA. Foram selecionados 43 pacientes com LLA e um paciente saudável, utilizado como controle. Das amostras coletadas foi extraído o RNA total e traçado o perfil da expressão gênica utilizando qPCR. Foi feita uma análise comparando a expressão dos genes alvo (*c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3*) entre os pacientes com LLA e a amostra controle, e não houve diferença significativa entre a expressão dos grupos. Foi realizada posteriormente uma correlação entre a hiperexpressão (considerados os valores acima do percentil 75) dos genes alvo com os fatores prognósticos e com a sobrevivência total. Observou-se que, para o gene *klf4*, quando comparado o grupo com expressão basal e o grupo com hiperexpressão, houve diferença significativa ($p = 0,022$) na sobrevivência dos pacientes, ou seja, quando há maior expressão desse gene, a sobrevivência dos pacientes é diminuída. Além disso, foi observado que a hiperexpressão de *c-myc* se correlaciona com a ausência de translocações no momento do diagnóstico ($p = 0,014$). Dessa forma, postula-se que o estudo de células tronco pluripotentes e de genes relacionados à pluripotência pode ser uma porta promissora para esclarecer as questões moleculares e aprimorar métodos diagnósticos e tratamentos da LLA.

Palavras-chave: Leucemia Linfóide Aguda, Células-Tronco Tumorais, Fatores de Yamanaka, Expressão Gênica.

ABSTRACT

Cancer is described as a disease generally triggered by genetic mutations. Approximately, 9,890 new cases per year are diagnosed in Brazil in children and teenagers, of which leukemia is the most frequently occurring. In fact, among all types of malignancies, Acute Lymphoid Leukemia - ALL is the most serious and most common childhood cancer. Considering that the origin of the disease is largely unknown, research at the cellular and molecular level is needed to improve the diagnostic and treatment methods and thus increase survival rates. Recently, the existence of cancer stem cells (CSCs), which are so called due to their functional and genetic similarities to normal stem cells, has been proposed. Their characterization and identification held promises to a better understanding of cancer at the molecular level. The existence of CSCs in leukemia was first demonstrated in Acute Myeloid Leukemia. However, in LLA, they still remain elusive. Thus, the present study aimed at analyzing the expression of pluripotency-related genes, such as *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* and *notch3*, in bone marrows from pediatric patients affected with ALL. Forty three patients with ALL and a healthy individual, used as control, were selected. Total RNA was extracted from the collected samples and the profile of gene expression was obtained using qPCR. Comparative analysis of the expression of target genes (*c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* and *notch3*) in patients with ALL and in the control sample, have shown no significant difference between the groups. A correlation between over-expression (values above the 75th percentile) of target genes and prognostic factors was subsequently performed. Expression levels of *klf4* correlated with overall survival, when comparing basal expression and over-expression groups, with significant difference in patients survival ($p = 0,022$). In other words, when over expressed, this gene is associated with shorter patient survival. In addition, we observed that *c-myc* over expression correlates with the presence of translocation at the time of diagnosis ($p = 0,014$). Taken together, this study indicates that pluripotency-related genes may play a role in leukemogenesis, and therefore, may be a promising way to better understanding of the disease and improvement of molecular diagnostic and treatment methods of ALL.

Keywords: Acute Lymphoid Leukemia, Cancer Stem Cell, Yamanaka factors, Gene Expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Processo normal de hematopoiese originando os três tipos celulares básicos (Lodish, Molecular Cell Biology, 2003).21
- Figura 2:** As seis características adquiridas do câncer, propostas por Hanahan e Weinberg em 2000 (com adaptações).25
- Figura 3:** A) Esquema da desdiferenciação de fibroblastos em células-tronco pluripotentes induzidas (IPS). (1) Isolamento e cultura de fibroblastos. (2) Transfecção dos genes por meio de vetores virais. Células vermelhas indicam que as células que expressam os genes exógenos (*c-myc*, *sox2*, *oct4* e *klf4*). (3) Passagem das células para meio de cultura de ESCs. (4) Seleção do subconjunto de células com características de pluripotência. B) Análises comparativas para verificar a eficiência da indução da pluripotência nessas células.29
- Figura 4:** Avaliação da integridade do RNA extraído de linhagem HeLa(A) e amostra clínica (B).53
- Figura 5:** Amplificação do gene endógeno *ACTB* a partir de cDNA sintetizados das linhagens celulares NT2, MDA-MB-468, HCC1954, SKBR3 e HeLa. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.54
- Figura 6:** Expressão dos genes alvo (*c-myc*, *notch3*, *klf4* e *oct4*) utilizando os cDNAs das linhagens celulares selecionadas. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.54
- Figura 7:** Amplificação de *ACTB* a partir do cDNA de amostras clínicas. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Cada número representa um paciente.54
- Figura 8:** Padronização, por curva de diluição em série, dos ensaios de: A) *ACTB*, B) *c-myc*, C) *klf4*, D) *notch3*, E) *oct4* e F) *sox2*. Valor de eficiência dos ensaios em aproximadamente 90%.55

- Figura 9:** Quantificação da expressão de *c-myc* por qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *c-myc* após normalização com *ACTB*. Seis amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.58
- Figura 10:** Quantificação da expressão de *klf4* por qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *klf4* após normalização com *ACTB*. Sete amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.58
- Figura 11:** Quantificação da expressão de *oct4* por qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *oct4* após normalização com *ACTB*. Cinco amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.59
- Figura 12:** Quantificação da expressão *sox2* qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *sox2* após normalização com *ACTB*. Quatro amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.59
- Figura 13:** Quantificação da expressão de *notch3* por qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *notch3* após normalização com *ACTB*. Quatro amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.60
- Figura 14:** Comparação de expressão do gene *c-myc* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 58/1, 96/1, 292/1 e 316/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.62
- Figura 15:** Comparação de expressão do gene *klf4* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 54/1, 87/1 e 105/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.62
- Figura 16:** Comparação de expressão do gene *oct4* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 33/1 e 87/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.63
- Figura 17:** Comparação de expressão do gene *sox2* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na

normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. Nenhuma das amostras apresentou expressão inferior à da amostra controle.63

Figura 18: Comparação de expressão do gene *notch3* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 49/1, 54/1, 86/1 e 96/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.64

Figura 19: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de acordo com a expressão de: A) *c-myc* ($p = 0,531$), B) *klf4* ($p = 0,022$) , C) *oct4* ($p = 0,441$), D) *sox2* ($p = 0,977$), E) *notch3* ($p = 0,588$) e F) Curva de sobrevivência global. A sobrevivência global para o grupo com expressão basal está representado pela linha pontilhada e para o grupo hiperexpresso está representado pela linha sólida.66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens celulares utilizadas no desenvolvimento e padronização das análises moleculares.	38
Tabela 2: Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados na síntese de cDNA.	47
Tabela 3: Mix para reação de PCR.	47
Tabela 4: Sequência dos iniciadores direto e reverso utilizados na análise de expressão gênica por PCR.	48
Tabela 5: Características dos pacientes no momento do diagnóstico.	52
Tabela 6: Valores da padronização dos ensaios TaqMan para qPCR.	56
Tabela 7: Valores da quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes nas amostras calculado pelo software Biogazelle Qbase 2.1 utilizando como fator normalizador primeiro o gene endógeno e depois a média do próprio gene.	56
Tabela 8: Amostras que tiveram dispersão maior em cada um dos genes.	60
Tabela 9: Teste t não paramétrico. Realizado pelo Software REST by QIAGEN utilizando os valores da tabela 7.	64
Tabela 10: Valores de referência estatística das amostras leucêmicas utilizadas. ..	65
Tabela 11: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de <i>c-myc</i>	67
Tabela 12: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de <i>klf4</i>	68
Tabela 13: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de <i>oct4</i>	68
Tabela 14: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de <i>sox2</i>	69

Tabela 15: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de *notch3*.70

Tabela 16: Valores médios de CTs obtidos nas reações de PCR em tempo real.....97

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

ATCC – *American Type Culture Collection*

ACTB – Beta actina (β -Actina)

°C – Graus Celsius

cDNA – DNA complementar

c-myc – *Myelocytomatosis oncogene c*

CO₂ – Dióxido de Carbono

CT – *Cycle threshold*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMEM – *Eagle's Minimum Essential Medium*

Falcon – Tubo cônico

FS/UnB – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCC1954 – Linhagem de carcinoma ductal mamário

HeLa – Linhagem de adenocarcinoma de Colo do Útero

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Kb – kilobases

Klf4 – *Kruppel-like factor 4*

LLA – Leucemia Linfóide Aguda

M – molar

μ L – microlitro

MDA-MB-468 – Linhagem de adenocarcinoma mamário humano

mg – miligrama

mL – mililitro

min – minutos

MPT – modificações pós-traducionais

mRNA – RNA mensageiro

nm – nanômetro

NOPH – Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica

NT2 – Ntera2 – linhagem de células embrionárias de seres humanos

Oct4 – *POU class 5 homeobox 1*

pb – pares de base

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

Pellet – centrifugado

qPCR – PCR em tempo real

REH – Linhagem de Leucemia Linfóide Aguda

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – rotações por minuto

RPMI – *RPMI 1640 Medium*

RQ – Quantificação relativa

SES-DF – Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal

SFB – Soro fetal bovino

SKBR3 – Linhagem de adenocarcinoma mamário humano

Sox2 – *SRY(sex determining region Y)-box 2*

TBE – Tampão tris-borato EDTA

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UnB – Universidade de Brasília

Δ CT – Diferença entre o CT médio do gene alvo normatizado e oCT médio de um gene endógeno

$\Delta\Delta$ CT – Δ CT da amostra de interesse calibrado com o Δ CT de uma amostra controle

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 – Câncer e sua Epidemiologia	19
1.2 – Leucemias	20
1.2.1 - Leucemia Linfóide Aguda	22
1.3 – Células Tronco Tumorais	25
1.4 - Fatores de Yamanaka	28
1.4.1 – <i>c-myc</i>	30
1.4.2 – <i>klf4</i>	31
1.4.3 – <i>oct4</i>	32
1.4.4 – <i>sox2</i>	34
1.5 - <i>notch3</i>	35
2. OBJETIVOS	37
2.1 – Objetivo Geral	37
2.2 – Objetivos Específicos	37
3. MÉTODOS	38
3.1 – Cultura de Células	38
3.1.1 – Descongelamento de Células de Mamíferos	38
3.1.2 – Cultivo de Células	39
3.1.2.1 – Cultivo de Células Aderentes	39
3.1.2.2 – Passagem de Células Aderentes	39
3.1.2.3 – Cultivo de Células Não Aderentes	40
3.1.2.4 – Passagem de Células Não Aderentes	40
3.2 – Seleção de Pacientes	41
3.2.1 – Critérios de Inclusão e Exclusão no Grupo de Estudo	41
3.3 – Coleta das Amostras	42
3.4 – Caracterização das Amostras	43
3.5 – Extração de RNA	43
3.5.1 – Extração de RNA de Linhagens Celulares por Trizol®	43
3.5.2 – Extração de RNA de Aspirado de Medula Óssea de Pacientes por Ficoll-Hipaque®	45
3.5.3 – Quantificação de RNA	45
3.5.4 – Eletroforese de RNA em Gel de Agarose	46

3.6 – Síntese de cDNA	46
3.7 – Análise da qualidade da síntese de cDNA	47
3.7.1 – Reação de PCR semi-quantitativo	47
3.7.2 – Análise Qualitativa em Gel de Agarose	49
3.8 – Análise da Expressão Gênica por PCR em Tempo Real	49
3.9 – Análises Estatísticas dos dados de PCR em Tempo Real	50
3.10 – Considerações Éticas	51
4. RESULTADOS	52
4.1 – Perfil dos Pacientes.....	52
4.2 – Obtenção do Material Genético	53
4.3 – Análise da qualidade do cDNA	53
4.4 – Eficiência dos ensaios de PCR em Tempo Real	55
4.5 – Expressão dos genes alvo por PCR em Tempo Real	56
4.6 – Quantificação da expressão por Gráficos de Dispersão	58
4.7 – Análise da expressão dos genes alvo nas amostras de pacientes leucêmicos comparadas com a expressão na amostra controle	61
4.8 – Classificação das Amostras em Grupos de Expressão	65
4.9 – Associação da hiperexpressão dos genes alvo com a taxa global de sobrevida	65
4.10 – Correlação da expressão dos genes alvo com Parâmetros prognósticos	67
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÃO	76
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
8. ANEXOS	93
8.1 – ANEXO I – Aprovação CEP 555/11	93
8.2 – ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	94
8.3 – ANEXO III – Tabela com valores médios de CTs obtidos por PCR em tempo real.	97

1. INTRODUÇÃO

1.1 – CÂNCER E SUA EPIDEMIOLOGIA

O câncer é caracterizado pelo crescimento desordenado de células, geralmente mutadas e/ou com alterações epigenéticas, que se multiplicam nos diversos tecidos e órgãos. Algumas vezes, elas podem se espalhar pelo organismo e colonizar tecidos distantes, gerando assim, metástases. Mesmo que o organismo possua mecanismos de defesa, as células cancerígenas conseguem contornar, de alguma maneira, o seu equilíbrio homeostático para exercer sua principal função: multiplicar-se⁽¹⁻⁴⁾.

O termo “câncer” é empregado no sentido de descrever tumores com características malignas (invasivos e metastáticos), já que esses também podem ser classificados como benignos, que são os tumores localizados e não invasivos^(4, 5). O câncer também tem sido considerado uma doença crônico-degenerativa que apresenta desenvolvimento prolongado e progressivo, e no intuito de combater o desenvolvimento dessa doença, deve-se interferir em algum dos seus estágios para que o crescimento desordenado das células seja contido. A dificuldade dessa intervenção é que além de haver mais de cem tipos já identificados de câncer, as células que se encontram nesse crescimento desordenado podem ter diferentes aspectos etiológicos e diversos tipos de manifestações clínicas, o que dificulta a identificação exata de onde intervir em cada tipo de neoplasia⁽⁶⁻⁸⁾. Atualmente, as metástases são consideradas o principal “calcanhar de Aquiles” no tratamento do câncer e são responsáveis por grande fração dos óbitos por ela determinados⁽⁵⁾. Mesmo com essa problemática, o câncer é considerado a doença crônica com o maior potencial de cura se detectado precocemente⁽⁹⁾.

Atualmente, o câncer se traduz em um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. Ele representa a segunda maior causa de morte depois das doenças cardiovasculares^(10,12). As estatísticas mundiais mostram que, no ano 2008, cerca de 7,6 milhões de pessoas morreram por essa causa, quase 13% de todas as mortes ocorridas. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que em 2030 a mortalidade ocasionada pelo câncer aumentará para 13,1 milhões de pessoas e que 75 milhões de pessoas estarão vivendo acometidas pela doença^(10, 11).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2013 indicam cerca de 518.510 novos casos de câncer no país e se excluídos os casos de câncer de pele não melanoma estima-se um total de 385 mil novos casos. Para o sexo feminino são estimados 260.640 novos casos, sendo que o tipo mais comum e frequente é o câncer de mama (53 mil novos casos). Para o sexo masculino são esperados 257.870 novos casos, sendo o tipo com maior incidência o câncer de próstata (60 mil novos casos)⁽¹²⁾. Em relação ao câncer infanto-juvenil, abaixo de 19 anos, a incidência está entre 2% e 3% de todos os casos de câncer diagnosticados no país. Para o biênio 2008/09 o INCA previa cerca de 9.890 casos por ano em crianças e adolescentes com até 18 anos de idade, sendo que o tipo com maior incidência são as leucemias⁽¹³⁾.

O aumento da incidência de tumores e conseqüentemente da mortalidade associada a essa doença é decorrente de vários motivos. A modificação demográfica como a redução das taxas de mortalidade e o aumento da taxa de natalidade, indicam o prolongamento da expectativa de vida e, conseqüentemente, o envelhecimento populacional, levando ao aumento da incidência de doenças crônico-degenerativas, como as cardiovasculares e o câncer. No entanto, outras causas podem ser observadas como a exposição dos indivíduos a fatores de risco para o aparecimento de novas neoplasias. A falta de tempo e de hábitos saudáveis, aliados às condições de trabalho estressantes e a má alimentação podem gerar reflexos importantes no perfil epidemiológico da população⁽¹⁴⁾. A análise global desses fatores permite estabelecer relações entre questões clínicas e moleculares, e, entre essas questões e os tipos de câncer a elas relacionados⁽¹⁵⁾.

1.2– LEUCEMIAS

A leucemia corresponde a um câncer com origem na medula óssea, comprometendo principalmente a série branca do sangue e, conseqüentemente, o sistema imunológico dos pacientes acometidos por ela. Elas representam 2,04% dos casos de neoplasia no Brasil e estima-se que, em 2013, surjam 4.570 novos casos de leucemia em homens e 3.940 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de cinco casos novos a cada 100 mil homens e quatro a cada 100 mil mulheres⁽¹²⁾.

Quando em situação normal, a medula óssea dá origem a células sanguíneas derivadas de uma célula tronco comum multipotente que se diferencia basicamente em três tipos celulares: as plaquetas, as células vermelhas e as células brancas (Figura 1).

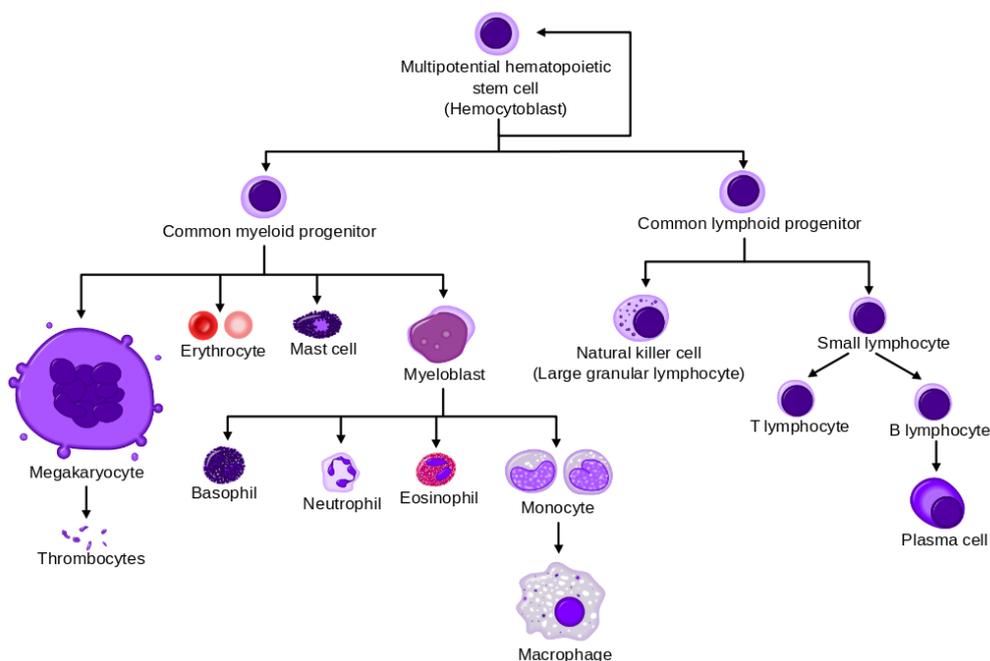


Figura 1: Processo normal de hematopoiese originando os três tipos celulares básicos. (Lodish, Molecular Cell Biology, 2003).

As etapas de proliferação e de diferenciação dessas células no processo de hematopoiese são estritamente controladas pelo microambiente indutivo, em função da produção de glicoproteínas solúveis, citocinas, que controlam as mitoses e a diferenciação celular^(16,17). O micro ambiente necessário para essa diferenciação celular conta com: presença de fatores de crescimento responsáveis pelo estímulo à proliferação e à diferenciação das células imaturas; atividade funcional das células maduras; acomodação das células em desenvolvimento; interações entre células de diferentes tipos, e entre as células e o microambiente. A regulação da hematopoiese ocorre pela secreção dos fatores de crescimento e pelas interações célula-célula e célula-estroma medular⁽¹⁸⁾.

Quando em situação de leucemia, a medula óssea produz uma quantidade exagerada de precursores hematopoiéticos anormais que geralmente comprometem a série branca do sangue e, conseqüentemente, o sistema imunológico dos portadores. O microambiente celular nessas condições também é diferenciado e os

componentes presentes no estroma normal tornam-se desregulados na presença de células tumorigênicas, favorecendo a sobrevivência das mesmas, a progressão da doença e a resistência a drogas quimioterápicas. Alterações nos fatores de crescimento liberados no estroma medular podem modular o ambiente favorecendo a proliferação, diferenciação e maturação desordenada de blastos leucêmicos, inclusive inibindo apoptose^(19 – 22).

As leucemias estão classificadas em subgrupos de acordo com características clínicas e patológicas, que resultam em tratamentos diferenciados para cada um deles. A primeira subdivisão está em suas formas aguda e crônica. A forma aguda caracteriza-se por aumento muito rápido do número de células imaturas doentes e impossibilita a medula de reproduzir células sanguíneas saudáveis. Na forma crônica, a principal característica é um aumento no número de células maduras anormais da série branca do sangue, levando meses ou até anos para progredir e por isso é mais frequentemente encontrada em pessoas mais velhas. As leucemias podem ser subdivididas também em relação ao tipo celular afetado, os mieloblastos (leucemias mielóides) ou os linfoblastos (leucemias linfóides)^(18,19, 23).

As principais causas para o desenvolvimento da leucemia no indivíduo ainda não são bem esclarecidas, mas a exposição à radiação ionizante, medicamentos utilizados em quimioterapia e exposição ocupacional ao benzeno podem ser fatores de risco bastante importantes. Embora as leucemias sejam doenças de acometimento sistêmico, se diagnosticadas precocemente e se houver acesso ao tratamento, a sobrevida relativa em cinco anos pode chegar a 80%⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

1.2.1 – Leucemia Linfóide Aguda

Dentre os tipos existentes, a Leucemia Linfóide Aguda (LLA) é uma doença que atinge principalmente os leucócitos e representa o mais grave e mais comum câncer infantil, correspondendo a aproximadamente 80% dos casos de leucemia na infância. Essa doença, como mencionado anteriormente, é caracterizada pela produção de leucócitos malignos e imaturos pela medula. O pico de incidência da doença é registrado na faixa etária de 2 a 5 anos, apresentando maior frequência em pacientes do sexo masculino^(24,25).

Hoje existem três formas de classificar a doença de acordo com sua gravidade. A primeira delas é a classificação FAB (*French, American, British*) que foi instituída na década de 1970. Baseia-se exclusivamente na análise dos aspectos morfológicos e citoquímicos das células malignas e pode ser subdividida em: L1, que detém 25 a 30% dos casos com presença predominante de linfoblastos pequenos, com núcleo regular e cromatina homogênea; L2, que representa a maior parte dos casos (70%) apresentando linfoblastos grandes, com núcleo irregular e cromatina heterogênea; e L3 que representa o menor percentual de casos e se apresenta com linfoblastos de tamanhos médios e citoplasma com características hiperbasofílicas e presença de vacúolos⁽²⁶⁾. A segunda forma de classificação foi proposta pela OMS, é a mais completa, mais utilizada e baseia-se em dados de imunofenótipo, cariótipo e biologia molecular, permitindo a classificação de acordo com a linhagem B, T ou NK (que é um tipo muito raro na infância) e com a presença ou ausência de translocações⁽²⁷⁾. Por fim, a terceira forma de classificação é a EGIL (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) que tem como base os imunofenótipos celulares e por isso permite a diferenciação em subtipos imunológicos podendo classificar a linhagem celular em B ou T e, além disso, caracterizar o estágio maturativo dessas células⁽²⁸⁾.

Os sintomas observados quando há acometimento por LLA, são pouco específicos e podem incorrer em fadiga e fraqueza decorrentes de anemia, febre e/ou outros sintomas de infecção, perda de peso e/ou de apetite, sangramentos, dores nas articulações e ossos, linfonodomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia. O diagnóstico da LLA é feito basicamente por exame físico e exames laboratoriais. Os principais exames utilizados para diagnosticar a LLA são o Hemograma, Imunofenotipagem, Cariótipo e Análise da presença de Translocações. O Hemograma mostra, na maioria dos casos (90%), linfoblastos no sangue periférico, presença de anemia e trombocitopenia em graus variados e hiperleucocitose em cerca de 16% dos casos. A imunofenotipagem consiste em diferenciar se o linfoblasto tem origem em células B ou células T. Já o exame de cariótipo é realizado para detecção de alterações cromossômicas que podem ser confirmadas por análises para a presença de translocações por PCR convencional.

Os principais fatores prognósticos analisados quando se acredita que haja o acometimento por LLA são a leucometria, características citogenéticas,

imunofenotipagem em B ou T e em CD10+ ou CD10-, cariótipo e biologia molecular para detecção de alterações cromossômicas como translocações previamente observadas em LLA: t(12;21), t(1;19), t(9;22); t(4:11).

Utilizando esses fatores prognósticos, o Grupo Brasileiro para Tratamento da Leucemia Linfóide na Infância (GBTLI-93), divide os pacientes com LLA em três grupos de risco. O Risco Básico Verdadeiro (RBV) inclui pacientes com idade entre um e dez anos, leucometria inicial menor que $10.000/\text{mm}^3$, hepato-esplenomegalia inferior a 5 cm do rebordo costal, ausência de massa mediastinal e de envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) pela doença. O Risco Básico (RB) inclui pacientes com idade entre um e dez anos, contagem leucocitária inicial entre $10.000/\text{mm}^3$ e $50.000/\text{mm}^3$, presença de massa mediastinal, fígado e/ou baço com aumento superior a 5 cm do rebordo costal. O grupo de Alto Risco inclui os pacientes com menos de um ano e mais de dez anos, leucometria inicial maior que $50.000/\text{mm}^3$ e/ou envolvimento do SNC. Além desses critérios, pacientes com imunofenótipo T e/ou achados desfavoráveis na citogenética (hipodiploidia, pseudodiploidia) são enquadrados também no grupo de alto risco⁽²⁹⁾.

A LLA é uma doença que têm sua progressão acelerada e por isso a introdução de um tratamento é sempre urgente para garantir uma resposta eficaz do organismo. Os tratamentos geralmente utilizados são a poliquimioterapia e a radioterapia, geralmente associados, mas que podem também ser utilizados separadamente. Normalmente, os tratamentos consistem em três fases. A primeira é a fase de indução que dura em média trinta dias e tem como objetivo a remissão citológica da medula, recuperação medular com precursores normais e proteção de doenças no sistema nervoso central (SNC). A segunda fase é a de consolidação (ou intensificação) que tem como foco a eliminação da doença residual mínima e também a proteção contra doenças do SNC. A terceira fase é a de manutenção. É a mais longa de todas levando de um ano e meio a dois anos e visa à manutenção da remissão de células leucêmicas. No que se refere à LLA, nessa fase também se faz o combate a doenças do SNC. Dessa forma o tratamento leva em torno de dois anos e meio. Em alguns casos, como quando o paciente não responde ao tratamento, ou quando ele se encaixa no grupo de alto risco, pode ser necessário o transplante de medula óssea^(25, 29).

Nas últimas quatro décadas, a taxa de sobrevivência de pacientes com LLA aumentou consideravelmente, de 10% nos anos 1960 para 80% na atualidade, mostrando grande avanço no tratamento da doença^(25,30). A melhora do prognóstico deve-se à descoberta precoce da doença e da utilização de medicamentos quimioterápicos com ação antileucêmica eficaz, possibilitando assim o maior controle da doença^(23,31). O conhecimento do funcionamento da célula leucêmica foi elemento fundamental para o desenvolvimento dos medicamentos utilizados no tratamento e para a determinação da duração e da intensidade de cada etapa do tratamento⁽³¹⁾.

Por se tratar de uma doença na maioria das vezes de origem não conhecida, muitas pesquisas foram desenvolvidas ao longo dos anos para aprimorar os métodos diagnósticos, os tratamentos e aumentar a taxa de sobrevivência.

1.3 – CÉLULAS TRONCO TUMORAIS

Nos últimos anos houve muitos avanços no âmbito de pesquisas realizadas com câncer em geral. O conhecimento gerado delimitou o arcabouço utilizado como base para que Hanahan e Weinberg propusessem, em 2000, uma teoria simplificada sobre o desenvolvimento dessa doença. Eles indicaram os *hallmarks* do câncer que são seis capacidades biológicas adquiridas durante as várias etapas do desenvolvimento de tumores humanos⁽¹⁾ (Figura 2).



Figura 2: As seis características adquiridas do câncer propostas por Hanahan e Weinberg em 2000 (com adaptações).

Os *hallmarks* se constituem em um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica e são assim classificados: 1) manutenção da sinalização proliferativa, levando à proliferação crônica e desenfreada das células cancerígenas; 2) inibição de supressores de crescimento; 3) resistência à morte celular; 4) imortalidade replicativa; 5) indução da angiogênese; 6) ativação de invasão e metástase, que ocorre em tumores malignos⁽¹⁾.

Uma forma promissora de estudo para melhora de diagnósticos e consequentemente de prognósticos para essa doença está na pesquisa com as células-tronco (CT) tumorais, ou mais comumente chamadas de células iniciadoras de tumor (CITs). São denominadas assim por possuírem características funcionais similares às de células-tronco normais como potencial ilimitado de replicação, capacidade de divisão assimétrica, ou seja, dar origem a uma célula idêntica à célula mãe e a outra célula diferenciada, e resistência à apoptose⁽³²⁻³⁴⁾. A maioria dos tumores é composta por população heterogênea de células, da qual uma pequena subpopulação possui capacidade de dar origem a um novo tumor^(32,33).

As CITs possuem mecanismos que protegem a célula tumoral da terapia citotóxica padrão utilizado atualmente. Foi demonstrado que as CITs são responsáveis pela resistência à terapêutica no câncer pancreático⁽³⁴⁻³⁸⁾, glioblastoma^(34,39,40) e demonstram também mecanismos similares de resistência no câncer de cólon^(34,41,42). Em alguns casos, essas CITs parecem apresentar expressão aumentada dos canais de exclusão de medicamentos e xenobióticos. Além disso, foi observada a presença de CITs em vários outros tipos de tumores como o cancer de mama^(34,43,44), próstata^(34,45,46), pulmão^(34,47,48), cabeça e pescoço^(34,49), fígado^(34,50,51) e melanoma^(34,52,53). Assim, parece razoável concluir que essas CITs representam uma ameaça significativa, por sua resistência aos tratamentos tradicionais⁽³⁴⁾.

De acordo com o modelo de progressão do câncer, são necessários distintos eventos como mutações para que uma célula normal se torne maligna⁽³²⁾. Devido ao seu ciclo de vida estendido, as células-tronco representariam o alvo mais provável para o acúmulo dessas alterações genéticas de cariótipo. Com o estudo dessas células pode-se avaliar a expressão de determinados genes, já descritos para células-tronco normais, que desempenham funções na sobrevivência, proliferação, metástase, recaída pós-tratamento, etc. Esses genes, em situação de tumor, devem

apresentar expressão por vezes semelhante e por vezes diferenciada da situação normal e a confirmação dessa hipótese pode levar ao desenvolvimento de uma terapêutica mais eficiente para essa patologia⁽³³⁾.

A hipótese de origem de cânceres a partir de CITs modifica a abordagem conceitual da oncogênese e pode ter implicações para a prevenção, detecção e tratamento da leucemia, especialmente nos tipos muito graves em que as drogas quimioterápicas não conseguem atuar nas células comprometidas.

No caso das leucemias, um único subconjunto de células têm a capacidade de se auto-renovar, dar origem a uma prole celular mais indiferenciada a fim de manter o tumor a longo prazo⁽⁵⁴⁾. A existência dessas CITs em leucemias foi demonstrada pela primeira vez em Leucemia Mielóide Aguda e subsequentemente mostrou-se que as CITs nos casos de LMA compreendem uma subpopulação de células que expressam vários marcadores celulares de superfície comuns com células tronco hematopoéticas normais e com outras células tronco leucêmicas específicas⁽⁵⁵⁻⁵⁸⁾.

Já na leucemia linfóide aguda, LLA, a idéia de CITs é menos clara e pouco descrita. Alguns estudos já descreveram que a presença de subpopulações de células com fenótipos primitivos em amostras clínicas de LLA é bastante frequente^(59,60). Contudo, também tem sido sugerido que a propagação da LLA pode dar-se em situações mais difusas de forma que sua organização hierárquica seja menos rigorosa do que na LMA⁽⁶⁰⁾. Além disso, ainda não se sabe ao certo se as CITs leucêmicas surgem a partir de células tronco de tecidos diversos mutadas, a partir de células linfóides precursoras alteradas ou a partir de células diferenciadas, que podem sofrer desdiferenciação e readquirir uma progeração similar à de células primitivas. A principal linha de pensamento aponta para que a origem seja em células linfóides precursoras comprometidas^(23, 59-61).

Assim, estipula-se que na LLA, independente do total de células tumorais, o número de CITs é variável e por isso a dificuldade em estabelecer um padrão para a quantificação e influência da mesma no tumor. Retomando a ideia de que essas células têm capacidades semelhantes à de células-tronco normais, é bastante coerente a avaliação da expressão dos genes relacionados a células tronco embrionárias já que a análise da expressão desses genes pode ser fundamental para a elucidação de vias que regulam a renovação e diferenciação de CITs

leucêmicas e esclarecimento de mecanismos como a resistência aos químicos utilizados nos tratamentos tradicionais. Em teoria, se apenas um subconjunto relativamente pequeno de células é capaz de gerar tumores *in vivo*, estas células deveriam representar o alvo terapêutico mais crucial⁽⁶⁰⁻⁶⁴⁾.

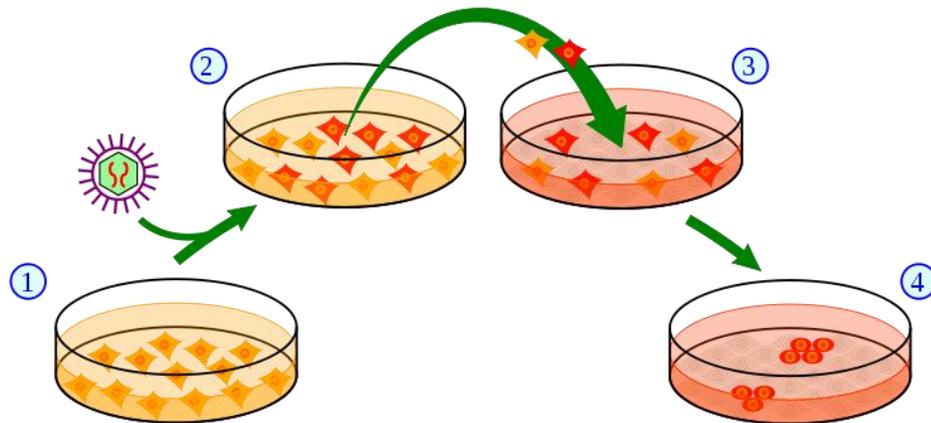
1.4 – FATORES DE YAMANAKA

Alguns genes capazes de conferir pluripotência celular já foram descritos na literatura^(65,66). Em 2006, o grupo de Yamanaka da Universidade de Kyoto - Japão, isolou quatro genes essenciais para a produção de células tronco pluripotentes, *oct3/4*, *sox2*, *klf4* e *c-myc*. Eles utilizaram retrovírus para ativar a expressão desses genes em fibroblastos de ratos e utilizaram antibiótico Fbx15+ para selecionar as células que expressaram esses genes, no entanto, essa linhagem celular não conseguiu produzir quimeras viáveis quando injetadas em embriões em desenvolvimento⁽⁶⁷⁾. Em 2007, esse mesmo grupo, juntamente com outros dois grupos de Harvard e da Universidade da Califórnia, mostraram a reprogramação de fibroblastos de camundongos em células pluripotente induzidas (iPSC) viáveis⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾. Como se sabe, *c-myc* é um forte proto-oncogene e, talvez por isso, 20% dos camundongos quiméricos tenham desenvolvido câncer. Em estudo posterior, Yamanaka relatou que, embora a desdiferenciação seja mais lenta e menos eficiente, iPSCs podem ser criadas sem *c-myc*⁽⁷¹⁾.

O grupo de Yamanaka reportou, em 2007, que a expressão ectópica dos genes *sox2*, *oct4*, *klf4* e *c-myc* foi capaz de induzir a desdiferenciação de fibroblastos humanos da pele. Com um sistema retroviral, a expressão ectópica desses genes foi estimulada, e as células transfectadas foram tratadas com mitomicina C e posteriormente foram incubadas em meio de cultura para células tronco de primatas suplementado com fator de crescimento de fibroblastos (bFGF). No trigésimo dia as células pluripotentes induzidas foram isoladas e colocadas em nova cultura com as mesmas características anteriormente citadas e foi observado uma proliferação dessas células mantendo as características de pluripotência incluindo a morfologia, a proliferação, a dependência de alimentação, os marcadores de superfície, a expressão dos genes, as atividades do promotor, as atividades da telomerase, a diferenciação *in vitro* e formação de teratomas (Figura 3). Mais interessante, quando devidamente estimulados, esses mesmos fibroblastos foram

capazes de dar origem a diversos tipos celulares, como cardiomiócitos, adipócitos, entre outros⁽⁶⁵⁾.

A)



B)

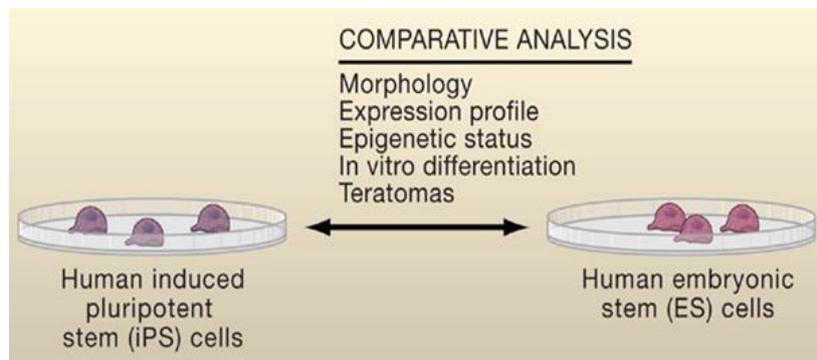


Figura 3: A) Esquema da desdiferenciação de fibroblastos em células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). (1) Isolamento e cultura de fibroblastos. (2) Transfecção dos genes por meio de vetores virais. Células vermelhas indicam que as células que expressam os genes exógenos (*c-myc*, *sox2*, *oct4* e *klf4*). (3) Passagem das células para meio de cultura de ESCs. (4) Seleção do subconjunto de células com características de pluripotência. B) Análises comparativas para verificar a eficiência da indução da pluripotência nessas células⁽⁶⁵⁾.

Todos esses fatores de transcrição (*c-myc*, *oct4*, *klf4* e *sox2*), são mais comumente expressos na fase embrionária onde a proliferação celular e mitoses subsequentes acontecem em maior número de vezes e mais rapidamente. É interessante notar que outros trabalhos demonstraram que variações de combinações dos genes utilizados pelo grupo de Yamanaka também foram capazes de conferir pluripotência a células humanas já diferenciadas⁽⁷²⁻⁷⁵⁾.

Alguns estudos mostraram que leucemias linfóides, mais especificamente as do tipo T, apresentaram expressão elevada de um desses fatores, o *oct4*, com mesmo perfil de transcrição que em células tronco⁽⁷⁶⁾. Por isso, verifica-se a existência de uma porta de oportunidades para o estudo desses genes relacionados à LLA e buscando alvos moleculares específicos para melhores diagnósticos e, subsequentemente, melhores formas de tratamento da doença.

1.4.1 – C-MYC

O gene *c-myc* codifica um fator de transcrição que possui a estrutura tridimensional que inclui um domínio bHLH/LZ (*basic helix-loop-helix leucina zipper*). A proteína Myc pode se ligar ao DNA através do seu domínio bHLH. No genoma humano, *c-myc* está localizado no cromossomo 8 e acredita-se que ele seja responsável pela regulação de cerca de 15% de todos os genes por meio de ligações em seqüência de *E-boxes* ou do recrutamento de histonas acetiltransferases. Ele é membro da família MYC de proto-oncogenes da qual fazem parte também o *L-myc*, *N-myc* e *V-myc*^(77,78).

O *c-myc* é ativado através da via MAPK/ERK. Ao modificar a expressão de seus genes-alvo, o resultado se dá por inúmeros efeitos biológicos como a capacidade de aumentar a proliferação celular por meio do aumento da expressão das ciclinas e da diminuição da expressão da p21 que é uma das proteínas responsáveis pela manutenção do ciclo celular. Além disso, o *c-myc* desempenha papel muito importante na regulação do crescimento celular e na apoptose quando atua na diminuição da expressão de *bcl-2*^(4, 79).

O grupo de Yamanaka demonstrou que *c-myc* está diretamente envolvido na reprogramação de células humanas adultas em IPS. No entanto, o uso de elementos da família "MYC" na indução de IPS é preocupante já que, sendo o *c-myc* um proto-oncogene, a elevada expressão do mesmo pode gerar teratomas letais^(65,71).

Em situações de câncer, o *c-myc* frequentemente aparece superexpresso e como ele está envolvido na expressão de outros genes, essa superexpressão pode resultar na desregulação da expressão de vários deles. Alguns desses genes, como a *ciclina D* e o *bcl-2* podem estar envolvidos na proliferação celular, e se desregulados podem, como consequência, resultar na formação de tumores. Assim,

o *c-myc* pode ser classificado como um forte proto-oncogene. Uma translocação comum envolvendo *c-myc* em seres humanos é a t(8, 14), que é crítica para o desenvolvimento da maioria dos casos de linfoma de Burkitt. Alterações na expressão de *c-myc* foram encontradas em carcinoma do colo do útero, do cólon, de mama, de pulmão e de estômago⁽⁷⁹⁾.

Um estudo, com fins de elucidar o efeito de *c-myc* em vários tipos de câncer, apontou que houve maior indução na tumorigênese em camundongos transgênicos que superexpressavam *c-myc* em diversos tecidos, confirmando assim a característica de proto-oncogene do *c-myc*. Além disso, a inativação da enzima ativadora de SUMO (SAE1/SAE2) na presença de *c-myc* implica em catástrofe mitótica ou morte celular em células cancerosas e por isso os inibidores de sumoilação podem ser um possível tratamento para o câncer relacionado à hiperexpressão de *c-myc*⁽⁸⁰⁾.

O aumento de *c-myc* implica ainda na proliferação de células B e, por esse motivo, pode estar relacionado a Leucemias de células B diretamente ou por um mecanismo indireto relacionado com a p27⁽⁸¹⁾.

1.4.2 – KLF4

O gene *klf4* é responsável por codificar a proteína “*Kruppel-like factor 4*” em células tronco embrionárias. Ele faz parte da família KLF que possui no total 17 membros (*klf1* a *klf17*). Cada membro da família tem um conjunto característico de três dedos de zinco na sua extremidade “carboxi-terminal” que reconhecem essencialmente três partes de bases do DNA. Os domínios funcionais (amino-terminais) dos genes da família KLF ficam na extremidade contrária à extremidade dos dedos de zinco. A compreensão da estrutura e função dos membros da família KLF possibilita a criação de fatores de transcrição artificiais. Dedos de zinco artificiais podem ser construídos para reconhecer sítios escolhidos no DNA e domínios funcionais artificiais podem ser adicionados para ativar ou reprimir genes em diversos ambientes celulares^(77, 82, 83).

Diferentes membros da família KLF são expressos em diferentes tecidos. O *klf1* é expresso apenas em células vermelhas do sangue dirigindo a diferenciação de células vermelhas e reprimindo a formação de megacariócitos⁽⁸⁴⁾. Outros KLFs são

mais amplamente expressos e há interações entre os membros da família. *Klf3*, por exemplo, é acionado por *klf1* bem como *klf8*⁽⁸⁵⁾. Por outro lado, *klf3* reprime *klf8*. Tal regulação cruzada ocorre amplamente em famílias de fatores de transcrição. O *klf2* tem papel na expressão do gene da globina, assim como *klf3*⁽⁸⁶⁾. O *klf3* também tem papéis na formação dos adipócitos e em linfócitos B. Recentemente, foi mostrado que o *klf3* é importante no desenvolvimento do coração. *Klf5*, como *klf3*, é importante na formação de adipócitos⁽⁸⁷⁾ e *klf6* é um importante gene supressor de tumor, que é frequentemente mutado no câncer da próstata⁽⁸⁸⁾.

O *klf4* (originalmente Gut KLF) é um gene importante no desenvolvimento do intestino e da pele. Mais recentemente demonstrou ser um bom indicador das características de células tronco embrionárias totipotentes e também em células pluripotentes induzidas⁽⁶⁵⁾.

Alguns estudos reportaram que esse agente possui ligação direta com a proteína de ligação CREB⁽⁸⁹⁾. Foi mostrado, ainda, que esse fator de transcrição, *klf4*, está presente em uma subunidade enzimática da telomerase (TERT) e quando forma um complexo com a β -catenina, propicia a expressão da telomerase. No entanto, se não houver a formação do complexo o *klf4* é insuficiente para estimular a expressão da TERT⁽⁹⁰⁾.

Os fatores de transcrição *oct4* (descrito asseguir) e *klf4* são essenciais para a manutenção da auto-renovação e do estado indiferenciado de células tronco embrionárias. Além disso, esses mesmos genes são fundamentais para a reprogramação de células pluripotente induzidas (iPS). Quando expressos, esses genes promovem a desdiferenciação de uma célula adulta diferenciada em uma célula pluripotente^(65, 91).

1.4.3 – OCT4

Oct4, ou “*octamer-binding transcription factor 4*”, é conhecido também como POU5F1 (domínio POU, classe 5), e é uma proteína que, em humanos é codificada pelo gene POU5F1. Membros da família OCT, os genes *oct1*, *oct2* e *oct3/4* possuem um domínio POU pelo qual eles se ligam ao DNA^(77,92). O domínio POU é um domínio bipartido composto por duas subunidades. A subunidade amino-terminal é conhecida como domínio específico de POU e a subunidade carboxi-terminal como

um domínio “homeobox”⁽⁹³⁾. Os vários membros da família POU têm ampla variedade de funções geralmente relacionadas à função do sistema neuroendócrino⁽⁹⁴⁾ e o desenvolvimento dos organismos⁽⁹⁵⁾.

Membro da família OCT, o *oct4* está fortemente envolvido na auto-renovação das células tronco embrionárias e por esse motivo muitas vezes é utilizado como marcador molecular de células indiferenciadas. Sua expressão pode variar de hiperexpressa a hipoexpressa, mas independente disso haverá alteração na bioquímica celular, fato que torna o estudo desse gene/proteína promissor⁽⁹⁶⁾.

A expressão o *oct4* começa ainda na fase de pré-implantação uterina do zigoto e permanece durante toda a fase embrionária. Além disso, a expressão desse gene está associada com um fenótipo indiferenciado em tumores⁽⁹⁷⁾. Quando há baixa expressão desse gene, ocorre a indução da diferenciação celular e a alta expressão contribui para a manutenção do estado de indiferenciação celular⁽⁹⁸⁾. Niwa e colaboradores propuseram que a expressão de *oct4* deve ser exata para manter a característica de auto-renovação das células tronco e qualquer alteração na expressão, para mais ou para menos, induz a regulação de programas de desenvolvimento diferentes⁽⁹⁷⁾. Boiani e Scholer mostraram que o “*knockout*” total da expressão de *oct4* em camungongos tem efeito deletério, ou seja, promove a morte do embrião antes mesmo da formação do trofoblasto⁽⁹⁹⁾.

Os fatores de transcrição *oct4* e *sox2* parecem contribuir conjuntamente para a manutenção da auto-renovação e do estado indiferenciado de células tronco embrionárias. O *oct4* pode formar um heterodímero com *sox2* de modo que estas duas proteínas se ligam ao DNA juntas⁽⁶⁹⁾. Além disso, o *oct4* juntamente com *sox2*, *klf4* e *c-myc* são utilizados para criar células pluripotente induzidas (iPSCs). Quando expressos conjuntamente, esses genes promovem a desdiferenciação de uma célula adulta diferenciada em uma célula pluripotente⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Mais tarde mostrou-se que apenas o *oct4* e o *klf4* eram fundamentais para proporcionar essa reprogramação e, posteriormente, foi constatado que apenas o *oct4* era efetivamente necessário para essa reprogramação^(91, 103).

Devido a essas características, o *oct4* tem sido relacionado à tumorigênese de células tronco adultas. Estudos recentes revelaram que a expressão ectópica de *oct4* em camundongos adultos resulta na formação de lesões displásicas da pele e do intestino⁽¹⁰⁴⁾.

1.4.4 – SOX2

Sox2 é um fator de transcrição fundamental para a manutenção da pluripotência em células tronco embrionárias indiferenciadas. Pertence à família SOX cujos membros desempenham papéis importantes em diversas fases do desenvolvimento de mamíferos⁽⁷⁷⁾. Essa família possui domínios de ligação ao DNA conhecidos como HMG-box. Esse domínio de ligação é altamente conservado em espécies eucarióticas. Há cerca de vinte genes da família SOX presentes em humanos e camundongos, e oito genes presentes em *Drosophila*. Quase todos eles mostram pelo menos 50% de similaridade entre eles. A família é dividida em sub-grupos de acordo com a homologia no domínio HMG e outros motivos estruturais, bem como de acordo com características funcionais⁽¹⁰⁵⁾.

Membro da família SOX, o *sox2* pode formar complexos com outros genes para contribuir com a rede do complexo molecular para manter a condição de célula tronco⁽¹⁰⁶⁾. Ele se liga ao *oct4* cooperativamente para então se ligarem ao DNA, o que ativa fatores de transcrição chaves para manutenção da pluripotência⁽¹⁰⁷⁾. Como foi mostrado que essa regulação pode ocorrer sem a presença do *sox2*, concluiu-se que o papel do *sox2* é o de controlar a expressão do *oct4*⁽⁶⁸⁾.

Como descrito acima, descobriu-se que, em conjugação com *oct4*, *c-myc* e *klf4*, o *sox2* poderia reprogramar as células transformando-as em células pluripotente induzidas^(65, 67). A perda da pluripotência é regulada por hipermetilação de alguns sítios de ligação de *sox2* e *oct4* nas células germinativas e repressão pós-transcricional de *sox2* por miR134^(108,109). Sox2 tem um papel fundamental na manutenção de células tronco embrionárias e neurais e é uma grande promessa em pesquisa envolvendo pluripotência induzida, um campo emergente e promissor da medicina regenerativa⁽¹¹⁰⁾.

No que diz respeito ao câncer, *sox2* se mostra envolvido em vários tipos como o cancer de pulmão, de pele, de cólon e de próstata⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾. Estudos em camundongos mostraram que em condições normais, a expressão de *sox2* é específica para a manutenção da condição de auto-renovação e proporção de células basais no epitélio traqueal adulto. No entanto, a sua hiperexpressão dá origem a extensa e hiperplasia epitelial, eventualmente, carcinoma no pulmão . A sua super expressão também está ligada à migração celular e ao crescimento independente de ancoragem⁽¹¹⁴⁾.

O fator inibidor de leucemia (LIF) pode ativar *sox2* dentro da célula, a jusante da via de sinalização JAK-STAT, e gerar uma ativação subsequente de *klf4*, *oct4* e *nanog* que podem, então, vir a regular positivamente a transcrição de todas as proteínas relacionadas à pluripotência na LIF⁽¹¹⁵⁾. Por isso, considera-se importante a pesquisa desse gene em leucemias podendo vê-lo como possível marcador molecular para prognóstico e, posteriormente, um bom alvo terapêutico.

1.5 – NOTCH3

Notch3 é um gene responsável pela codificação da proteína “*Neurogenic locus notch homolog protein 3*”⁽⁷⁷⁾.

A Família NOTCH está presente desde os metazoários até os mamíferos e possui quatro membros, *notch1*, *notch2*, *notch3* e *notch4*⁽¹¹⁶⁾. O receptor notch é uma proteína transmembrana de via única e sua sinalização promove proliferação celular durante a neurogênese. A atividade de notch é inibida por Numb para promover a diferenciação neural⁽¹¹⁷⁾.

Os genes da família NOTCH estão envolvidos em mecanismos de regulação de genes que controlam vários processos de diferenciação celular durante a vida embrionária e adulta⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾. Além disso, estão envolvidos em diversos outros processos no organismo, entre os quais podemos destacar: determinação do destino celular de células tronco mamárias em várias fases do desenvolvimento⁽¹²¹⁾, mecanismos não nucleares, tais como o controle do citoesqueleto de actina mediante a tirosina quinase Abl⁽¹²²⁾, expansão do compartimento de células tronco hematopoiéticas, durante o desenvolvimento dos ossos e de participação no comprometimento com a linhagem osteoblástica, sugerindo um papel terapêutico potencial para o entalhe na regeneração do osso e da osteoporose⁽¹²³⁾, envolvimento com precursores comuns da linhagem linfóide T⁽¹²⁴⁾.

A sinalização de notch se encontra desregulada em muitos tipos de câncer. Mutações em *notch3* foram identificados como a causa subjacente da arteriopatia cerebral autossômica dominante com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL)⁽¹²⁵⁾. Mutações em *notch3* também foram identificados em indivíduos com doença de Alzheimer⁽¹²⁶⁾.

Estudos mostraram que alterações na expressão de membros da família NOTCH estão relacionados com situações de Leucemia. A inibição da sinalização de membros da família NOTCH tem mostrado efeitos anti-proliferativos de células T em cultura de células e em modelos xenobióticos^(127,128).

Em 1988, Joutel e Tournier-Lasserre mostraram que LLA de células T estão relacionadas com mutações em *notch1*^(125,129). Mais tarde, em 2002, Bellavia e colaboradores mostraram que a elevada expressão de *notch3* é fator importante para a leucemogênese de células T⁽¹³⁰⁾. Essa proposta foi ratificada por Nagel e colaboradores em 2009, mostrando que a baixa sinalização de *notch3* diminui a sinalização de MSX2 que conseqüentemente reduz o desenvolvimento das células T, e por Ghisi e colaboradores em 2011. A redução da expressão de *notch3* em células T tem efeitos adversos na sua proliferação e sobrevivência e por isso acredita-se que a inibição da expressão de *notch3* pode resultar em uma potente atividade antitumoral em pacientes com LLA de células T⁽¹³¹⁻¹³³⁾.

Apesar de os membros da família NOTCH estarem mais frequentemente relacionados com leucemias de células T, foi também descrito que quando as moléculas da família NOTCH são neutralizadas, há diminuição significativa na sobrevivência das células do tipo B de LLA. A inibição da expressão de *notch3* e *notch4* resultou em um aumento significativo na morte de células leucêmicas do tipo B por apoptose, mostrando mais uma vez que esse gene pode ser um alvo promissor no tratamento da LLA⁽¹³⁴⁾.

2. OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão dos genes relacionados à primitividade em células mononucleares de medula óssea de crianças portadoras de Leucemia Linfóide Aguda – LLA.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i. Identificar a expressão dos genes *notch3*, *c-myc*, *klf4*, *oct4* e *sox2* em linhagens celulares (NT2, MDA-MB-468, HCC1954, SKBR3 e HELA) para obtenção de controles positivos para as análises moleculares das amostras coletadas.

ii. Realizar a análise da expressão dos genes *notch3*, *c-myc*, *klf4*, *oct4* e *sox2*, relacionados à pluripotência em linhagens celulares leucêmicas e em células mononucleares de portadores de LLA atendidos no Hospital da Criança de Brasília José Alencar – DF.

iii. Correlacionar os níveis de expressão gênica com os dados clínicos obtidos como histórico familiar, condições clínicas e fisiológicas, e fatores prognósticos já estabelecidos.

3. MÉTODOS

3.1 – CULTURA DE CÉLULAS

Para a padronização das análises moleculares utilizou-se RNA extraído de diversas linhagens celulares conforme descrito a seguir.

O material genético (mRNA) das seguintes linhagens celulares foi utilizado neste trabalho: cDNAs totais de MDA-MB-468, SKBR3 e HCC1954 gentilmente cedidas pela Dra. Ana Maria Camargo Aranha (Instituto Ludwig para pesquisas sobre o câncer – São Paulo); HeLa, cedida pela Dra. Marie Togashi (Laboratório de Farmacologia Molecular, UnB); cDNA total de NT2 cedido pelo professor Rodrigo Alexandre Panepucci do Laboratório de Hematologia da Universidade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; e REH cedida pelo Dr. Luis Henrique Sakamoto do Hospital da Criança José Alencar – Brasília (Tabela 1).

Tabela 1: Linhagens Celulares utilizadas no desenvolvimento e padronização das análises moleculares.

Linhagem	Descrição/Origem	Aderente/Não aderente	Meio de Cultivo
MDA-MB-468	Adenocarcinoma Mamário	Aderente	DMEM
HCC1954	Carcinoma Ductal	Aderente	RPMI
SKBR3	Adenocarcinoma Mamário	Aderente	DMEM
HeLa	Adenocarcinoma do Colo do Útero	Aderente	EMEM
REH	Leucemia Linfóide Aguda	Não Aderente	RPMI

3.1.1 – Descongelamento de Células de Mamíferos

As linhagens celulares previamente aliquotadas e armazenadas em criotubos em nitrogênio líquido foram reavivadas para o início da cultura. Duas alíquotas foram

retiradas do nitrogênio líquido e levadas imediatamente para o banho-maria, sendo ali incubadas até a liquefação da solução. O conteúdo foi então transferido para um tubo *falcon* (cônico) de 15mL, onde, gota a gota, foram acrescentados 5mL de meio apropriado para o tipo celular (DMEM, RPMI ou EMEM, acrescido de soro e antibióticos conforme descrito abaixo). A amostra foi centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi cuidadosamente aspirado, o centrifugado (*pellet*) contendo as células foi ressuspenso em 5mL de meio e as mesmas colocadas em placa de *petri* para cultura de tecidos de 10 cm diâmetro, ou em garrafas de poliestireno para cultura de células em um total de 10mL. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.1.2 – Cultivo de Células

3.1.2.1 – Cultivo de Células Aderentes

As linhagens de câncer de mama MDA-MB-468 e SKBR3 foram cultivadas em placas de cultura para células aderentes de 10 cm de diâmetro com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Sigma, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com 10% de SFB (Bovine Calf Sera, GibcoTM, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. A linhagem HCC1954 foi também cultivada em placas de cultura para células aderentes de 10 cm de diâmetro com meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 - Sigma, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com 10% de SFB (Fetal Bovine Serum, Gibco[®], Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Por fim, a linhagem HeLa de Adenocarcinoma de Colo do Útero foi cultivada em placas de cultura para células aderentes de 10 cm de diâmetro com meio de cultura EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium - Sigma, St. Louis, Missouri, USA) suplementado com 10% de SFB (Bovine Calf Sera, Gibco[®], Invitrogen Corporation, Burlington, Canada), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Todas as células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.1.2.2 – Passagem de Células Aderentes

Para a passagem das células aderentes o meio de cultura foi inicialmente aspirado da placa e procedeu-se a uma lavagem com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X. O PBS foi posteriormente aspirado adicionando-se 1mL de

tripsina, cuja concentração foi de 0,05% ou 0,25%, dependendo do tipo celular. As células foram incubadas em tripsina por 1 minuto a 37°C, ou até que tivessem se soltado das placas, conforme verificado em microscópio óptico invertido. Foram colocados 8mL de meio completo adequado para cada tipo celular, para retardar o processo de tripsinização das células. Essas foram ressuspensas, transferidas para um tubo *falcon* de 15mL, e centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e o *pellet* foi ressuspensado em 10mL de meio de cultura. Após este procedimento transferiu-se a quantidade desejada de células (passagem 1:3 a 1:5 dependendo da linhagem) para as placas de cultura e o volume final foi completado até 10mL de meio completo. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.1.2.3 – Cultivo de Células Não Aderentes

As células procedentes de linhagem leucêmica (REH) foram cultivadas em garrafas de poliestireno para cultura de células (Falcon, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) contendo meio de cultura RPMI (RPMI-medium 1640 / Sigma, St. Louis, Missouri, USA), suplementado com 10% de SBF (Bovine Calf Sera, Gibco™, Invitrogen Corporation, Burlington, Canada), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram incubadas inicialmente em uma concentração de 3 a 10 x 10⁵ células/mL a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO₂.

3.1.2.4 – Passagem de Células Não Aderentes

Para a passagem de células não aderentes, o meio contendo as células em suspensão foi transferido para um tubo *falcon* de 15mL, e centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e o *pellet* foi ressuspensado em 10mL de meio de cultura. Após este procedimento transferiu-se um volume escolhido com a quantidade desejada de células para as garrafas de cultura e o volume final foi completado até 10mL de meio de cultura completo. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.2 – SELEÇÃO DE PACIENTES

As amostras aqui utilizadas foram provenientes de pacientes atendidos no Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica (NOHP) da Secretaria de Estado de Saúde do DF (SES-DF) no Hospital da Criança de Brasília José Alencar. O Hospital da Criança de Brasília (HCB) é um polo de referência em atenção especializada de média e alta complexidade para crianças e adolescentes com câncer, com idade entre 29 dias a 18 anos. Recebe pacientes do Distrito Federal e, também, de outras regiões do país, procedentes de municípios dos estados de Goiás, Minas Gerais, Tocantins e Bahia. O HCB atende exclusivamente pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e é gerido pelo Instituto do Câncer Infantil e Pediatria Especializada (CIPE).

Todos os pacientes participantes da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) por meio de seus representantes legais, os quais foram esclarecidos antes do uso das amostras neste estudo. Para a formação do grupo experimental, foram coletadas amostras de pacientes com diagnóstico positivo de leucemia linfóide aguda, além dos critérios de inclusão mencionados abaixo. Para a formação do grupo controle, foi utilizada amostra de um paciente com idade cronológica próxima à dos pacientes no grupo de estudo, entre um e nove anos, porém com o diagnóstico negativo para leucemia.

3.2.1 – Critérios de Inclusão e Exclusão para o Grupo de Estudo

Algumas características foram selecionadas como critérios de inclusão para os pacientes no estudo como:

- Ter menos de 18 anos de idade
- Ter diagnóstico recente de leucemia linfóide aguda por método citológico e imunofenotípico
- Estar em acompanhamento e tratamento no Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica da SES/DF
- Assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Anexo II), por meio de seus responsáveis legais.

Além disso, algumas características foram selecionadas como fatores limitantes para a participação do paciente no projeto, ou seja, fatores de exclusão, aqui enumerados:

- Recusa em participar do estudo
- Não apresentar, ao diagnóstico, amostra de medula óssea suficiente para o estudo.

3.3 – COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras foram coletadas no Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica (NOHP) da Secretaria de Estado de Saúde do DF (SES-DF) no Hospital da Criança de Brasília José Alencar, por profissionais habilitados dessas instituições sempre acompanhados de um membro da equipe do projeto. Todos os procedimentos relativos à coleta de amostras fazem parte da rotina de realização do diagnóstico.

O aspirado de medula óssea para o diagnóstico foi obtido através de punção da crista ilíaca póstero-superior, sob anestesia local, com agulha apropriada. Esse procedimento é realizado rotineiramente no NOHP para diagnóstico citológico, imunofenotípico, citogenético e pesquisa de translocações moleculares clássicas. A amostra coletada da medula óssea foi separada em diversas partes, a serem utilizadas para testes laboratoriais e de análise diagnóstica, descritos a seguir. Parte da medula óssea serviu para confecção de esfregaço em lâmina de vidro para citologia, parte (cerca de 2mL) foi armazenada em tubo estéril com EDTA para imunofenotipagem, parte (cerca de 5mL) foi armazenada em seringa com heparina para estudo citogenético convencional e parte (cerca de 5mL) foi armazenada em tubo estéril com EDTA para estudo molecular.

A amostra não neoplásica foi obtida por meio do aspirado de medula óssea de um paciente que teve a coleta de material indicado por outras suspeitas diagnósticas (por exemplo, púrpura trombocitopênica imune) para a qual não se confirmou o diagnóstico de leucemia (por exemplo, neutropenia por quadro infeccioso).

Após a separação do material necessário para os exames clínicos e laboratoriais, realizados em todos os pacientes ali atendidos e tratados, as amostras de pacientes voluntários foram utilizadas nos experimentos aqui delineados. O material coletado foi transportado para o Laboratório de Patologia Molecular do Câncer da FS/UnB, onde ficou armazenado no freezer a -80°C para posterior realização dos experimentos propostos.

3.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a análise de expressão gênica diferencial foram utilizadas amostras de 43 pacientes com Leucemia Linfóide Aguda – LLA (18 meninas com média de idade de 7,44 anos, sendo a mínima um ano e a máxima 14 anos; e 25 meninos com média de idade = 6,64, sendo a mínima dois meses ou 0,166 ano e a máxima 17 anos) e um paciente controle com idade similar à dos pacientes com LLA, entre um e nove anos de idade, e com diagnóstico negativo para leucemia de qualquer tipo.

Todas as amostras foram classificadas de acordo com as características prognósticas pré-determinadas como descrito a seguir:

- Leucometria: Menor que 50.000 ou maior que 50.000 por mm^3
- Imunofenotipagem: Pró-B; Pré-B ou T-ALL
- Translocações: Ausente; t(12:21); t(1:19); t(4:11) ou t(9:22)
- Grupos de Risco: Alto Risco e Baixo Risco (GBTLI-93)

3.5 – EXTRAÇÃO DE RNA

3.5.1 – *Extração de RNA de Linhagem Celular por Trizol®*

A extração de RNA das células em cultura foi realizada com o reagente Trizol®, segundo especificações do fabricante (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O meio de cultura das placas de cultura de 10 cm de diâmetro contendo as células foi descartado e as placas foram lavadas com PBS 1X por duas vezes. Foi adicionado o trizol às placas de cultura de acordo com a confluência celular (3mL para uma confluência de 70-80%) e as células foram incubadas em temperatura ambiente por 1 a 2 minutos para promover a lise das células.

As células foram ressuspensas passando o trizol pela placa várias vezes para garantir que as células se soltassem completamente. Esse lisado foi transferido para um ou mais microtubos de centrífuga livres de RNase de acordo com a quantidade de trizol previamente adicionado, sendo que cada microtubo deveria conter um volume máximo de 1mL de lisado. Incubou-se o lisado à temperatura ambiente por 5 minutos.

Ao final da incubação, foram adicionados 200µl de clorofórmio por mL de trizol utilizado. Os microtubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 2 a 3 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos a 4°C.

Ao final da centrifugação, formaram-se três fases: uma rosa na parte inferior, uma branca no meio e uma fase aquosa na parte superior. A parte aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo microtubo livre de RNase. Foi adicionado 0,5mL de álcool isopropílico à porção aquosa, e a solução foi misturada por inversão do tubo por quatro vezes. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por dez minutos e ao final desse tempo, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C.

O sobrenadante foi removido e o *pellet* foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado. Após a adição do etanol, a solução foi misturada e centrifugada a 14.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Essa lavagem foi repetida mais duas vezes para garantir maior pureza do material.

Ao final, o sobrenadante foi removido e o *pellet* contendo o RNA foi seco em temperatura ambiente. Depois de quase totalmente seco (cerca de 80%) o *pellet* foi ressuspendido em 30 – 60µl de água bi-destilada, de-ionizada e livre de RNase, de acordo com o tamanho final do *pellet*. Foram retirados 2µl para quantificação e a amostra foi imediatamente armazenada no freezer a -80°C no laboratório de Patologia Molecular do Câncer – UnB. A quantificação foi realizada em aparelho de espectrofotometria (NanoVue PlusTM, código 28-9560-58, GE Healthcare), a 260nm. Para determinar o grau de pureza da amostra, a absorbância a 260nm e 280nm também foi medida.

3.5.2 – *Extração de RNA de Aspirado de Medula Óssea de Pacientes por Ficoll-Hipaque®*

A solução de gradiente de Ficoll-Hipaque foi previamente obtida conforme descrito a seguir. Em um tubo de ensaio de vidro com tampa rosqueável livre de RNase foram colocados 2mL de Ficoll-Hipaque. Procedeu-se à centrifugação do tubo a 3000 rpm por 5 minutos.

Ao final da centrifugação, foram colocadas as amostras de medula em EDTA (3-5mL) sobre a camada de Ficoll no tubo de ensaio, tomando-se cuidado para não desfazer a camada de Ficoll. A amostra depositada sobre o Ficoll foi centrifugada a 8000 rpm por 20 minutos em temperatura ambiente.

Formaram-se quatro camadas distintas, com o acúmulo de hemácias no fundo do tubo, seguido por uma camada inferior de Ficoll, outra intermediária com as células mononucleares e a mais superior de plasma. As células mononucleares foram cuidadosamente retiradas para não serem contaminadas com nenhuma das outras duas fases e colocadas em microtubos de centrífuga livres de RNase. Completou-se o tubo até 1,5mL com PBS 1X gelado e a solução foi centrifugada em temperatura ambiente a 5000 rpm por 5 minutos.

O sobrenadante resultante da centrifugação foi retirado cuidadosamente e posteriormente foi acrescentado ao tubo 300, 600 ou 1000µL de trizol a depender do tamanho do pellet obtido.

A partir desse momento, procedeu-se à extração do material genético de acordo com o protocolo de extração por trizol conforme descrito anteriormente.

3.5.3 – *Quantificação de RNA*

A quantificação do RNA foi feita para medir a quantidade e pureza do material extraído utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue Plus™, código 28-9560-58 – GE Healthcare para, posteriormente, permitir a síntese eficiente de cDNA. Para ser utilizado neste estudo, o RNA extraído deveria estar em quantidade superior a 1µg/µL e com índice de pureza entre 1,8 e 2,0, sendo a pureza medida pela razão das absorvâncias obtidas a 260nm e 280nm (A260/A280).

3.5.4 – Eletroforese de RNA em Gel de Agarose

A fim de verificar a integridade do RNA extraído das amostras, o RNA total obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose. O gel de agarose foi preparado na concentração de 1,5%. Assim, para cada 100 ml de TBE 1X (Tris-HCL a 45mM, ácido bórico a 45mM e EDTA a 1mM pH=8,0), adicionou-se 1,5g de agarose e 4µl de brometo de etídio (10mg/mL) para corar as amostras. As amostras foram preparadas de forma a gerar um volume final de 12µL, contendo 2µg do RNA extraído e 2µL de tampão de carregamento (Azul de Bromofenol 6X). A cuba de eletroforese foi preenchida com tampão de corrida (TBE 1X) até cobrir todo o gel. As amostras foram aplicadas nos poços do gel e a corrente elétrica foi ligada de modo que as amostras “migrassem” do polo negativo para o positivo a 120V e 80mA durante 15 minutos em cuba de eletroforese horizontal (OWL Easycast™ B2 – Thermo Scientific). Como resultado, foi observada a presença de duas bandas de RNA ribossomal, no fotodocumentador (Traniluminador L-PIX Touch – Loccus Biotecnologia). A garantia da qualidade do material extraído foi inspecionada por meio da apresentação dessas duas bandas, sendo a banda mais pesada (28S) o dobro mais forte que a banda mais leve (18S).

3.6 – SÍNTESE DE cDNA

Para a realização da síntese de cDNA foi feito um “Master mix” contendo todos os reagentes do kit utilizado (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Ao final da preparação do “Master mix”, o volume de 10µL, necessário para cada reação, foi retirado e transferido para um novo tubo previamente identificado ao qual foram adicionados 10µL de amostra (4µg de RNA) nos respectivos tubos. De forma análoga, para os controles negativos, foi feito o mesmo “Master mix” excluindo-se, nesse caso, a Transcriptase Reversa (RT). Foi feito também um segundo controle da reação que consiste em um tubo com o “Master mix”, porém sem o RNA.

A tabela 2 mostra as quantidades dos reagentes utilizados.

Tabela 2: Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados na síntese de cDNA.

Reagentes	Reação para 1 tubo
10 x RT Buffer	2µl
2x dNTP	0,8µl
10x Randon Primer	2µl
RNAse Inibitor	1µl
RT	1µl
H ₂ O MilliQ	3,2µl
Amostra	10µl
Total	20µl

A amostra de RNA utilizada deveria ter um total de 4µg de RNA. Dessa forma, deveria ser utilizada uma quantidade de RNA em µL que, ao ser completado com água bi-destilada, de-ionizada e livre de RNAse para atingir 10µL de amostra, perfizesse um total de 4µg.

A síntese de cDNA foi feita no termociclador Veriti® Thermal Cycler da Applied Biosystems. A síntese foi realizada conforme as especificações do fabricante: 10 minutos a 25°C, seguidos de 12º minutos a 37°C, 5 minutos a 80°C e terminando com estabilização a 4°C por tempo indeterminado.

Ao final da ciclagem, as amostras foram guardadas a -20°C no laboratório de Patologia Molecular do Câncer da Universidade de Brasília – UnB.

3.7 – ANÁLISE DA QUALIDADE DA SÍNTESE DE cDNA

3.7.1 Reação de PCR semi-quantitativo

A reação de amplificação foi feita com as amostras de cDNA obtidas tanto com o mix completo quanto com o mix sem RT e o mix sem RNA (Tabela 3).

Tabela 3: Mix para reação de PCR.

Reagentes	1 tubo
Tampão 10X (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl)	1µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,2µL
dNTPs (10 mM)	0,2µL
Taq DNA Polimerase (5 U/mL)	0,2µL
Primer F (10 mM)	0,2µL
Primer R (10 mM)	0,2µL
H ₂ O MilliQ	7,2µL
Total	9,2µL

Os reagentes descritos na tabela acima foram inicialmente misturados em um tubo para serem em seguida, dispensados nos tubos previamente identificados (9,0µL em cada) e, posteriormente, adicionando-se 1µL do cDNA em cada um desses tubos. As reações foram levadas para o termociclador (Veriti® Thermal Cycler – Applied Biosystems) e a amplificação foi realizada com o programa descrito abaixo utilizando os primers descritos na tabela 4.

Todos os primers utilizados, exceto o de ACBT foram retirados do artigo do grupo de Yamanaka⁽⁶⁵⁾. O primer de *ACTB* foi desenhado utilizando o software Primer-BLAST do site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela 4: Sequência dos iniciadores direto e reverso utilizados na análise de expressão gênica por PCR.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse
<i>ACTB</i>	GGACTTCGAGCAAGAGATGG	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>notch3</i>	TGTGGACGAGTGCTCTATCG	AATGTCCACCTCGCAATAGC
<i>c-myc</i>	GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC	TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG
<i>klf4</i>	ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC	TGTGTGGGTTTCGCAGGTGTGC
<i>oct4</i>	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC
<i>sox2</i>	F1 – GAGCAACGGCAGCTACAGCATGA F2 – GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG	R1 – TAGCGGTGCATGGGCTGCAT R2 – TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG

O programa utilizado no termociclador para os primers de *ACTB* foi o descrito a seguir:

- 1) 94°C = 2 minutos
 - 2) 94°C = 30 segundos
 - 3) 60°C = 30 segundos
 - 4) 72°C = 30 segundos
 - 5) 72°C = 1 minuto
 - 6) 4°C = ∞
- } 32 ciclos

O programa utilizado para os demais genes foi:

- 1) 94°C = 2 minutos
 - 2) 94°C = 30 segundos
 - 3) 61°C = 30 segundos
 - 4) 72°C = 30 segundos
 - 5) 72°C = 1 minuto
 - 6) 4°C = ∞
- } 32 ciclos

3.7.2 Análise Qualitativa em Gel de Agarose

O produto final da PCR foi analisado qualitativamente em gel de agarose, como descrito no subitem 3.5.4. Ao produto total final da PCR (10 μ L) Foram adicionados 2 μ L de tampão de carregamento (Azul de Bromofenol 6X). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal de eletroforese (OWL EasyCast™ B2 – Thermo Scientific), a 100V.

Ao final da corrida, o gel foi analisado no fotodocumentador (Transiluminador L-PIX Touch – Loccus Biotecnologia) sob luz UV e observou-se a presença ou ausência de bandas bem como se essas estão no tamanho esperado e/ou se há contaminação aparente.

3.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Para verificação da expressão dos genes *notch3*, *c-myc*, *klf4*, *oct4* e *sox2*, as amostras foram submetidas à técnica de PCR em tempo real. A abordagem que foi empregada é o sistema TaqMan®, que utiliza a atividade exonuclease 5' – 3' da enzima DNA polimerase e a construção de sondas de oligonucleotídeos marcados, que emitem um sinal de fluorescência somente quando clivada, baseado no princípio de transferência de energia ressonante por fluorescência (FRET). Foram adquiridos os ensaios ID Hs99999903_m1 para *ACTB*, Hs01128541_m1 para *notch3*, Hs001153402_m1 para *c-myc*, Hs00358836_m1 para *klf4*, Hs01895061_u1 para *oct4* e Hs01053049_m1 para *sox2* (Applied Biosystems - AB). A eficiência de amplificação dos ensaios foi verificada por diluição seriada, utilizando cDNA da linhagem MCF7 para o gene Sox2 e de HeLa para os demais genes.

As curvas de amplificação foram utilizadas para determinar a linha de *Threshold* ideal de cada ensaio. Para uma reação, utilizou-se 3,5 μ L de água bi-distilada de-ionizada e livre de RNase, 5 μ L de TaqMan® Universal MasterMix (Applied Biosystems), 0,5 μ L do ensaio de iniciadores e sondas (AB) e 1 μ L de amostra (previamente diluída de forma que o CT para *ACTB* ficasse em posição intermediária (cerca de 26 ciclos) totalizando 10 μ L de volume final). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, em triplicata para cada gene e os ciclos foram determinados automaticamente pelo programa do StepOnePlus™ (Applied

Biosystems; *Holding stage*: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C).

Os valores de expressão gênica são expressos com razões entre o gene de interesse e o gene usado como controle endógeno, que fornece o fator de normalização para a quantidade de RNA isolado a partir de uma amostra e, subsequentemente, calibrada com o valor dos controles (nível de expressão relativa).

3.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS DE PCR EM TEMPO REAL

Os resultados da análise de PCR em tempo real foram determinados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ sendo que o CT representa o ciclo da reação de PCR em que a amplificação do produto entra na fase exponencial. O ΔCT representa a diferença entre o CT para o gene analisado comparado com o gene de referência ou controle constitutivo, o qual serve como base para normalizar a quantidade de mRNA total entre as amostras. O $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra do paciente leucêmico já normalizado pelo gene constitutivo e o ΔCT da amostra controle.

O software Biogazelle Qbase 2.1 foi utilizado para esses cálculos relativos à expressão dos genes. O método QBASE foi utilizado para análise da expressão relativa do mRNA dos genes alvo utilizando a *ACTB* como referência para a normalização dos dados.

O programa SPSS 17.0 (Statistical Package for Social Science) foi utilizado para a realização das análises estatísticas envolvendo dados clínicos. As estatísticas descritivas foram usadas para resumir dados do estudo. A significância estatística foi definida como um valor de $p < 0,05$ que representa uma confiabilidade de 95% da análise. As comparações entre as variáveis clínico-demográficas e os perfis de expressão gênica foram realizadas utilizando-se os testes de Fisher ou Qui-Quadrado. Para realização desses testes utilizou-se o software SPSS Statistics, versão 17 para Windows e Mac.

Foi utilizado o teste de Kaplan-Meier para estimar as curvas de sobrevida e os dados de sobrevivência foram divididos entre vivos e não vivos na última observação. O Kaplan-Meier consiste em dividir o tempo de seguimento em

intervalos. Este método calcula a sobrevivência cada vez que um paciente morre. É o método mais usado para esse fim. O teste de log-rank foi utilizado para avaliar a significância estatística para os resultados obtidos com o teste de Kaplan-Meier.

3.10 – CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FS/UnB e aprovado sob o número 555/11 (Anexo I). A aprovação foi baseada na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, e foi iniciado apenas após sua aprovação. Todos os pacientes ou seus representantes legais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE (Anexo II) concordando em participar do presente estudo.

4 – RESULTADOS

4.1 – PERFIL DOS PACIENTES

As características clínicas dos pacientes incluídos no presente estudo encontram-se resumidas na tabela 5. Elas se apresentaram condizentes com as características reportadas em outros estudos que utilizaram amostras de populações distintas da aqui analisada.

Tabela 5: Características dos pacientes no momento do diagnóstico.

Característica	N (%)
Total	43
Sexo	
Meninos	25 (58,1%)
Meninas	18 (41,9%)
Idade	
< 1 ano	1 (2,3%)
1-9 anos	27 (62,8%)
> 10 anos	15 (34,9%)
WBC (por mL)	
< 50,000	22 (51,17%)
> 50,000	21 (48,83%)
Imunologia	
Pró-B	1 (2,3%)
Pré-B/comum	36 (83,7%)
T-ALL	6 (14%)
Grupo de Risco	
Alto	11 (25,6%)
Baixo	32 (74,4%)
Translocações Recorrentes	
Sem translocações procuradas	24 (55,9%)
t(12;21)	13 (30,2%)
t(1;19)	4 (9,3%)
t(9;22)	1 (2,3%)
t(4;11)	1 (2,3%)
Status da medula no D15 do tratamento	
< 5% blastos	25 (58,2%)
5-25% blastos	15 (34,9%)
> 25% blastos	3 (6,9%)
Status da medula no D29 do tratamento	
< 5% blastos	39 (90,7%)
5-25% blastos	4 (9,3%)
> 25% blastos	0 (0%)

Como apresentado na tabela 5, houve maior frequência de meninos do que de meninas. A maioria dos pacientes, 62,8% tinha idade entre um e nove anos e

praticamente metade deles tinha menos que 50.000 leucócitos no sangue periférico no momento do diagnóstico. O fenótipo pré-B foi o mais comum e de acordo com os critérios GBTLI-93, 74,4% dos pacientes foram classificados no grupo de baixo risco. A t(12; 21) TEL-AML1 foi o achado cromossômico mais frequente. Mais de 91% dos pacientes obtiveram remissão da medula óssea no dia 29 (D29) de tratamento.

4.2 – OBTENÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO

Foi obtida quantidade significativa de RNA extraído das linhagens celulares previamente selecionadas e das amostras coletadas de pacientes acometidos com leucemia linfóide aguda de acordo com a tabela anteriormente mencionada. A garantia da qualidade do material extraído foi inspecionada por meio da apresentação de duas bandas, sendo a banda mais pesada (28S) o dobro mais forte que a banda mais leve (18S). Todas as amostras possuíam quantidade superior a 1µg/µL de RNA e pureza entre 1,8 e 2,0 quando observada a razão entre a absorbância de 260nm e 280nm. Além disso, o gel não apresentou rastros abaixo das bandas de RNA ribossomal, pois esses indicam degradação do material, e nem acima delas que representam contaminação de DNA genômico, o que poderia comprometer resultados futuros. Dessa forma, o RNA utilizado no estudo apresentou bandas bem definidas e sem rastros. O RNA dessas amostras encontrava-se íntegro como mostrado na (figura 4). Todas as amostras de linhagens celulares apresentaram RNA semelhante ao da figura 4(A) e as amostras de pacientes apresentaram RNA semelhante ao da figura 4(B).

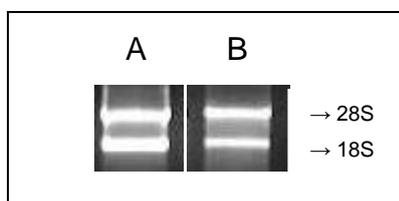


Figura 4: Avaliação da integridade do RNA extraído de linhagem HeLa (A) e amostra clínica (B).

4.3 – ANÁLISE DA QUALIDADE DO cDNA

O produto da PCR realizada com os genes constitutivos e com as linhagens foi submetido a eletroforese e a qualidade do material extraído e posteriormente sintetizado foi confirmada com a amplificação de bandas (Figura 5).

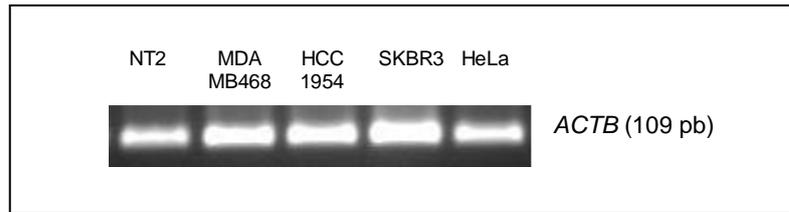


Figura 5: Amplificação do gene endógeno *ACTB* a partir de cDNA sintetizado das linhagens celulares NT2, MDA-MB-468, HCC1954, SKBR3 e HeLa . Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

Posteriormente foi confirmada a amplificação dos genes alvo nas amostras de linhagens como observado na figura 6, o que possibilitou a utilização das mesmas como controle positivo nas análises de PCR em tempo real. Não foi observada amplificação para o gene *sox2* e baseado na literatura escolheu-se usar a linhagem MCF7 como controle para esse gene.

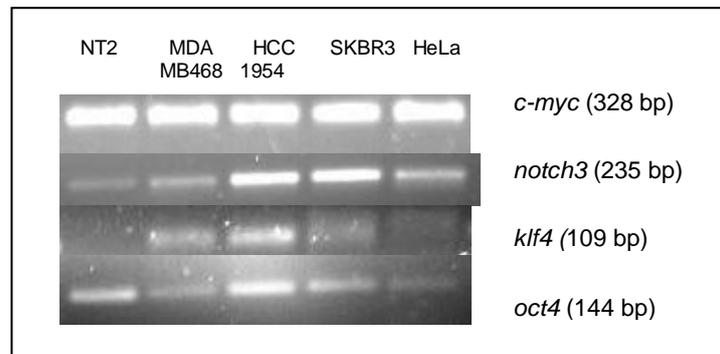


Figura 6: Expressão dos genes alvo (*c-myc*, *notch3*, *klf4* e *oct4*) utilizando os cDNAs das linhagens celulares selecionadas. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo.

O produto da PCR feita com o gene *ACTB* e com as amostras de pacientes foi submetido à eletroforese para verificar a qualidade da extração de RNA e da síntese de cDNA (figura 7). A amplificação do gene *ACTB* foi observada, ainda que em níveis distintos, em todas as amostras analisadas.

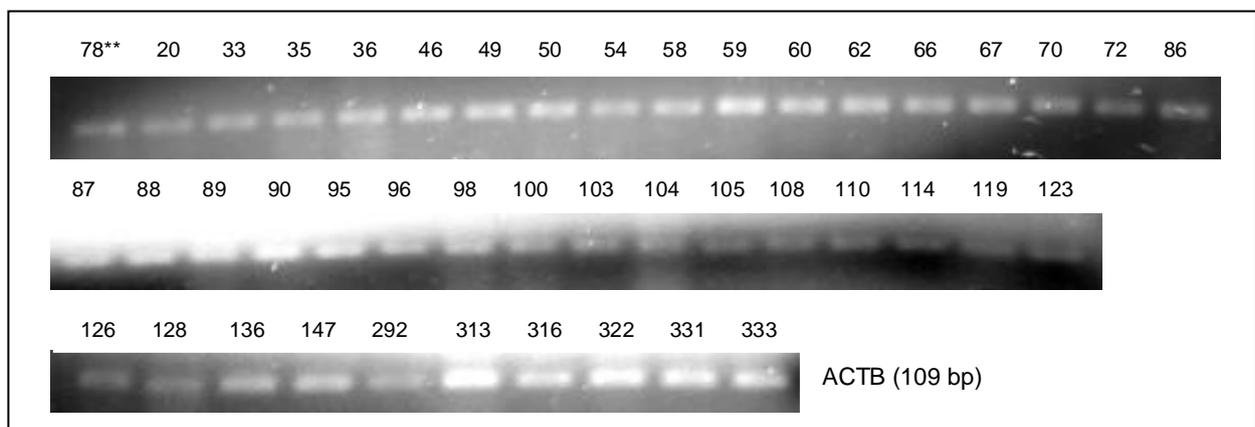


Figura 7: Amplificação de *ACTB* a partir do cDNA de amostras clínicas. Eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídeo. Cada número representa a amostra de um paciente.

4.4 – EFICIÊNCIA DOS ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL

Para garantir que a eficiência da amplificação dos ensaios TaqMan fossem iguais ou superiores a 90%, amostras de cDNA de linhagens de células foram diluídas em série de 5 pontos (1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000). Para os genes *ACTB*, *notch3*, *c-myc*, *klf4* e *oct4*, foi utilizada na padronização a linhagem HeLa, conforme resultado previamente observado, e para o gene *sox2* foi utilizada a linhagem MCF7 de acordo com dados reportados na literatura mostrando que essa linhagem expressa esse gene (Figura 8). Os valores obtidos na padronização se encontram na tabela 6.

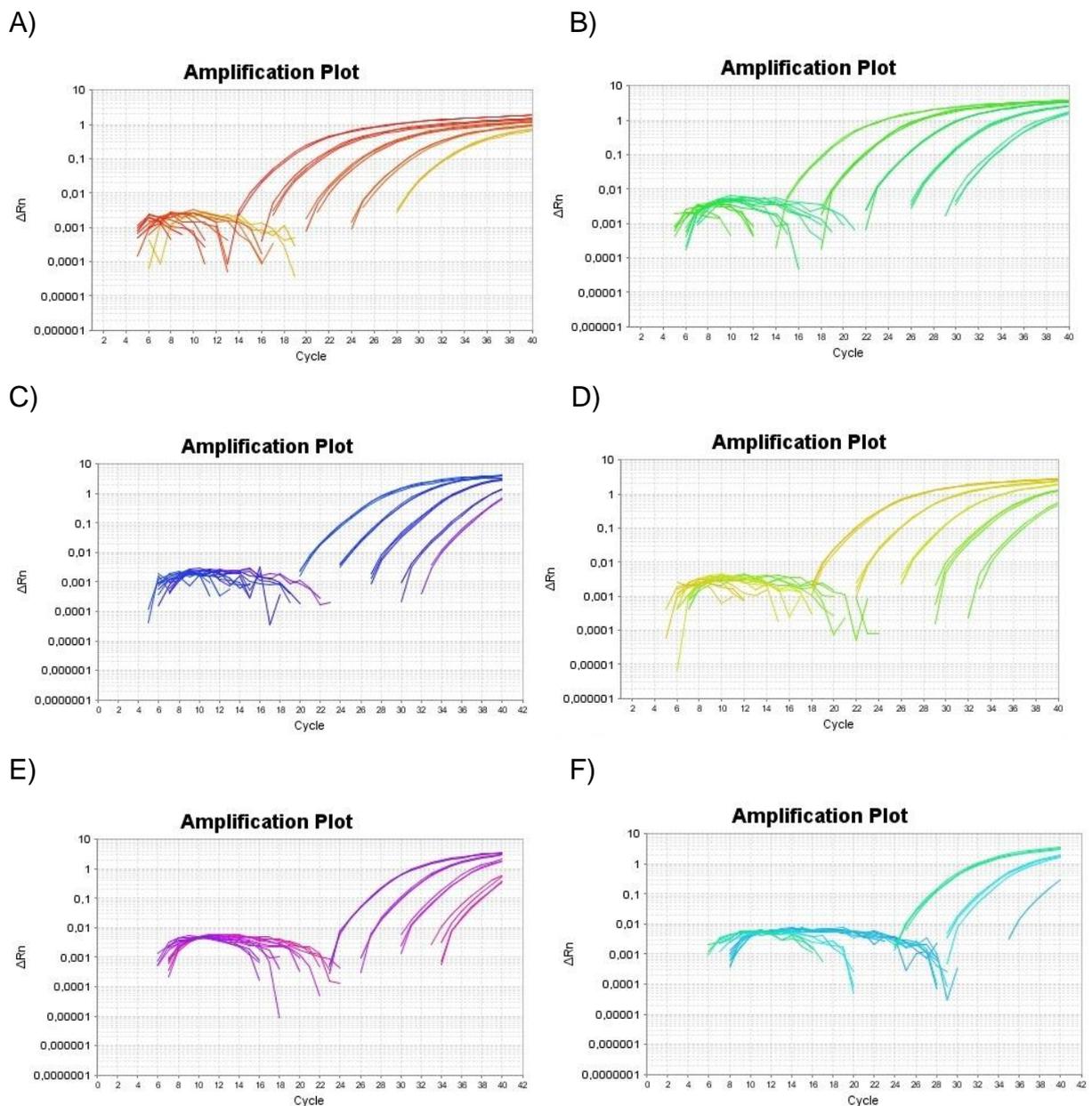


Figura 8: Padronização, por curva de diluição em série, dos ensaios de: A) *ACTB*, B) *c-myc*, C) *klf4*, D) *notch3*, E) *oct4* e F) *sox2*. Valor de eficiência dos ensaios em aproximadamente 90%.

Tabela 6: Valores obtidos na padronização dos ensaios TaqMan para qPCR

Gene	R ²	Slope	Eff %
<i>ACTB</i>	0,992	-3,553	91,18
<i>c-myc</i>	0,997	-3,689	96,66
<i>klf4</i>	0,990	-3,242	101,429
<i>oct4</i>	0,997	-2,925	99,731
<i>sox2</i>	0,969	-3,622	88,857
<i>notch3</i>	0,996	-3,766	94,301

4.5 – EXPRESSÃO DOS GENES ALVO POR PCR EM TEMPO REAL

A quantificação da expressão dos genes alvo nas amostras foi realizada por meio da reação de PCR em tempo real e os valores de CTs obtidos a partir de média de triplicata são apresentados no anexo III.

Os valores médios de CTs foram tratados no programa Biogazelle Qbase 2.1 que gerou a quantificação relativa da expressão de cada gene em cada uma das amostras como observado na tabela 7.

Tabela 7: Valores da quantificação relativa (RQ) da expressão dos genes nas amostras calculado pelo software Biogazelle Qbase 2.1 utilizando como fator normalizador primeiro o gene endógeno e depois a média do próprio gene.

Amostra	<i>ACTB</i>	<i>c-myc</i>	<i>klf4</i>	<i>oct4</i>	<i>sox2</i>	<i>notch3</i>
78**	0,9735	0,2720	0,1490	0,2073	0,0001	0,0485
20	0,9885	0,4744	72,9389	0,8394	0,0014	0,0001
33	1,6941	0,8680	0,8728	0,2850	7,7332	173,2613
35	0,4835	5,5137	1,9519	0,7337	48,2539	0,1986
36	0,3729	0,2162	1,4538	0,2767	1,8777	0,4684
46	0,5668	0,3517	0,3627	0,4152	29,9749	2,1787
49	0,3705	0,7844	55,4577	0,4008	0,0003	0,0000
50	0,4180	0,5797	3,9102	0,3940	2,5037	0,9037
54	0,7730	0,3637	0,0957	0,5894	0,0001	0,0395
58	0,5362	0,0333	0,4305	0,4513	1,7471	7,9542
59	0,5970	0,5598	1,1015	4,2480	592,1474	8,6552
60	0,6297	0,1997	0,7226	0,1361	1,5183	15,0717
62	0,5884	1,0835	0,1121	0,3571	3,8280	67,1314

66	0,6115	0,2785	0,2703	0,2806	1,7616	10,8975
67	0,5036	0,2768	0,5926	0,4071	3,9695	0,1765
70	1,4910	0,9483	32,0365	1,2126	4,0664	0,0805
72	0,4124	0,4478	1,3746	0,2844	0,0001	0,0758
86	0,6586	0,3634	0,9380	0,3334	0,7238	0,0129
87	2,4327	1,9515	0,0782	0,4331	7,6856	4,4038
88	0,4729	1,2162	2,1288	0,3352	0,0001	0,1283
89	0,3624	0,5096	0,0628	0,7693	0,0002	0,0668
90	1,0650	0,7541	4,5748	0,3654	0,0001	0,2317
95	0,3554	2,0445	0,5511	0,8481	1,4400	1,1069
96	2,5703	0,3723	3,5369	1,0401	0,0002	0,0809
98	1,1553	1,9926	0,1736	0,9714	2,6748	1,1493
100	2,0141	0,7964	1,5960	1,0073	7,4140	0,9126
103	0,7974	0,3225	14,6511	1,0574	11,4932	0,5830
104	1,8005	0,5164	2,8628	0,7352	2,3791	16,3997
105	11,0063	8,0093	1,4059	20,1366	1354,9078	117,0517
108	1,5193	1,6925	1,0524	0,9347	2,4488	2,2811
110	0,8816	9,6883	0,6182	1,0661	43,5299	949,5880
114	1,1292	7,0135	1,1708	2,1576	14,3353	7,3766
119	1,8807	2,3296	0,8824	0,7865	4,8316	25,2159
123	1,0686	0,6048	1,8719	1,6619	0,0003	2,8172
126	0,9570	0,6571	0,9745	1,2748	4,8635	0,8333
128	1,2960	0,4296	2,0251	0,7620	8,7464	0,5583
136	1,4526	1,1659	8,2439	1,1038	3,0857	0,6096
147	2,7036	2,8234	5,0840	0,8319	10,8118	1,1204
292	3,5797	0,9721	1,4305	1,5464	0,0004	20,2319
313	0,8932	2,9850	1,9787	1,1196	6,4370	0,1245
316	2,3111	0,5845	0,8891	1,0961	3,4718	9,4471
322	0,3844	24,1438	0,1759	11,5457	2359,6619	0,2196
331	0,5356	0,5706	13,5639	41,4148	4220,6118	0,0568
333	0,4206	13,6018	64,7822	9,4263	100,2639	6,6886
NT2	6,9010	0,6802	1,8185	293,8019	133054,053	1628,5739
REH	1,0758	10,2385	0,0000	0,5064	2,1714	0,1535

** Paciente controle, sem diagnóstico para LLA

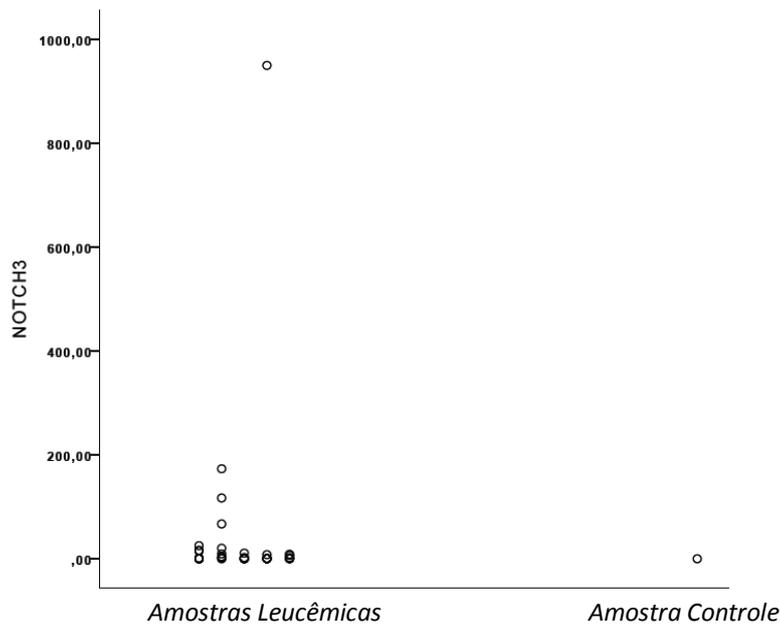


Figura 13: Quantificação da expressão de *notch3* por qPCR. Eixo Y, valor de RQ para *notch3* após normalização com *ACTB*. Quatro amostras se apresentaram com expressão maior que a da amostra controle.

Poucas amostras apresentaram expressão elevada dos genes analisados em relação à amostra controle não leucêmica. Embora a maioria das amostras tenha apresentado níveis de expressão próximos aos da amostra controle, as amostras que apresentaram essa dispersão diferenciada em relação ao controle, foram diferentes para cada um dos genes e estão representadas na tabela 8. Nela, os primeiros algarismos se referem ao paciente e o algarismo após a “/”, se refere à alíquota de amostra utilizada de um mesmo paciente.

Tabela 8: Amostras que tiveram dispersão maior em cada um dos genes.

Gene	Amostras Com Dispersão Elevada
c-myc	35/1 B, 105/1, 110/1, 114/1, 322/1 e 333/1
klf4	20/1, 49/1, 70/1, 103/1, 136/3, 313/1 e 333/1
oct4	59/1, 105/1, 322/1, 331/1 333/1
sox2	59/1, 105/1, 322/1, 331/1
notch3	33/1, 62/1, 105/1 110/1 D

Foi observado que as amostras que apresentaram expressão diferenciada para o gene *oct4* foram praticamente as mesmas que apresentaram expressão diferenciada para o gene *sox2* com exceção a amostra 333/1.

Foi observado também que essa mesma amostra, 333/1, apresentou dispersão elevada para quase todos os genes exceto para o gene *notch3*.

4.7 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES ALVO NAS AMOSTRAS DE PACIENTES LEUCÊMICOS COMPARADAS COM A EXPRESSÃO NA AMOSTRA CONTROLE

Para investigar a expressão dos genes *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3* em pacientes leucêmicos, fez-se uma análise da quantificação relativa da expressão desses genes nas amostras de pacientes leucêmicos e comparou-a com a expressão no paciente não leucêmico. Para essa análise foi utilizado o método $\Delta\Delta CT$ onde CT representa o ciclo da reação de PCR em que a produção do produto entra na fase exponencial. O ΔCT representa a diferença entre o CT para o gene analisado comparado com o gene de referência ou controle constitutivo, o qual serve como base para normalizar a quantidade de mRNA total entre as amostras. O $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra do paciente leucêmico já normalizado pelo gene constitutivo e o ΔCT da amostra controle.

Nesta análise, foi observado que a maioria das amostras demonstrou expressão mais elevada dos genes alvo do que na amostra controle, com raras exceções, como pode ser observado nas figuras 14 a 18. Após verificar a expressão relativa nestas linhagens, aplicou-se um teste estatístico (teste t não paramétrico) utilizando o software REST by Qiagen e constatou-se que não houve uma diferença significativa na expressão entre esses dois grupos (Tabela 9). Para todos os genes o valor de p foi maior do que 0,05 considerando um índice de confiabilidade de 95%.

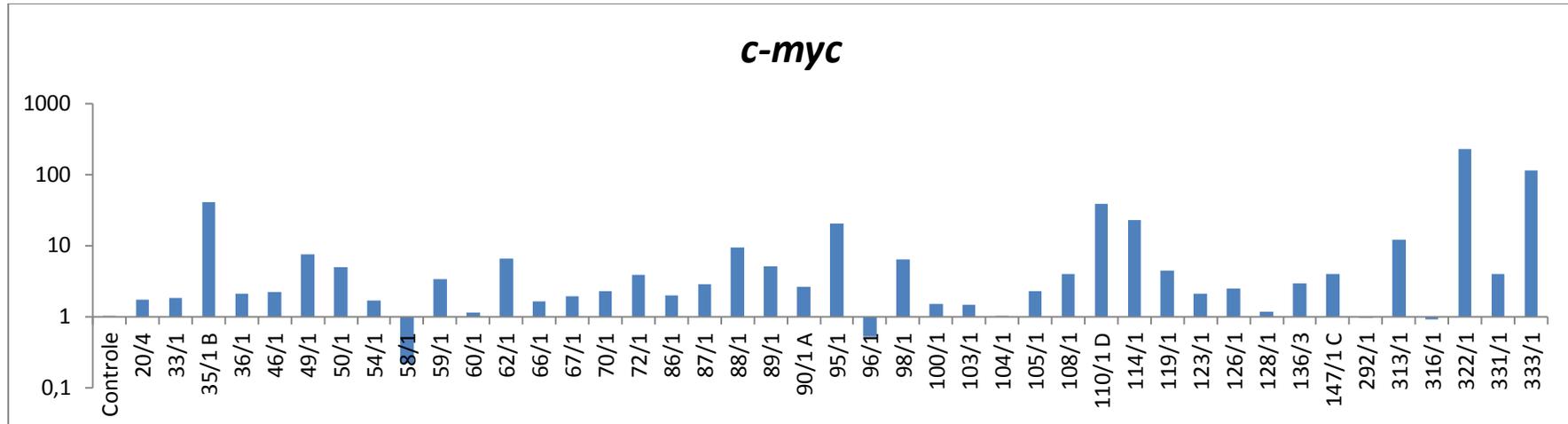


Figura 14 – Comparação de expressão do gene *c-myc* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 58/1, 96/1, 292/1 e 316/1 apresentaram expressão menor do que a amostra controle.

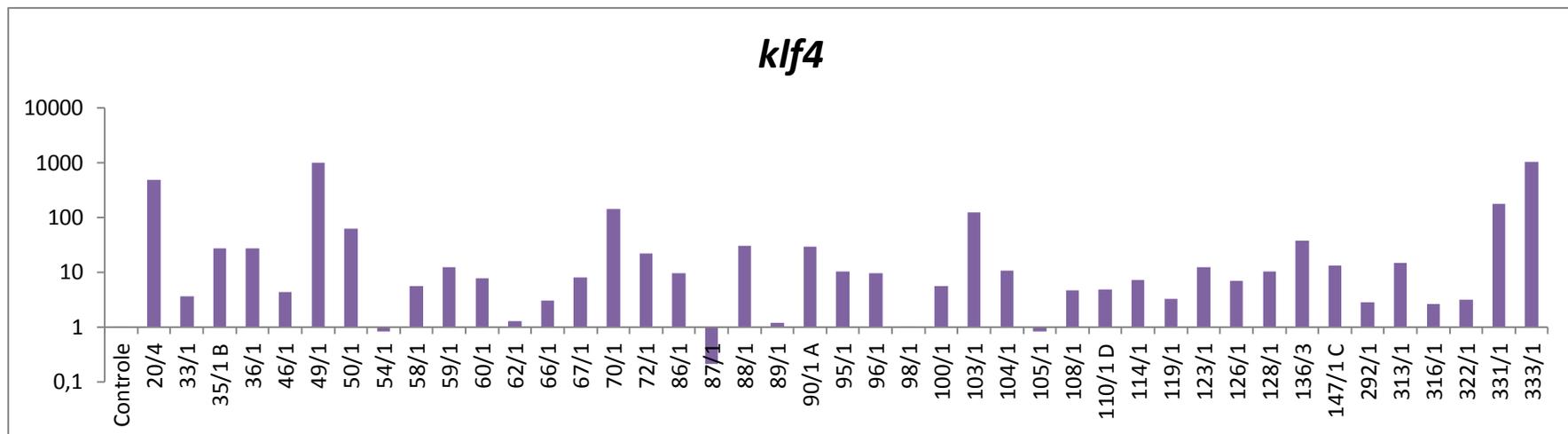


Figura 15 – Comparação de expressão do gene *klf4* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 54/1, 87/1 e 105/1 apresentaram expressão menor do que a amostra controle.

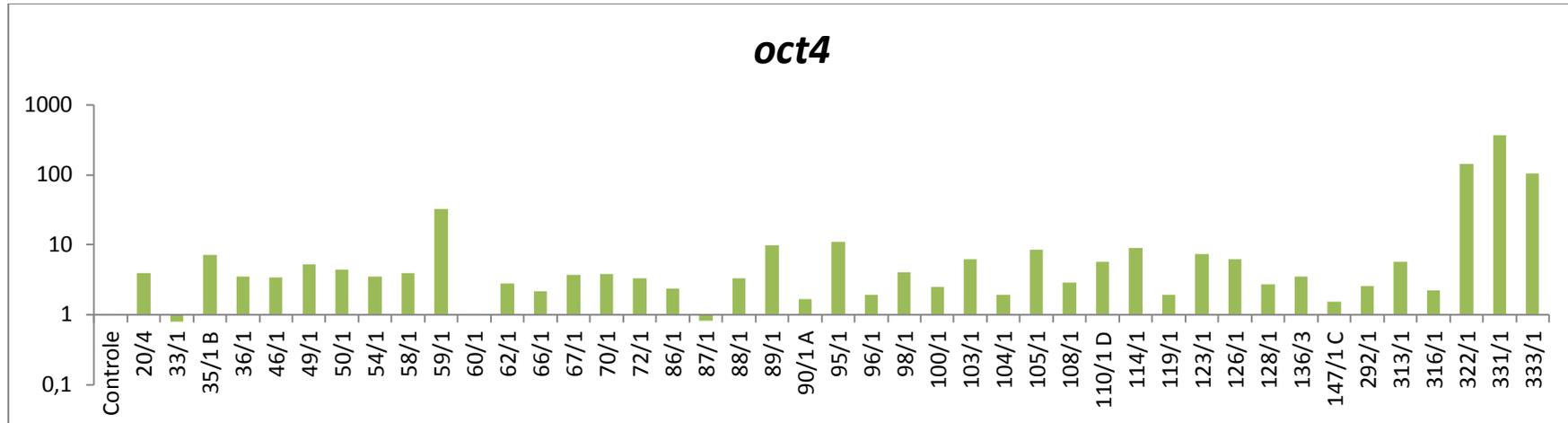


Figura 16 – Comparação de expressão do gene *oct4* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 33/1 e 87/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.

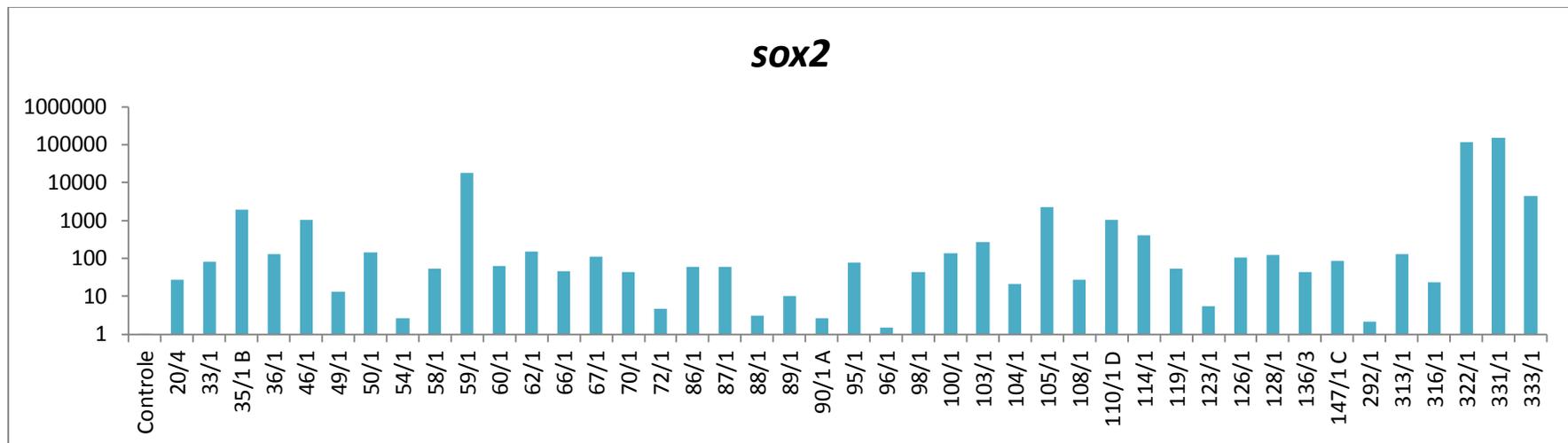


Figura 17 – Comparação de expressão do gene *sox2* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. Nenhuma das amostras apresentou expressão inferior à da amostra controle.

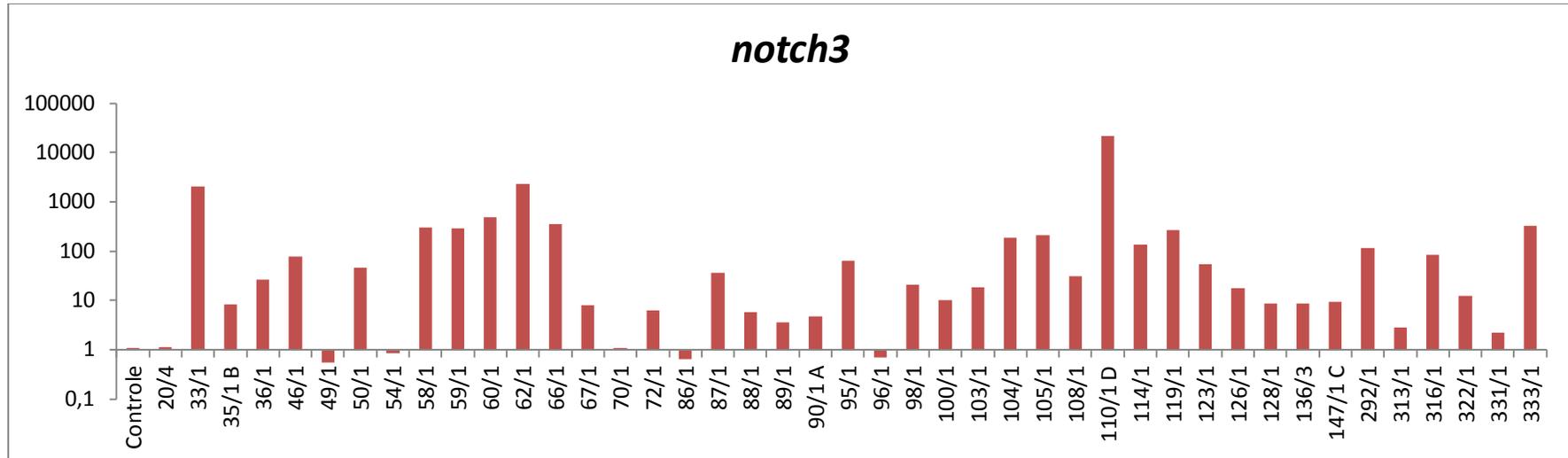


Figura 18 – Comparação de expressão do gene *notch3* entre uma amostra controle (não leucêmica) e 43 amostras de pacientes leucêmicos. *ACTB* utilizada na normalização pelo método $\Delta\Delta CT$. As amostras 49/1, 54/1, 86/1 e 96/1 apresentaram expressão inferior à da amostra controle.

Tabela 9: Teste t não paramétrico. Realizado pelo Software REST by QIAGEN utilizando os valores da tabela 7.

Gene	Tipo	Eficiência da Reação	Expressão	Desvio Padrão	I.C. 95%.	P(H1)	Resultado
<i>ACTB</i>	REF	1,0	1,000				
<i>notch3</i>	TRG	1,0	27,028	2,22 - 298,142	0,56 - 2.268,00	0,183	Não há expressão diferenciada do grupo controle. P(H1)=0,183
<i>c-myc</i>	TRG	1,0	3,687	1,41 - 9,215	0,55 - 108,24	0,232	Não há expressão diferenciada do grupo controle. P(H1)=0,233
<i>oct4</i>	TRG	1,0	4,546	1,96 - 8,592	0,85 - 137,43	0,138	Não há expressão diferenciada do grupo controle. P(H1)=0,138
<i>klf4</i>	TRG	1,0	9,478	2,50 - 37,175	0,48 - 928,27	0,243	Não há expressão diferenciada do grupo controle. P(H1)=0,243
<i>sox2</i>	TRG	1,0	84,409	10,19 - 908,01	2,14 - 103.378,	0,074	Não há expressão diferenciada do grupo controle. P(H1)=0,074

4.8 – CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EM GRUPOS DE EXPRESSÃO

Considerando-se os resultados anteriormente obtidos, e para dividir os pacientes em estudo em dois grupos sendo um com expressão basal e o outro com hiperexpressão, foram gerados os dados estatísticos referentes aos percentis das amostras (Tabela 10). Foram considerados hiperexpressos as amostras acima do percentil 75, ou seja, os 25% maiores valores de expressão para cada um dos genes foram considerados como hiperexpressos.

Tabela 10: Valores de referência estatística das amostras leucêmicas utilizadas.

	C-MYC	KLF4	OCT4	SOX2	NOTCH3
Nº Válido	43	43	43	43	43
Média	2,3509488	7,2322767	2,6993512	206,307037	33,8695256
Mediana	,7541000	1,3746000	,8319000	3,4718000	,9126000
Modelo Padrão	4,41199295	16,8743648	7,03308076	752,042718	146,600272
Mínimo	,03330	,06280	,13610	,00010	,00000
Máximo	24,14380	72,93890	41,41480	4220,61180	949,58800
Percentis 10	,2774800	,1367000	,2846400	,0001400	,0464200
25	,4296000	,5926000	,4008000	,7238000	,1283000
50	,7541000	1,3746000	,8319000	3,4718000	,9126000
75	1,9926000	3,5369000	1,1196000	10,8118000	8,6552000
90	7,6109800	25,0823400	7,3549800	395,394000	50,3652000

4.9 – ASSOCIAÇÃO DA HIPEREXPRESSÃO DOS GENES ALVO COM A TAXA GLOBAL DE SOBREVIDA

A sobrevida global dos pacientes com hiperexpressão dos genes de interesse foi comparada com a daqueles que apresentaram expressão basal dos genes alvo. Para tanto, os pacientes foram divididos em dois grupos conforme citado anteriormente. O primeiro com pacientes com expressão basal do gene alvo e o segundo com pacientes com hiperexpressão quando considerados os valores abaixo e acima do percentil 75 respectivamente.

Os testes de log-rank mostraram que houve diferença significativa na sobrevida dos pacientes quando comparado o grupo com expressão basal e o grupo com hiperexpressão para o gene *klf4* (Figura 19B). Para os demais genes a

correlação entre a expressão do gene e a sobrevivência não se mostrou significativa (Figura 19).

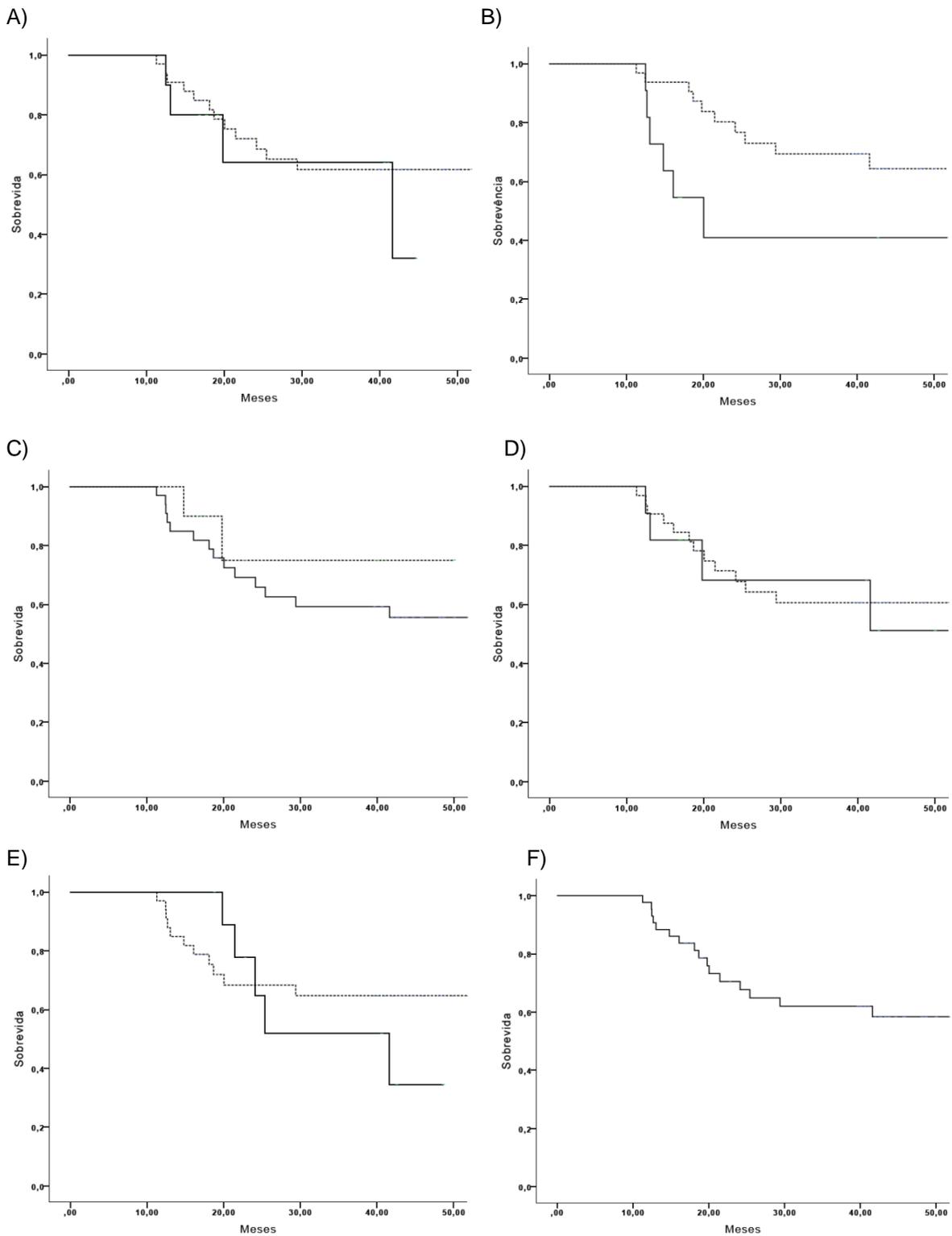


Figura 19: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de acordo com a expressão de A) *c-myc* ($p = 0,531$), B) *klf4* ($p = 0,022$), C) *oct4* ($p = 0,441$), D) *sox2* ($p = 0,977$), E) *notch3* ($p = 0,588$) e F) Curva de sobrevivência global. A sobrevivência global para o grupo com expressão basal está representado pela linha pontilhada e para o grupo hiperexpresso está representado pela linha sólida.

4.10 – CORRELAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES ALVO COM PARÂMETROS PROGNÓSTICOS.

Em seguida, foi feita uma análise de correlação entre os níveis de expressão de *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3* e as características clínicas que sabidamente possuem significância prognóstica na LLA.

Para o gene *c-myc*, o teste χ^2 (Qui-quadrado) mostrou que a hiperexpressão desse gene se correlaciona com a ausência de translocações ($p = 0,014$) no momento do diagnóstico (tabela 11).

Tabela 11: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de *c-myc*.

Parâmetro Prognóstico		Expressão Basal	Hiperexpresso	Significância (p)
Sexo	M	18	7	$p = 0,312$
	F	15	3	
Leucometria Diagnóstica	> 50.000	17	4	$p = 0,392$
	< 50.000	16	6	
Imunofenótipo	B	28	9	$p = 0,509$
	T	5	1	
Alterações Cromossômicas (Translocações)	Ausência	15	9	$p = 0,014$
	Presença	18	1	
CD10	Positivo	26	9	$p = 0,461$
	Negativo	6	1	
Status da Medula D15	Sem infiltração	18	7	$p = 0,613$
	Com Infiltração	15	3	
Status da Medula D29	Sem infiltração	30	9	$p = 0,668$
	Com Infiltração	3	1	
Status de Indução	Remissão	31	9	$p = 0,558$
	Falha Indutória	2	1	
Status de Óbito	Vivo	15	6	$p = 0,594$
	Óbito	14	4	
Status de Recaída	Sim	12	7	$p = 0,512$
	Não	21	3	

O teste χ^2 mostrou que existe correlação entre os níveis de expressão de *klf4* e o sexo do paciente acometido com LLA ($p = 0,011$) como pode ser observado na tabela 12.

Tabela 12: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de *klf4*

Parâmetro Prognóstico		Expressão Basal	Hiperexpresso	Significância (p)
Sexo	M	15	10	p = 0,011
	F	17	1	
Leucometria Diagnóstica	> 50.000	15	6	p = 0,464
	< 50.000	17	5	
Imunofenótipo	B	26	11	p = 0,118
	T	6	0	
Alterações Cromossômicas (Translocações)	Ausência	18	6	p = 0,597
	Presença	14	5	
CD10	Positivo	25	10	p = 0,398
	Negativo	6	1	
Status da Medula D15	Sem infiltração	20	5	p = 0,158
	Com Infiltração	12	6	
Status da Medula D29	Sem infiltração	30	9	p = 0,267
	Com Infiltração	2	2	
Status de Indução	Remissão	30	10	p = 0,598
	Falha Indutória	2	1	
Status de Óbito	Vivo	21	4	p = 0,090
	Óbito	11	7	
Status de Recaída	Sim	9	6	p = 0,112
	Não	23	5	

O teste χ^2 demonstrou não haver correlação significativa entre os fatores prognósticos dos pacientes estudados e a expressão dos genes *oct4*, *sox2* e *notch3*. (tabela 13 a 15).

Tabela 13: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de *oct4*

Parâmetro Prognóstico		Expressão Basal	Hiperexpresso	Significância (p)
Sexo	M	20	5	p = 0,406
	F	13	5	
Leucometria Diagnóstica	> 50.000	17	4	p = 0,392
	< 50.000	16	6	
Imunofenótipo	B	28	9	p = 0,509
	T	6	1	

Alterações Cromossômicas (Translocações)	Ausência	19	5	p = 0,473
	Presença	14	5	
CD10	Positivo	25	10	p = 0,125
	Negativo	7	0	
Status da Medula D15	Sem infiltração	19	6	p = 0,135
	Com Infiltração	14	4	
Status da Medula D29	Sem infiltração	29	10	p = 0,332
	Com Infiltração	4	0	
Status de Indução	Remissão	30	10	p = 0,442
	Falha Indutória	3	0	
Status de Óbito	Vivo	17	8	p = 0,107
	Óbito	16	2	
Status de Recaída	Sim	13	2	p = 0,231
	Não	20	8	

Tabela 14: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de sox2

Parâmetro Prognóstico		Expressão Basal	Hiperexpresso	Significância (p)
Sexo	M	17	8	p = 0,219
	F	15	3	
Leucometria Diagnóstica	> 50.000	16	5	p = 0,536
	< 50.000	16	6	
Imunofenótipo	B	27	10	p = 0,435
	T	6	1	
Alterações Cromossômicas (Translocações)	Ausência	17	7	p = 0,403
	Presença	15	4	
CD10	Positivo	25	10	p = 0,398
	Negativo	6	1	
Status da Medula D15	Sem infiltração	18	7	p = 0,812
	Com Infiltração	14	4	
Status da Medula D29	Sem infiltração	29	10	p = 0,733
	Com Infiltração	3	1	
Status de Indução	Remissão	30	10	p = 0,598
	Falha Indutória	2	1	
Status de Óbito	Vivo	19	6	p = 0,525
	Óbito	13	5	

Status de Recaída	Sim	11	4	p = 0,590
	Não	21	7	

Tabela 15: Valores resultantes do teste χ^2 entre fatores prognósticos e nível de expressão de *notch3*

Parâmetro Prognóstico		Expressão Basal	Hiperexpresso	Significância (p)
Sexo	M	21	4	p = 0,168
	F	12	6	
Leucometria Diagnóstica	> 50.000	14	7	p = 0,121
	< 50.000	19	3	
Imunofenótipo	B	30	7	p = 0,208
	T	4	3	
Alterações Cromossômicas (Translocações)	Ausência	18	6	p = 0,527
	Presença	15	4	
CD10	Positivo	28	7	p = 0,203
	Negativo	4	3	
Status da Medula D15	Sem infiltração	17	8	p = 0,099
	Com Infiltração	16	2	
Status da Medula D29	Sem infiltração	29	10	p = 0,332
	Com Infiltração	4	0	
Status de Indução	Remissão	30	10	p = 0,442
	Falha Indutória	3	0	
Status de Óbito	Vivo	20	5	p = 0,406
	Óbito	13	5	
Status de Recaída	Sim	11	4	p = 0,488
	Não	22	6	

5 – DISCUSSÃO

O perfil clínico da população de pacientes incluídos neste trabalho foi condizente com o de outros pacientes portadores de LLA previamente descritos na literatura e utilizados por outros centros de pesquisa. Houve leve diferença entre os casos diagnosticados entre os sexos feminino e masculino, sendo a quantidade de pacientes homens pouco superior que o de pacientes mulheres. Ademais, a maioria dos pacientes (62,3%) possuía entre um e nove anos. A similaridade entre a nossa população e a descrita internacionalmente sugere que a análise da expressão dos genes em estudo pode ser considerada fidedigna, sem possíveis vieses que prejudicariam a análise dos dados. Deve-se, contudo, observar que havia apenas uma amostra de paciente não leucêmico, utilizada como controle, nas análises estatísticas. Essa situação deveu-se à dificuldade de obtenção de amostras não leucêmicas tendo em vista que o procedimento para retirada das mesmas é invasivo (punção da crista ilíaca) e somente é indicado em caso de suspeita de doenças hematopoiéticas. Em função dessa dificuldade, a seleção prévia e cuidadosa de genes cuja expressão será avaliada é altamente recomendada, tendo em vista a pequena quantidade de amostras controle, o que é situação recorrente nesse tipo de estudo⁽¹³⁵⁻¹³⁷⁾.

Os genes aqui estudados têm sido frequentemente relacionados à pluripotência ou primitividade, característica que parece também estar associada a fenótipos mais agressivos de neoplasias. A fim de servir como controle da expressão desses genes, foram utilizadas inicialmente as linhagens MDA-MB-468, HCC1954, SKBR3, HeLa e NT2. As linhagens MDA-MB-468, HCC1954 e SKBR3 são provenientes de neoplasias malignas mamárias enquanto a linhagem HeLa é proveniente de adenocarcinoma de colo do útero. A linhagem NT2 é uma linhagem de teratocarcinoma humano com características de células tronco e deveria apresentar expressão dos genes relacionados à pluripotência aqui analisados⁽¹³⁸⁻¹⁴¹⁾. No entanto, quando foi feita a reação de PCR convencional, todas as linhagens utilizadas apresentaram expressão de todos os genes alvo exceto, curiosamente, o gene *klf4* na linhagem NT2. Por isso, no momento da reação de PCR em tempo real, foram utilizados como controle a linhagem NT2 e outra linhagem das acima citadas dependendo do gene. Foi observado que, na qPCR, o nível relativo de *klf4* em NT2 estava em torno de 1,8, sugerindo que a expressão de *klf4* não apenas foi

detectada, mas também que seus níveis estavam em torno do dobro da média da população analisada. As diferenças de resultados obtidos pela PCR convencional e por PCR em tempo real podem ser atribuídas à diferença de sensibilidade entre as duas técnicas. Dessa forma, foi observado que todas as linhagens utilizadas poderiam servir de controle positivo para as análises posteriores por qPCR. Por isso optou-se, nesse momento, utilizar apenas a linhagem NT2 como controle já que se trata de uma linhagem de teratocarcinoma com características de células tronco se mostrando ser a melhor opção como controle.

O gene Sox2 não obteve amplificação em nenhuma das linhagens utilizadas mesmo mediante variação do número de ciclos e de temperatura de anelamento nos testes iniciais por PCR convencional. Por esse motivo, escolheu-se utilizar como controle para esse gene a linhagem MCF7 na qual sua expressão já havia sido reportada⁽¹⁴⁰⁻¹⁴³⁾. Nas análises por PCR em tempo real além da linhagem MCF7, foi utilizada a linhagem NT2 que mostrou expressão facilmente detectável para o gene *sox2* e mais uma vez escolheu-se utilizar apenas essa linhagem como controle.

Conforme esperado, a padronização das sondas mostrou que os ensaios apresentaram eficiência próxima a 90%. Tal resultado permitiu que a análise de expressão relativa pudesse ser realizada com segurança. Considerando que elas encontravam-se todas com valores próximos entre si, e em torno de 90%, optou-se por realizar o cálculo da expressão relativa utilizando-se a fórmula do delta-delta CT.

Para investigar a expressão dos genes *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3* em pacientes leucêmicos, foi feita a análise de quantificação relativa (método $\Delta\Delta CT$) comparando-se a expressão desses genes nas amostras de pacientes leucêmicos com a expressão dos mesmos genes no paciente não leucêmico. Embora no gráfico (figuras 14 a 18) seja possível observar que a expressão dos genes nas amostras em estudo era maior que a expressão dos genes na amostra controle, ao aplicar o teste estatístico (Teste t não paramétrico) verificou-se que não houve diferença significativa entre o grupo controle (amostra não leucêmica) e o grupo em estudo (amostras leucêmicas) diferentemente do que era inicialmente esperado^(54, 59-64 e 70).

A dispersão das amostras foi diferente para cada um dos genes, embora a maioria das amostras tenha apresentado níveis de expressão próximos aos da amostra controle, como apresentado anteriormente tabela 15.

É interessante notar que os pacientes que apresentaram expressão gênica elevada, não pareciam fazê-lo indistintamente. Assim, por exemplo, os pacientes que apresentaram expressão elevada de *notch3* não são os mesmos que apresentaram expressão elevada de *sox2*. Tal achado sugere que diferentes mecanismos podem manter o caráter indiferenciado das células leucêmicas, e dessa maneira, contribuir para o processo neoplásico. Além disso, mesmo em processos fisiológicos normais, a interligação de circuitos moleculares pode obedecer a uma hierarquia pré-estabelecida. Por exemplo, Masui e colaboradores reportaram que *oct4* e *sox2* regulam a expressão de *nanog*, outro gene relacionado à pluripotência e capaz de manter o estado indiferenciado, ao atuarem em sítios próximos no promotor daquele gene. Já *klf4* foi reportado como sendo um fator praticamente independente na manutenção da indiferenciação, podendo exercer controle de expressão de *nanog*, e de forma independente dos outros dois fatores de transcrição citados acima^(66, 144).

Os dados aqui obtidos parecem estar em acordo com a literatura acima citada, no sentido de que todos pacientes que apresentaram expressão elevada de *sox2*, também o fizeram para *oct4*. Houve apenas um paciente que apresentou expressão elevada de *oct4*, mas não de *sox2*. Por outro lado, quando analisada a expressão de *klf4*, apenas o paciente cujos padrões de expressão de *oct4* e *sox2* eram discordantes, tinha expressão elevada de *klf4*. Os demais pacientes com expressão elevada de *klf4* eram distintos daqueles de *oct4* e de *sox2*.

Apesar da proximidade, a utilização de apenas uma amostra controle não permitiu, inicialmente, a divisão entre grupos que apresentassem expressão normal e expressão alterada dos genes estudados. Essa divisão foi obtida utilizando-se o percentil 75 da própria população afetada.

Tendo dividido os pacientes nos grupos de expressão basal e expressão elevada, considerando-se os valores acima do percentil 75 como hiperexpressos, ou seja, os 25% maiores valores obtidos em cada um dos genes foram considerados hiperexpressos, esses subgrupos foram utilizados para realizar a análise de correlação com parâmetros clínicos e fatores prognósticos já bem estabelecidos, como leucometria, idade ao diagnóstico e algumas alterações citogenéticas. Nessa análise, foram encontradas apenas duas correlações: a expressão de *c-myc* correlaciona-se com a presença de alterações citogenéticas, e a de *klf4* com o sexo

do paciente (masculino). Este achado surpreendente carece de hipótese que o possa explicar e/ou estabelecer uma relação causal com base na literatura científica disponível. Justamente por isso, representa uma janela de oportunidades para estudos futuros.

Alterações citogenéticas, como translocações cromossômicas, já foram reportadas em associação a LLA. As mais frequentemente encontradas são t(1;19), t(12;21), t(9;22) e t(4;11), com diferentes implicações na evolução da doença. Por causa disso, essas translocações são rotineiramente investigadas em amostras de pacientes com suspeita de LLA. A expressão elevada de *c-myc* foi associada à ausência de translocações pesquisadas. *C-myc* é um fator de transcrição com alta atividade mitogênica, cuja função é regulada tanto a nível transcricional como pós-traducional e, neste caso, por diversas vias de sinalização como MAPK, AKT, e associação com proteínas regulatórias⁽¹⁴⁵⁾. Por causa disso, especula-se que a análise de expressão, feita por mRNA, como aqui demonstrada, pode não ser suficiente para fornecer todo escopo de atuação de *c-myc* e seu papel na doença. Ou seja, sua atividade desregulada (e não somente sua expressão) pode ser suficiente para o processo neoplásico, sem que grandes alterações estruturais do genoma, como as translocações, sejam necessárias.

A análise de sobrevida total de pacientes com expressão basal e elevada de *klf4* demonstrou que pacientes que hiperexpressam o gene tem a sobrevida global diminuída em relação a pacientes com expressão basal do gene. Curiosamente, esses achados são o inverso do que foi recentemente reportado por Guo e colaboradores (2013), que encontraram que a expressão diminuída de *klf4* estava correlacionada à menor sobrevida. Neste trabalho, a expressão de *klf4* foi correlacionada à taxa de células CD34-positivas (células tronco hematopoiéticas), mas não à taxa de blastos na medula, o que levou os autores a concluir que a expressão de *klf4* poderia estar relacionada ao estágio de diferenciação das leucemias. As diferenças de resultados entre o trabalho aqui apresentado e o de Guo podem ser atribuídas tanto ao número de pacientes utilizados quanto aos métodos estatísticos empregados para a análise. Outra questão relacionada ao trabalho citado, diz respeito ao fato de que os autores utilizaram amostras de 28 pacientes com LLA, um número 25% menor que o aqui apresentado e para realizar a análise de expressão deste gene ele utilizou 52 amostras, ou seja, nessas

amostras havia pacientes não apenas com LLA, mas com outras leucemias que não foram bem especificadas. Isso pode ter influenciado na relação expressão-sobrevida já que as diferentes leucemias têm características clínicas e moleculares distintas. Por outro lado, o critério de determinação de hiperexpressão aqui adotado foi percentual dentro da amostra, o que pode incorporar o viés da variação natural de expressão do gene, e não necessariamente indicar a hiperexpressão. Guo e colaboradores utilizaram um total de 96 pacientes, sendo que nem todos tinham LLA, e então puderam ser estratificados como controle e afetados⁽¹⁴⁶⁾.

Cabe ressaltar que, em comparação, alguns dados são concordantes. Por exemplo, foi encontrado que a expressão de *klf4* não está correlacionada a parâmetros clínicos ou de análise de risco, como, por exemplo, total de leucócitos ao diagnóstico e alterações citogenéticas/cariotípicas. Esses achados já seriam esperados, uma vez que *klf4* parece contribuir para a manutenção do estado primitivo. Nesse sentido, o aumento de leucócitos dependeria de sinais mitogênicos e/ou de evasão à apoptose, e não de pluripotência *per se*. Igualmente, alterações cromossômicas que viessem a contribuir para a progressão da doença poderiam funcionar cooperativa ou sinergicamente com a pluripotência, propagando a alteração às células filhas, que assim teriam uma vantagem proliferativa. Contudo, o gene *klf4* sozinho não exerceria um papel leucemogênico, nem daria início a tal processo.

6 – CONCLUSÃO

Ao considerar o câncer como um dos maiores problemas de saúde pública na atualidade e sendo a Leucemia Linfóide Aguda - LLA o tipo que mais atinge crianças e adolescentes, é importante que novas pesquisas direcionadas a melhorias no diagnóstico e tratamento desses pacientes sejam realizadas. Nesse sentido, também é importante entender que, por ser uma doença de cunho genético, estudos moleculares tornam-se cada vez mais frequentes e essenciais para a busca de terapias mais individualizadas. Aproximadamente 20% dos pacientes com LLA apresentam recidiva, sem que as causas para isso estejam totalmente estabelecidas, nem mesmo que fatores que permitam prever tal ocorrência estejam determinados.

Células tronco tumorais tem sido descritas em diversos tipos de neoplasias. O conhecimento da função dessas células no processo tumorigênico, e, sobretudo, a identificação das mesmas poderá contribuir não apenas para o diagnóstico precoce, mas também para a definição de tratamentos mais direcionados, melhorando o prognóstico da doença.

O presente trabalho buscou analisar a expressão de alguns genes (*c-myc*, *sox2*, *oct4*, *klf4* e *notch3*) relacionados à pluripotência em pacientes acometidos com LLA, por qPCR. A detecção de todos os genes estudados foi possível na maioria dos pacientes.

A inclusão de um único paciente não leucêmico na análise fez com que os níveis de hiperexpressão de cada gene fossem determinados a partir de valores encontrados na própria população de amostras. Considerando-se a casuística de pacientes atendidos no Hospital da Criança de Brasília e as naturais restrições éticas que envolvem esses pacientes, espera-se que seja possível, no futuro, a inclusão de um maior número de amostras controle.

Embora de maneira geral esse estudo não tenha mostrado diferença significativa na expressão global dos genes *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3* entre o grupo de pacientes com leucemia e o paciente controle, quando relacionada à expressão dos fatores de Yamanaka com os fatores prognósticos mais importantes dessa doença, observou-se que a hiperexpressão de *klf4* foi correlacionada a menor sobrevida de pacientes. Se confirmada a correlação, é possível que esse gene

contribua para a aplicação de tratamentos mais agressivos a pacientes que o hiperexpressam. Além disso, seria interessante estudar qual o exato papel de *klf4* na leucemogênese, trabalho que foge ao escopo deste estudo, mas que poderia indicar novos alvos moleculares para o tratamento da leucemia. Ainda, o teste de χ^2 (Qui-quadrado) mostrou que a hiperexpressão de *c-myc* se correlaciona com a ausência das translocações pesquisadas no momento do diagnóstico.

Analisados em conjunto, esses dados apontam para o envolvimento dos genes de pluripotência na origem e progressão da LLA sugerindo-os como um novo alvo molecular para o desenvolvimento de estratégias de diagnóstico e tratamento. Contudo, novos trabalhos e novas investigações são necessários para contribuir no entendimento da importância dos genes *c-myc*, *klf4*, *oct4*, *sox2* e *notch3* nos processos moleculares do desenvolvimento da LLA e ajudar a elucidar o mecanismo no qual sua atividade está envolvida.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000. 100: 57–70.
2. Peltomäki P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. *Exp Cell Res*. 2012. 318(4):299-310.
3. Sampaio SAP & Rivitti EA. Dermatologia. Afecções epiteliais pré-malignas e tumores intraepidérmicos. In: *Dermatologia*. Artes Médicas. São Paulo – SP. 2007. p 839-45.
4. Weinberg RA. A biologia do câncer. Artmed. Porto Alegre. Artmed. 2008.
5. Guimarães JLM, Rosa DD. Rotinas em oncologia. Porto Alegre: Artmed, 2008.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of câncer: the next generation. *Cell*. 2011. 144:646-74.
7. Silva CALO, Oliveira KM, Carvalho CBO, *et al*. Prevalência de fatores associados ao câncer entre alunos de graduação nas áreas da saúde e ciências biológicas. *Rev Bras Cancerol*. 2010. 56(2):243-9.
8. Tonani M, Carvalho EC. Risco de câncer e comportamentos preventivos: a persuasão como estratégia de intervenção. *Rev Latinoam Enferm*. 2008. 6(5):67-74.
9. Muniz RM, Zago MMF, Schwartz E. As teias da sobrevivência oncológica: com a vida de novo. *Texto & Contexto Enferm*. 2009. 18(1)25-32.
10. WHO – World Health Organization. Global Health Observatory (GHO). World Cancer statistics.[citado 2013 jun 03]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>

11. França. International Agency for Research on Cancer. Fact Sheets [citado em 2013 jun 03]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012/13: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2011. [citado 2013 jul 23]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer na Criança e no Adolescente no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2008. [citado 2013 jun 03] Disponível em: http://www.inca.gov.br/tumores_infantis/
14. Lopes A. Prevenção do Câncer. Barueri: Manole, 2010
15. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Prevenção e detecção do câncer no Brasil. Rio de Janeiro/INCA; [citado em 2013 jun 03]. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=13.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *et al.* Biologia Molecular da Célula. Artmed. Porto Alegre. Artmed. 4 Edição. 2004.
17. Anjos ARD, Alvares-Silva M, Borelli P. Matriz Extracelular e Leucemia. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 2000. 22:404-412.
18. Zago MA, Falcão RP, Pasquini R. Hematologia: fundamentos e prática. Editora Atheneu. Rio de Janeiro. 2004.
19. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*. 2009. 23 (12):2233-41.
20. De Vasconcelos JF, Laranjeira AB, Zanchin NI, *et al.* Increased CCL2 and IL-8 in the bone marrow microenvironment in acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2011. 56(4):568-77.

21. Houthuijzen JM, Daenen LG, Roodhart JM, Voest EE. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer*. 2012. 106(12):1901-6.
22. Sison EA, Brown P. The bone marrow microenvironment and leukemia: biology and therapeutic targeting. *Expert Rev Hematol*. 2011. 4(3):271-83.
23. Greaves M. Molecular Genetics, Natural History and the Demise of Childhood Leukemia. *Eur J of Cancer*. 1999. 35(2):173-185
24. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43.
25. Pui CH, Ewans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006. 354:166-178
26. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, *et al*. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*. 1976. 33:451
27. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology & Genetics Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization Classification of Tumours. 2001.
28. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, *et al*. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995. 9:1783-1786
29. Protocolo de tratamento do Grupo Brasileiro de Tratamento de Leucemia da Infância (GBTLI) - LLA/99.
30. Pui CH, Campana D, Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia: current status and future perspectives. *Lancet Oncol*. 2001 Oct;2(10):597-607.
31. Cheok MH, Evans WE. Acute lymphoblastic leukaemia: a model for the pharmacogenomics of cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2006 Feb. 6(2):117-29.

32. Al-Hajj M, Becker MW, Wicha MS, *et al.* Therapeutic implications of cancer stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2004. 14: 43–47.
33. Al-Hajj, M. Cancer stem cells and oncology therapeutics. *Curr Opin Oncol.* 2007. 19: 61–64.
34. Hermann PC, Bhaskar S, Cioffi M, *et al.* Cancer stem cells in solid tumors. *Seminars in Cancer Biology.* 2010. 20: 77–84.
35. Li C, Heidt D, Dalerba P, *et al.* Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res.* 2007. 67:1030–7.
36. Feldmann G, Dhara S, Fendrich V, *et al.* Blockade of hedgehog signaling inhibits pancreatic cancer invasion and metastases: a new paradigm for combination therapy in solid cancers. *Cancer Res.* 2007. 67:2187– 96
37. Hermann P, Huber S, Herrler T, *et al.* Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell.* 2007. 1:313–23
38. Jimeno A, Feldmann G, Suarez-Gauthier A, *et al.* A direct pancreatic cancer xenograft model as a platform for cancer stem cell therapeutic development. *Mol Cancer Ther.* 2009. 8:310–4.
39. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, *et al.* Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004. 432:396–401.
40. Son MJ, Woolard K, Nam DH, *et al.* SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell.* 2009. 4:440–52.
41. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.* 2007. 445:106–10.

42. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2007. 104:10158–63.
43. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, *et al.* Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *PNAS.* 2003. 1; 100 (7): 3983–88.
44. Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, *et al.* Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One.* 2009. 4:e8377.
45. Collins AT, Berry PA, Hyde C, *et al.* Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005. 65:10946–51.
46. Miki J, Furusato B, Li H, *et al.* Identification of putative stem cell markers. CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2007. 67:3153–61.
47. Kim C, Jackson E, Woolfenden A, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005. 121:823–35.
48. Bertolini G, Roz L, Perego P, *et al.* Highly tumorigenic lung cancer CD133+ cells display stem-like features and are spared by cisplatin treatment. *Proc Natl Acad Sci.* 2009. 106:16281–6.
49. Prince M, Sivanandan R, Kaczorowski A, *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2007. 104:973–8.
50. Ma S, Chan K, Hu L, *et al.* Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2007. 132:2542–56.
51. Yang ZF, Ho DW, Ng MN, *et al.* Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell.* 2008. 13:153–66.

52. Fang D, Nguyen TK, Leishear K, *et al.* A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 2005. 65:9328–37.
53. Schatton T, Murphy G, Frank N, *et al.* Identification of cells initiating human melanomas. *Nature.* 2008. 451:345–9.
54. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012. 12: 133-143
55. Bonnet D and Dick JE. Human acute myeloid leukemia organized as a hierarchy that originate from a primitive hematopoietic cells. *Nature Medicine.* 1997. 3:730-737.
56. Majeti R. Monoclonal antibody therapy directed against human acute myeloid leukemia stem cells. *Oncogene.* 2011. 30:1009-1019
57. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, *et al.* Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. *Nat Med.* 2011. 17:1086-1093
58. Gentles AJ, Plevritis SK, Majeti R, Alizadeh AA. Association of a leukemic stem cell gene expression signature with clinical outcomes in acute myeloid leukemia. *JAMA: J Am Med Assoc.* 2010. 304:2706-2715
59. Bernt KM, Armstrong SA. Leukemia stem cells and human acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009. 46:33-38
60. le Viseur C, Hotfilder M, Bomken S, *et al.* In childhood acute lymphoblastic leukemia, blasts at different stages of immunophenotypic maturation have stem cell properties. *Cancer Cell.* 2008. 14:47-58
61. Rehe K, Wilson K, Bomken S, *et al.* Acute B lymphoblastic leukemia propagating cells are present at high frequency in diverse lymphoblast populations. *EMBO Mol Med.* 2013. 5:38-51

62. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah W, *et al.* Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif.* 2003. 36(1): 59–72.
63. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, *et al.* Cancer Stem Cells in Breast: Current Opinion and Future Challenges. *Pathobiology.* 2008. 75(2): 75–84.
64. Blanpain C & Fuchs F. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat Rev Mol Biol.* 2009. 10: 207-18.
65. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell.* 2007. 131,1–12.
66. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, *et al.* Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007. 9(6):625-35
67. Takahashi K & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006. 126,663–676.
68. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007. 448(7151):313–7
69. Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature.* 2007. 448(7151):318–24.
70. Maherali N, Sridharam R, Xiw W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell.* 2007. 1(1):55–70.
71. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008. 26(1):101-6.

72. Rodda DJ, Chew J, Lim L, *et al.* Transcriptional Regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Jour Biol Chem.* 2005. 280(26):24731–37.
73. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, *et al.* Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2005. 122 :947–56.
74. Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, *et al.* Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions. *Stem Cells.* 2010. 28(1):36-44.
75. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science.* 2007. 318(5858):1917–1920.
76. Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, *et al.* "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002. 18;298(5593):597-600
77. Nacional Center for Biotechnology Information – NCBI. ENTREZ. Gene Bank. *Notch3, klf4, oct4, c-myc, sox2.* [citado em 2012 nov 05] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
78. Gearhart J, Pashos EE, Prasad MK, Pluripotency Redux: advances in stem-cell research. *N Engl J Med.* 2007. 357(15):1469.
79. Denis N, Kitzis A, Kruh J, Dautry F, Corcos D. Stimulation of methotrexate resistance and dihydrofolate reductase gene amplification by c-myc. *Oncogene.* 1991. 6(8):1453
80. Kessler JD, Kahle KT, Sun T, *et al.* A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science.* 2012. 335(6066):348–53.
81. de Alboran IM, O'Hagan RC, Gärtner F, *et al.* Analysis of C-MYC function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. *Immunity.* 2001. 14(1):45–55.

82. Jeremy T, Crossley M. Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999. 24(6) 236–40.
83. Suske G, Bruford E, Philipson S. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics*. 2005. 85(5):551–6
84. Miller I & Bieker J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Krüppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 1993. 13(5):2776–86.
85. Eaton SA, Funnell APW, Sue N, *et al.* A network of Krüppel-like Factors (Klfs). Klf8 is repressed by Klf3 and activated by Klf1 in vivo. *J. Biol. Chem.* 2008. 283(40):26937–47
86. Anderson KP, Kern CB, Crable SC, *et al.* Isolation of a gene encoding a functional zinc finger protein homologous to erythroid Krüppel-like factor: identification of a new multigene family. *Mol. Cell. Biol.* 1995. 15(11):5957–65
87. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, *et al.* Krüppel-like transcription factor KLF5 is a key regulator of adipocyte differentiation. *Cell Metabolism*. 2005. 1(1):27–39.
88. Narla G, Heath KE, Reeves HL, *et al.* KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science*. 2001. 294(5551):2563–6.
89. Geiman DE, Ton-That H, Johnson JM, Yang VW. Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(5):1106–13.
90. Hoffmeyer K, Raggioli A, Rudloff S, *et al.* Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*. 2012. 336(6088):1549–54.

91. Kim JB, Zaehres H, Wu G, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*. 2008. 454(7204):646–50.
92. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res*. 1992. 20(17):4613–20.
93. Mathis JM, Simmons DM, He X, *et al.* Brain 4: a novel mammalian POU domain transcription factor exhibiting restricted brain-specific expression. *EMBO J*. 1992. 11(7):2551–2561.
94. Rosenfeld MG, Andersen B. POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr. Rev*. 2001. 22(1):2–35.
95. Petryniak B, Thompson CB, Staudt LM, *et al.* Characterization of chicken octamer-binding proteins demonstrates that POU domain-containing homeobox transcription factors have been highly conserved during vertebrate evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1990. 87(3):1099–1103.
96. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet*. 2000. 24(4):372–6.
97. Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, *et al.* POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res*. 2003. 63(9):2244–50.
98. Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, *et al.* High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2005. 23(3):299–305.
99. Boiani M, & Schöler, HR. Regulatory Networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005. 6:872-881

100. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2007. 448(7151):313–317.
101. Wernig M, Meissner A, Foreman R, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007. 448(7151):318–324.
102. Maherali N, Sridharan R, Xie W, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007. 1(1):55–70.
103. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, *et al.* Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. *Cell*. 2009. 136(3):411–419.
104. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*. 2005. 121(3):465–77.
105. Bowles J, Schepers G, Koopman P. Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*. 2000. 227(2):239–55
106. Johansson H & Simonsson S. Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination. *Aging*. 2010. 2(11):815–22.
107. Chambers I, Tomlinson SR. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development*. 2009. 136(14):2311–22.
108. Imamura M, Miura K, Iwabuchi K, *et al.* Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev. Biol*. 2006. 6:34.

109. Tay Y, Zhang J, Thomson AM, *et al.* MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature*. 2008. 455(7216):1124–8.
110. Rizzino A. Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009. 1(2):228–36.
111. Lu Y, Futtner C, Rock JR, *et al.* Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PLoS ONE*. 2010. 5(6):e11022.
112. Kregel S, Kiriluk K, Rosen A, *et al.* Sox2 Is an Androgen Receptor-Repressed Gene That Promotes Castration-Resistant Prostate Cancer. *PLoS ONE*. 2013. 8(1):e53701
113. Tani Y, Akiyama Y, Fukamachi H, *et al.* Transcription factor SOX2 up-regulates stomach-specific pepsinogen A gene expression. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. 2007. 133(4):263–9.
114. Hussenet T, Dali S, Exinger J, *et al.* SOX2 is an oncogene activated by recurrent 3q26.3 amplifications in human lung squamous cell carcinomas. *PLoS ONE*. 2010. 5(1):e8960.
115. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009. 460(7251):118–22.
116. Artavanis-Tsakonas, Spyros *et al.* Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science*. 1999. 284(5415):770–776.
117. Brou C, Logeat F, Gupta N, *et al.* A novel proteolytic cleavage involved in notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol. Cell*. 2000. 5(2):207–16.

118. Gaiano N & Fishell G. The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002. 25(1):471–90.
119. Bolós V, Grego-Bessa J, de la Pompa JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocr. Rev.* 2007. 28(3):339–63.
120. Aguirre A, Rubio ME, Gallo V. Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature.* 2010. 467(7313):323–327.
121. Dontu G, Jackson KW, McNicholas E, *et al.* Role of notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. *Breast Cancer Res.* 2004. 6(6):R605–15.
122. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004. 131 (5):965–73.
123. Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, *et al.* Critical regulation of bone morphogenetic protein-induced osteoblastic differentiation by Delta1/Jagged1-activated notch1 signaling. *J. Biol. Chem.* 2005. 280(16):15842–8.
124. Laky, K & Fowlkes, BJ. Notch signaling in CD4 and CD8 T cell development. *Current opinion in immunology.* 2008. 20(2):197–202.
125. Joutel A & Tournier-Lasserre E. Notch signalling pathway and human diseases. *Cell & Devel Biol.* 1998. 9;619-625.
126. Guerreiro RJ, Lohmann E, Kinsella E, *et al.* Exome sequencing reveals an unexpected genetic cause of disease: NOTCH3 mutation in a Turkish family with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2012. 33(5):e17–23.
127. Moellering RE, *et al.* Direct inhibition of the NOTCH transcription factor complex. *Nature.* 2009. 462(7270):182–188.
128. Arora, PS & Ansari AZ. Chemical biology: A notch above other inhibitors. *Nature.* 2009. 462(7270):171–173.

129. Sharma VM, Draheim KM, Kelliher MA. "The Notch1/c-Myc pathway in T cell leukemia". *Cell Cycle*. 2007. 6(8):927–30.
130. Bellavia D, Campese AF, Checquolo S, *et al*. Combined expression of pT α and Notch3 in T cell leukemia identifies the requirement of preTCR for leukemogenesis. *PNAS*. 2002. 6(99)3788-93.
131. Nagel S, Venturini L, Przybylski GK, *et al*. NK-like homedomain proteins activate NOTCH-3-sinaling in leukemic T-cells. *BMC Cancer*. 2009. 9:371-87.
132. Ghisi M, Corradin A, Basso K, *et al*. Modulation of microRNA expression in human T-cell development: targeting of NOTCH3 by miR-150. *Blood*. 2011. 117(26):7053-62.
133. Xiang J, Ouyang Y, Cui Y, *et al*. Silencing of Notch3 using shRNA driven by surviving promoter inhibits growth and promotes apoptosis of human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cells. *Clin. Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2012. 12(1):59-65.
134. Kmdje AHN, Mosna F, Bifari F, *et al*. Notch-3 and Notch-4 sinaling rescue from apoptosis human B-ALL cells in contact with human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2010. 118(2):380-89.
135. Kocak U, Gursel T, Kaya Z, *et al*. ALL-BFM 95 treatment in Turkish children with acute lymphoblastic leukemia--experience of a single center. *Pediatric hematology and oncology*. 2012. 29(2):130-140.
136. Kamps WA, Van der Pal-de Bruin KM, Veerman AJ, *et al*. Long-term results of Dutch Childhood Oncology Group studies for children with acute lymphoblastic leukemia from 1984 to 2004. *Leukemia*. 2010. 24(2):309-319.
137. Schrappe M. Evolution of BFM trials for childhood ALL. *Ann Hematol*. 2004. 83 Suppl 1:S121-123.

138. Andrews PW. Human Teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta*. 1988. 3;948(1):17-36.
139. Mavilio F, Simeone A, Boncinelli E, Andrews PW. Activation of four homeobox gene clusters in human embryonal carcinoma cells induced to differentiate by retinoic acid. *Differentiation*. 1988. 37(1):73-9.
140. Andrews PW, Damjanov I, Simon D, *et al.* Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*. 1984. 50(2):147-62.
141. Drakulic D, Krstic A, Stevanovic M. Establishment and initial characterization of SOX2-overexpressing NT2/D1 cell clones. *Genet Mol Res*. 2012. 15;11(2):1385-400.
142. Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel, C, *et. Al.* A Stem Cell Molecular Signature. *Science*. 2002. 298, 601.
143. Gui-Qin Ling, Dong-Bo Chen, Bao-Qing Wang, Lan-Sheng Zhang. Expression of the pluripotency markers Oct3/4, Nanog and Sox2 in human breast cancer cell lines. 2012. *Oncology letters*. 4: 1264-1268
144. Zhang P, Andrianakos R, Yang Y, *et al.* Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem*. 2010. 19;285(12):9180-9
145. Sears R, Nuckolls F, Haura E, *et. al.* Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Day*. 2000. 1;14(19):2501-14
146. Guo X & Tang Y. KLF4 translation level is associated with differentiation stage of different pediatric leukemias in both cell lines and primary samples. *Clin Exp Med*. 2013. 13(2):99-107

ANEXOS

ANEXO I

Aprovação do CEP 555/11

 Andamento do projeto - CAAE - 0528.0.013.012-11 

Título do Projeto de Pesquisa
 Papel de metiltransferases protéicas no desenvolvimento e prognóstico de leucemias linfóides agudas da infância

Situação	Data Inicial no CEP	Data Final no CEP	Data Inicial na CONEP	Data Final na CONEP
Aprovado no CEP	18/10/2011 09:16:41	12/12/2011 12:25:14		

Descrição	Data	Documento	Nº do Doc	Origem
1 - Envio da Folha de Rosto pela Internet	11/10/2011 10:43:53	Folha de Rosto	FR470378	Pesquisador
3 - Protocolo Pendente no CEP	11/11/2011 09:53:42	Folha de Rosto	555/2011	CEP
4 - Protocolo Aprovado no CEP	12/12/2011 12:25:14	Folha de Rosto	555/11	CEP
2 - Recebimento de Protocolo pelo CEP (Check-List)	18/10/2011 09:16:41	Folha de Rosto	0528.0.013.012-11	CEP

 Voltar

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**Descrição do Projeto:**

Os pesquisadores envolvidos neste projeto, da Universidade de Brasília e do Hospital de Apoio de Brasília estão colaborando para a pesquisa PAPEL DE METILTRANSFERASES PROTÉICAS NO DESENVOLVIMENTO E PROGNÓSTICO DE LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS DA INFÂNCIA.

Este tipo de estudo tem como objetivo detectar novas alterações que podem estar relacionadas com a origem das leucemias e com uma melhor ou pior evolução da doença.

Você (ou seu filho) está sendo convidado a participar porque tem LEUCEMIA LINFÓIDE AGUDA. A participação no estudo é voluntária e, portanto, você ou seu filho tem toda a liberdade em decidir se deseja ou não participar do mesmo. Não há nenhuma consequência negativa caso você decida não participar. Caso você decida participar o procedimento será o seguinte.

A partir do prontuário médico serão coletados dados relativos ao esquema terapêutico e evolução da doença. Nenhum nome ou endereço será associado com sua amostra, tornando sua participação confidencial. As amostras necessárias para o estudo consistem em amostras de medula óssea que já são coletadas rotineiramente para o diagnóstico e acompanhamento da doença. O que utilizaremos para o estudo é apenas aquela quantidade que seria descartada. Dessa forma, não será feito nenhum procedimento invasivo além do que já é feito de rotina, independente desta pesquisa.

As amostras biológicas serão utilizadas apenas pelos pesquisadores envolvidos neste projeto. Todo o material coletado será armazenado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, sob os cuidados do pesquisador Luis Henrique Toshihiro Sakamoto, coordenador desta pesquisa. Se possível, você será chamado para dar sua autorização para o novo projetos. Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação de novo projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa e ou pela CONEP.

Os dados e registros relacionados a este projeto serão mantidos no Banco de Dados do Núcleo de Oncologia e Hematologia Pediátrica do Hospital de Apoio, local onde é feito seu tratamento, e somente aqueles diretamente relacionados ao projeto terão acesso aos mesmos. Em qualquer momento e por qualquer circunstância você tem toda liberdade de contatar o coordenador do projeto e requerer novos esclarecimentos ou sua retirada da pesquisa.

Caso deseje, ao término do estudo, os resultados dos exames realizados com a sua amostra (ou de seu filho(a)) poderão ser informados à você. Cabe ressaltar, no entanto, que, até o momento, nenhuma das alterações que serão pesquisadas mudará o prognóstico e nem o tratamento de sua doença. Os dados relevantes deste estudo, se encontrados, apenas serão úteis para pacientes futuros.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor entre em contato com o pesquisador responsável Luis Henrique Toshihiro Sakamoto, no Hospital de Apoio de Brasília – SAIN lote 4, telefone: (61) 3905-4688, no horário: 08:00h às 18:00h.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da SES/DF. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3325-4955.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Rubrica Responsável pelo paciente: _____

Rubrica do Pesquisador: _____

Eu (Pai, mãe, guardião legal).....
 ,.....
 CI....., CPF.....autorizo a utilização da coleta do meu filho ou
 tutelado legal uma amostra para o desenvolvimento de estudos de papel de metiltransferases
 protéicas em leucemias linfóides agudas a ser realizado nos termos como descrito acima.
 Durante a entrevista eu me senti completamente esclarecido quanto aos objetivos do trabalho de
 pesquisa e assim autorizo a coleta de uma amostra do aspirado de medula óssea.
 O pesquisador, abaixo assinado se compromete com a privacidade das informações realizadas no
 âmbito da pesquisa.

**Projeto de pesquisa: PAPEL DE METILTRANSFERASES PROTÉICAS NO DESENVOLVIMENTO
 E PROGNÓSTICO DE LEUCEMIAS LINFÓIDES AGUDAS DA INFÂNCIA**

Pesquisadores: Luis Henrique T. Sakamoto
 Fabio Pittella Silva
 Isis Maria Quezado Magalhães
 Andrea Barreto Motoyama

 Assinatura do Coordenador da Pesquisa
 Luis Henrique T. Sakamoto

 Assinatura do paciente ou de seu representante legal

Dados do representante legal:

Nome: _____

CI: _____

CPF: _____

Grau de parentesco: _____

Telefone Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal: (61)
 3325-4955.

ANEXO III

Tabela com valores dos CTs obtidos na reação de PCR em tempo real a partir de média da triplicata dos CTs brutos.

Tabela 16: Valores médios de CTs obtidos nas reações de PCR em tempo real.

Amostra	β -Actina	<i>c-myc</i>	<i>klf4</i>	<i>oct4</i>	<i>sox2</i>	<i>notch3</i>
78**	22,19771	28,43175	31,55278	33,01968	40,00000	35,41515
20	26,95241	32,40597	27,39430	35,77905	40,00000	40,00000
33	24,52193	29,88109	32,12597	35,68419	35,93332	26,73464
35	24,08991	24,97290	28,72379	32,07896	31,05082	34,26280
36	23,35181	28,53254	28,03587	32,37291	34,62143	31,91177
46	24,26302	29,34589	31,55409	33,30254	32,14003	31,20932
49	25,92472	29,23726	25,34631	34,40218	40,00000	40,00000
50	23,61702	27,53943	27,03838	32,29304	34,63630	31,39342
54	23,58166	29,06382	33,24250	32,56378	40,00000	36,76239
58	23,69440	32,09889	30,65826	32,53378	35,59213	28,69240
59	23,06782	27,55510	28,83142	28,82768	26,71578	28,09908
60	22,92406	28,97533	29,37259	33,72461	35,25616	27,23193
62	23,88146	27,39495	32,91998	33,19272	34,78158	25,93632
66	23,45199	28,98092	31,27706	33,16678	35,52750	28,18552
67	23,77504	29,03312	30,18748	32,67287	34,39840	34,17691
70	23,23410	28,28143	25,45597	32,12304	35,38856	36,33473
72	24,40880	28,68444	29,31921	33,53600	40,00000	35,74151
86	21,35782	26,61003	27,49483	30,93061	34,82351	35,91870
87	18,84165	23,55403	30,44770	29,92230	30,78395	26,87442
88	23,83902	26,87079	28,31587	32,92632	40,00000	34,60954
89	25,55053	29,45339	34,72666	33,05561	40,00000	36,87830
90	23,55587	28,44820	28,10013	33,69006	40,00000	34,64541
95	22,97570	24,84581	28,98989	30,31168	34,55895	30,22552
96	22,75394	29,93595	28,94061	32,64999	40,00000	36,63185
98	22,72057	26,32866	32,10240	31,56157	35,11136	31,61713
100	24,10487	29,83788	31,08771	33,69532	35,82663	34,13590
103	24,27968	29,98009	26,72728	32,46334	34,03222	33,62043

104	23,24115	29,43736	29,21927	33,12405	36,44101	28,94287
105	23,12432	27,97732	32,74030	30,84360	29,78250	28,60253
108	22,77079	27,00939	29,94769	32,06237	35,68396	31,07339
110	24,45491	25,39127	31,61405	32,77158	32,43106	23,27089
114	24,16950	25,92905	30,76450	31,82612	34,10516	30,35077
119	22,67544	26,76103	30,41439	32,52400	34,91611	27,81939
123	24,59175	29,80738	30,43017	32,54541	40,00000	32,08218
126	23,82823	28,76502	30,44919	32,00524	35,08469	32,91679
128	22,88263	28,87021	28,88587	32,23963	33,72990	32,98651
136	22,85336	27,56504	26,99589	31,84026	35,36831	32,99497
147	23,99933	28,33121	29,73542	34,29057	35,60156	34,15914
292	23,26509	29,54019	31,23556	33,06680	40,00000	29,65532
313	22,62300	25,27674	28,12270	30,88778	33,37557	34,35486
316	23,49289	29,87063	31,51827	33,15991	36,50769	30,35056
322	21,74239	20,16408	29,51785	25,42472	22,76077	31,43956
331	21,37895	25,68209	23,36375	23,69696	22,03692	33,50528
333	22,76243	22,14171	22,14268	26,86710	28,46725	27,66027
NT2	25,85146	33,58873	34,42271	29,03034	25,21851	26,85783
REH	23,83406	24,97802	40,00000	33,51189	36,42278	35,53192