

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

INFLUÊNCIA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ZHX NO PROGNÓSTICO
DAS LEUCEMIAS CRÔNICAS

NATÁLIA IOSEPH GLADISTONE MACIEL

Brasília

2021

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

INFLUÊNCIA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ZHX NO PROGNÓSTICO
DAS LEUCEMIAS CRÔNICAS

NATÁLIA IOSEPH GLADISTONE MACIEL
ORIENTADOR: PROF. DR. FELIPE SALDANHA DE ARAÚJO
COORIENTADOR: PROFA. DRA. FABIANA BRANDÃO ALVES SILVA

Dissertação apresentada ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Brasília

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Gi Gladistone Maciel, Natália Ioseph
Influência dos membros da família ZHX no prognóstico das leucemias crônicas / Natália Ioseph Gladistone Maciel; orientador Felipe Saldanha de Araujo; co-orientador Fabiana Brandão Alves Silva. -- Brasília, 2021.
80 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2021.

1. leucemias crônicas. 2. gene ZHX. 3. epigenética. 4. leucemia mielóide crônica. 5. leucemia linfóide crônica. I. Saldanha de Araujo, Felipe, orient. II. Brandão Alves Silva, Fabiana, co-orient. III. Título.

NATALIA IOSEPH GLADISTONE MACIEL

INFLUÊNCIA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ZHX NO PROGNÓSTICO
DAS LEUCEMIAS CRÔNICAS

Dissertação apresentada à Universidade de
Brasília, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, para a obtenção do título de
Mestre.

Aprovada em ___ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira - UcB

Prof. Dr. Rodrigo Haddad - UnB

Prof. Dr. (suplente) – Angélica Amorim Amato - UnB

Brasília

2021

Você não é o dinheiro que tem. Você não é o seu diploma, seu currículo e nem o carro da sua garagem, Você é o sorriso que entrega, a mão que estende, o abraço que dá. Você é o amor que espalha!
(Autor Desconhecido)

Dedico esse trabalho ao meu avô Ely, que faleceu devido a COVID 19.

AGRADECIMENTOS

Gratidão! Não existe palavra que defina melhor esse amadurecimento chamado mestrado. Agradeço primeiramente a Deus e todos os seres de luz que me acompanharam e me abençoaram para chegar até aqui. Tenho consciência que todo amparo, proteção, força, saúde, dificuldade e conquista foi baseado em plano maior, onde cada dia em sua particularidade eu me lapidei.

Agradeço a minha família por entender os meus sonhos e todos passos que precisaram ser dados para que eu chegasse até eles. Agradeço os meus pais, por me apoiarem, me amarem, me entenderem e de uma forma tão única foram alicerce para que eu chegasse onde cheguei. Meu querido pai, Ricardo Marto, e minha amada mãe, Walkíria Gladistone e meus irmãos Ricardo e Victhor Gladistone, vocês não têm ideia de como essa conquista é de vocês. Cresci ouvindo que vocês estavam investindo para que a nossa família mudasse o curso da história. E hoje, graduada e finalizando uma pós, eu entendo que isso não era sobre títulos, mas sim, sobre ter o poder de escolher. Eu escolho, compartilhar esse fim de ciclo com vocês, como sempre foi, para que entendam mais uma vez que eu sou o reflexo das suas escolhas e eu o amo e honro tudo que precisaram abrir mão para que eu chegasse aqui.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Felipe Saldanha, por me aceitar como aluna e me ensinar tanto nesses dois anos de mestrado. Me trouxe crescimento acadêmico, pessoal, emocional e me colocou diante de mim mesma diversas vezes para que eu entendesse o meu real valor e o quanto eu tenho capacidade de crescer e me desafiar. Obrigada, de coração, por me ensinar tanto sobre mim e sobre o quanto eu posso ser efetiva e o real valor da área acadêmica e de todo o esforço da pesquisa. Ser uma “Guria” foi uma etapa muito marcante para mim, onde dia após dia eu entendi o quanto eu posso me melhorar, que estudar nunca é demais. E, principalmente, que o valor do nosso trabalho sempre será recompensado.

Agradeço também minha co-orientadora, Dra. Fabiana Brandão, por acreditar em mim

e me apresentar a vida acadêmica com tanta gentileza e amor. Aprendi muito desde que tive contato e hoje consigo ver o meu propósito e o quanto eu posso fazer do mundo um lugar melhor através da ciência.

Com muito amor, quero agradecer aos meus amigos de laboratório, Amandda Evelin, Daniel Costa e Marielly Resende, por estarem comigo nessa jornada e me ensinarem tanto. Em especial, Luma Filiiu, que me adotou diariamente e me ensinou todos os passos para que a minha pesquisa pudesse acontecer. Vocês foram de suma importância para que esse momento se realizasse. Obrigada pelas risadas, desesperos, ensinamentos, trocas de protocolos e muitas e muitas idas ao amarelinho.

É muito difícil definir dois anos e mais ainda listar todos aqueles que foram importantes para que essa etapa se concluísse. Com isso, agradeço de forma geral e muito carinhosa, ao laboratório Farmol, laboratório de Nutrição, o LTMAC e todos os seus respectivos alunos e professores. Agradeço a todos profissionais da pós-graduação, reitoria, mantenedores da UNB e todos professores que lecionaram alguma disciplina que de forma direta ou indireta marcaram o meu projeto. Faço uma extensão desse agradecimento a agência de Fomento – CAPES, que me concedeu uma bolsa de estudos por cerca de 12 meses do mestrado.

Agradeço meus familiares por me acompanharem, em especial meu tio Gleydson que sempre foi minha inspiração acadêmica para que eu entendesse que padrões devem ser quebrados e que todo limite é apenas um lugar onde você escolhe estar. Agradeço meus avós, meus tios e tias, primos e amigos, que foram peças de um enorme quebra-cabeça chamado vida.

Para finalizar, gostaria de agradecer todo o amadurecimento e crescimento que o mestrado me trouxe. Aprendi que não é sobre resultados, artigos, congressos ou reuniões. É sobre amor. Amor manifestado diariamente em prol de uma ciência silenciosa, não reconhecida e muitas vezes até mesmo covarde. É sobre tentar e não desistir, sobre saber a hora de começar, continuar e também sobre parar. É sobre ver nos pequenos detalhes e sobre ser feliz em todo o processo.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	13
RESUMO	14
ABSTRACT.....	16
I – INTRODUÇÃO	18
1. INTRODUÇÃO	19
Características gerais das leucemias crônicas.....	19
1.2 Leucemia mielóide crônica.....	20
1.2.1 Epidemiologia da LMC	20
1.2.2 Fisiopatologia da LMC	21
1.2.3 Bases moleculares da LMC	23
1.2.4 Fases clínicas da LMC.....	26
1.3 Leucemia linfóide crônica.....	31
1.3.1 Epidemiologia da LLC.....	31
1.3.2 Fisiopatologia da LLC	31
1.3.3 Diagnóstico e estadiamento clínico da LLC.....	35
1.3.4 Marcadores prognósticos da LLC.....	37
1.4 Família ZHX e o câncer.....	39
II - OBJETIVOS.....	42
2. OBJETIVOS	43
2.1 Geral:	43
2.1 Específicos:.....	43
2.1.1 Leucemia mielóide crônica.....	43
2.1.2 Leucemia linfóide crônica.....	43
III - MATERIAIS E MÉTODOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1. Casuística.....	45
3.2. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP).....	46
3.3. Citometria de fluxo	46
3.4. Citogenética	46

3.5.	Extração do RNA e transcrição reversa	47
3.6.	PCR em tempo real	48
3.7.	Análise <i>in silico</i> na plataforma <i>Bloodspot</i>	48
3.8.	Análise estatística	49
IV -	RESULTADOS.....	50
4.	RESULTADOS	51
4.1	Leucemia mielóide crônica	51
4.1.1	Características clínico-laboratoriais da coorte estudada	51
4.1.2	Expressão da família ZHX na leucemia mielóide crônica.....	51
4.1.3	Associação entre a expressão diferencial dos genes da família ZHX com fases da doença, tratamento utilizado e resposta ao tratamento.	52
4.1.4	Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e o índice de Sokal.	54
4.1.5	Associação <i>in silico</i> da expressão dos genes ZHX na LMC em comparação com amostras de medula óssea saudável	54
4.1.6.	Correlação entre os genes ZHX na LMC.....	56
4.2	Leucemia linfóide crônica.....	56
4.2.1	Características clínico-laboratoriais da coorte estudada	56
4.2.2	Expressão da família ZHX na leucemia linfóide crônica	59
4.2.3	Associação entre a expressão dos genes da família ZHX com a leucometria e a contagem de plaquetas	60
4.2.4	Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e a expressão da proteína ZAP-70 em pacientes com LLC	61
4.2.5	Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e o cariótipo dos pacientes com LLC	61
4.2.6	Avaliação <i>in silico</i> da expressão dos genes ZHX na LLC em comparação com amostras de medula óssea saudável	63
4.2.7	Correlação entre os genes ZHX na LLC.....	64
V -	DISCUSSÃO.....	65
VI -	CONCLUSÃO	70
VII -	REFERÊNCIAS	72
VIII -	ANEXOS	81

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema geral de hematopoiesePg 19.
- Figura 2.** Representação dos genes ABL e BCR no cromossomo FiladélfiaPg 22.
- Figura 3.** Diagrama dos genes da família ZHX.Pg.40
- Figura 4.** Expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC e indivíduos saudáveis.....Pg 52.
- Figura 5.** A expressão dos genes da família ZHX de acordo com a fase da LMC.....Pg 52.
- Figura 6.** Expressão diferencial dos genes ZHX se associado a resistência ao tratamento: fármaco utilizado.....Pg 53.
- Figura 7.** Expressão diferencial dos genes ZHX de acordo com a resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe.....Pg 54.
- Figura 8.** Associação da expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 conforme o índice de Sokal.....Pg 54.
- Figura 9.** Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC, com a sonda de maior intensidade, na LMC e em medula óssea controle.....Pg 55.
- Figura 10.** Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC, com a sonda de menor intensidade.....Pg 56.
- Figura 11.** Correlação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 quando expressos na LMC..... Pg 56.
- Figura 12.** Expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC e em células B controle.....Pg 59.
- Figura 13.** Associação da expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de casos

conforme o estadiamento de Binet.....Pg 59.

Figura 14. Associação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de leucócitos em pacientes com LLC.....Pg 60.

Figura 15. Associação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de plaquetas em pacientes com LLC.....Pg 60.

Figura 16. Associação entre o padrão de expressão de ZAP-70 e a expressão dos ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC.....Pg 61.

Figura 17. Associação entre a expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o cariótipo dos pacientes com LLC.....Pg 62.

Figura 18. Associação entre a expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de alterações cromossomicas em pacientes com LLC.....Pg 62.

Figura 19. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC, com a sonda de maior intensidade, na LLC e em medula óssea controle.....Pg 63.

Figura 20. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC, com a sonda de menor intensidade, na LLC e em medula óssea controle..... Pg 64.

Figura 21. Correlação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 quando expressos na LLC..... Pg 64.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos genes BCR – ABL e suas características	Pg 24.
Tabela 2. Comparação das três classificações da LMC em fase acelerada	Pg 28.
Tabela 3. Sistema de estadiamento de Rai (1975)	Pg 36.
Tabela 4. Sistema de estadiamento de Binet (1981)	Pg 37.
Tabela 5. Primers utilizados no estudo.....	Pg 48.
Tabela 6. Características clínicas e gerais dos pacientes.....	Pg 58.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: *Abelson murine leukemia* (inglês);
BCR: *Breakpoint cluster region* (inglês);
CB: Crise blástica da leucemia mielóide crônica;
CMSP: Células Mononucleares do Sangue Periférico;
cDNA: DNA complementar;
Del: Delação do braço cromossômico;
dL: Decilitro;
DNA: Desoxiribonuclease;
ddCt: algoritmo para cálculo de resultados da PCR em tempo real;
DEPC: reagente dietil pirocarbonato;
Domínio SH1: região da enzima responsável pelo domínio catalítico ;
Domínio VL: variável leve do anticorpo;
Domínio VH: variável pesada do anticorpo;
EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid* (inglês);
FISH: Hibridização fluorescente *in situ*;
Fração Fc: cristal fraction / primeira fração do anticorpo;
GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (inglês);
GDP: Trifosfato de guanosina;
GTP: Difosfato de guanosina ;
Hb: Hemoglobina;
HDs: homeodomínios;
IBMTR: *International Blood and Marrow Transplantation* (inglês);
Igs: Imunoglobulina de superfície;
IgVH: Região variável da cadeia pesada da imunoglobulina;
IHB: Instituto Hospital de Base;
Kb: unidade de medida quilobyte/kilobyte;
LLA: leucemia linfocítica aguda ;
LLC: leucemia linfóide crônica;
LMC: leucemia mielóide crônica;
M-bcr: *major breakpoint cluster region*;
m-bcr: *minor breakpoint cluster region*;
MDACC: *M.D. Anderson Cancer Center* (inglês);
NF-YA: *Nuclear transcription factor Y subunit alpha* (inglês);
NF-YB: *Nuclear transcription factor Y subunit beta* (inglês);
NF-YC: *Nuclear transcription factor Y subunit gamma* (inglês);
Pb: Pares de Base;
PBS: Tampão fosfato-salino;
PCR: Reação em cadeia da polimerase;
Ph: cromossomo Philadelphia;
Ras: proteínas ativadoras de GTPase catalisam a hidrólise do GTP para GDP
RNA: Ribonuclease;
Rpm: Rotações por minuto;
RT-PCR: PCR em tempo real;
SBF: Soro fetal bovino;
TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido;
Zap70: Proteína Cinase 70 kda associada a cadeia Zeta;
ZHX: *Zinc Fingers and Homeobox* (inglês)
 μ -bcr: *micro-breakpoint cluster region* (inglês)

RESUMO

MACIEL, Natália Ioseph Gladistone. INFLUÊNCIA DOS MEMBROS DA FAMÍLIA ZHX NO PROGNÓSTICO DAS LEUCEMIAS CRÔNICAS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

As leucemias crônicas podem ser diferenciadas de acordo com sua linhagem hematopoiética, sendo linfóide (leucemia linfóide crônica, LLC), ou mielóide (leucemia mielóide crônica, LMC). A LLC e a LMC são doenças progressivas, que se desenvolvem de formas distintas e possuem marcadores prognósticos bem específicos, os quais envolvem alterações clínico-laboratoriais, anormalidades cromossômicas e a expressão anômala de proteínas intracelulares e de membrana. Atualmente, diversos estudos têm sido desenvolvidos com foco em investigar a importância de mecanismos epigenéticos no desenvolvimento e/ou progressão do câncer. Dentre esses mecanismos epigenéticos, existem aqueles com características silenciadoras, como ocorre, por exemplo, por ação dos *Zinc Fingers and Homeobox* (ZHX). Alguns estudos reportam que a família ZHX se encontra alterada no carcinoma hepatocelular e em doenças hematológicas, como o mieloma múltiplo. Nesse estudo, investigamos o nível de expressão dos genes da família ZHX nas LLC e LMC, e se esses genes exercem algum impacto nas características clínico-laboratoriais e prognósticas dessas leucemias. Identificamos que os genes da família ZHX encontram-se com expressão diminuída na LMC, quando comparados as amostras controle de doadores hematologicamente saudáveis. Entretanto, o nível de expressão desses genes não mostrou qualquer associação com a fase da doença, com o tratamento com inibidores de tirosina quinase ou associados as respostas terapêuticas. Não encontramos diferença na expressão dos genes da família ZHX entre amostras de LLC e amostras controle, entretanto, as amostras com menor expressão de ZHX1, ZHX2

e ZHX3 mostram maior número de células leucemicas e alteração no padrão cariotipico, indicando pior prognóstico. Nossos dados sugerem que os genes da família ZHX podem exercer algum impacto no desenvolvimento da LMC e que a expressão desses genes pode representar um potencial biomarcador prognóstico na LLC. Novos estudos são necessários para validar nossos achados e para caracterizar molecularmente a instabilidade cromossômica na LLC decorrente da baixa expressão dos genes da família ZHX.

Palavras-chave: Leucemias crônicas, Leucemia Linfóide Crônica, Leucemia Mielóide Crônica, epigenética, ZHX, BCR-ABL, ZAP-70.

ABSTRACT

MACIEL, Natália Ioseph Gladistone. INFLUENCE OF MEMBERS OF THE ZHX FAMILY ON THE PROGNOSIS OF CHRONIC LEUKEMIA. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.

Chronic leukemias can be differentiated according to their hematopoietic lineage, being lymphoid (chronic lymphoid leukemia, LLC), or myeloid (chronic myeloid leukemia, CML). LLC and CML are progressive diseases that develop in different ways and have very specific prognostic markers, which involve clinical and laboratory changes, chromosomal abnormalities, and anomalous expression of intracellular and membrane proteins. LLC and CML are progressive diseases that develop in different ways and have very specific prognostic markers, which involve clinical and laboratory changes, chromosomal abnormalities, and anomalous expression of intracellular and membrane proteins. Currently, several studies have been developed with a focus on investigating the importance of epigenetic mechanisms in the development and/or progression of cancer. Among these epigenetic mechanisms, there are those with silencing characteristics, as occurs, for example, through the action of Zinc Fingers and Homeobox (ZHX). Some studies report that the ZHX family is altered in hepatocellular carcinoma and hematological diseases, such as multiple myeloma. In this study, we investigated the level of expression of the ZHX family genes in LLC and LMC, and whether these genes have any impact on the clinical, laboratory, and prognostic characteristics of these leukemias. We identified that the genes of the ZHX family are found to have reduced expression in CML when compared to control samples from hematologically healthy donors. However, the level of expression of these genes did not show any association with the stage of the disease, with treatment with tyrosine kinase inhibitors, or associated with therapeutic

responses. On the other hand, we found no difference in the expression of the ZHX family genes between LLC and control samples, however, samples with lower expression of ZHX1, ZHX2, and ZHX3 show a higher number of leukemic cells and alteration in the karyotype pattern favoring a worse prognosis. Our data suggest that the genes of the ZHX family may have some impact on the development of CML and that the expression of these genes may represent a potential prognostic biomarker in CLL. Further studies are needed to validate our findings and to molecularly characterize the chromosomal instability in CLL due to the low expression of the ZHX family genes.

Keywords: Chronic leukemias, Chronic Lymphoid Leukemia, Chronic Myeloid Leukemia, epigenetics, ZHX, BCR-ABL, ZAP-70.

1. INTRODUÇÃO

Características gerais das leucemias crônicas

As leucemias crônicas apresentam como principais características a sua origem a partir de precursores hematopoiéticos de linhagem linfóide ou mielóide (Figura 1) e a capacidade inalterada de diferenciação do clone neoplásico, evidenciando o acúmulo de células maduras na medula óssea e no sangue periférico (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008). A progressão das leucemias crônicas é considerada lenta quando comparada às leucemias agudas, apresentando um prognóstico menos agressivo e com a capacidade terapêutica controlável e/ou curável (ZAGO, 2001).

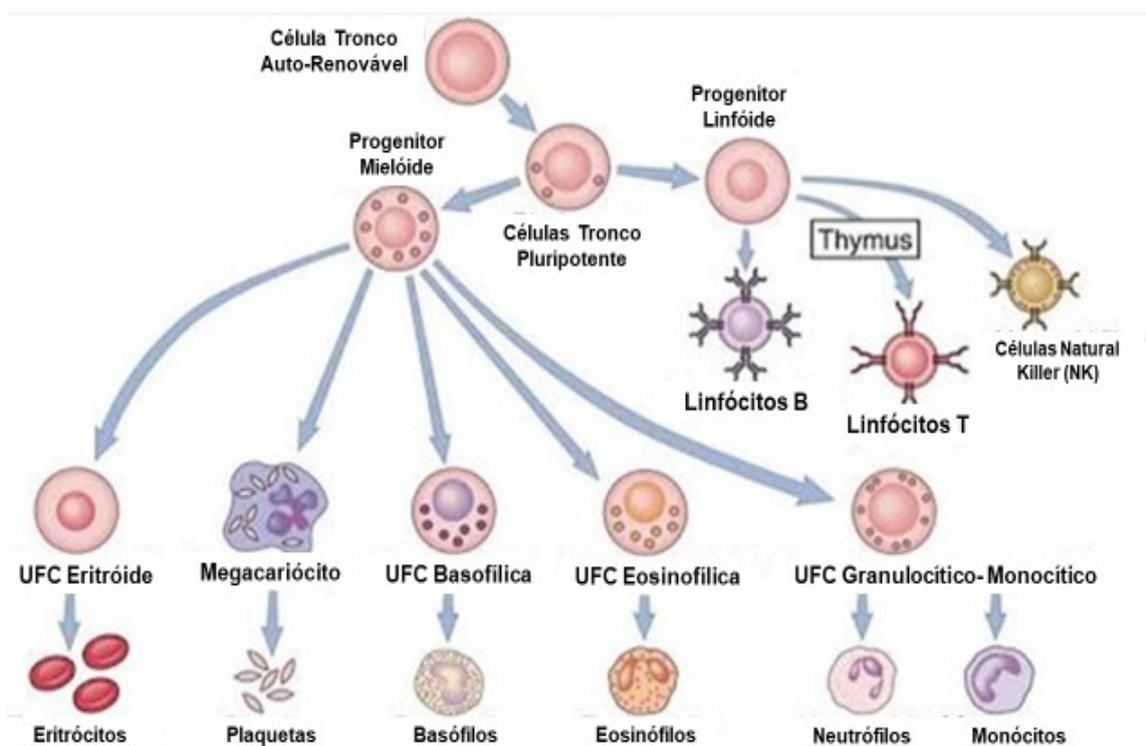


Figura 1. Esquema geral de hematopoiese Diferenciação de células de origem mielóide e linfóide. (Adaptado de ABBAS, LICHTMAN & POBBER. CELLULAR AND MOLECULAR IMMUNOLOGY. W.B. SOUDERS, 1999 FIG 2-7).

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica clonal, e apresenta como características básicas: leucocitose, esplenomegalia e presença

do cromossomo Philadelphia (Ph). Essa alteração cromossomal resultante de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9q34 e 22q11, origina uma proteína híbrida, com função oncogênica, chamada BCR-ABL.

A presença da proteína BCR-ABL é um fator determinante para o diagnóstico da LMC, sendo que ela está presente em 95% a 98% dos casos. Essa proteína resultante possui elevada atividade tirosina quinase (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008). Sendo que, sua atividade estimula a proliferação celular e promove a inibição da apoptose. Com o melhor conhecimento das funções de BCR-ABL foi possível compreender melhor o processo fisiopatológico da doença e desenvolver terapias direcionadas ao controle e correção desse defeito molecular (BORTOLHEIRO; CHIATTONE, 2008; TEFFERI et al., 2005).

A leucemia linfóide crônica (LLC) apresenta algumas similaridades com a LMC, mas é uma doença linfoproliferativa caracterizada pelo acúmulo de linfócitos B maduros no sangue periférico, medula óssea, baço e nódulos linfáticos (GOMES et al., 2017).

A LLC é considerada uma doença heterogênea. Diferentemente da LMC, onde tem-se um processo progressivo, na LLC os pacientes podem apresentar quadros clínicos sutis e com prognóstico favorável ou podem apresentar uma manifestação grave, de rápida evolução e com difícil controle terapêutico. Esse limiar prognóstico é apresentado a partir de uma correlação clínica, onde a presença de mutações somáticas é determinante para o desencadamento fisiopatológico da doença (GARICOCHEA, 2005).

1.2 Leucemia mielóide crônica

1.2.1 Epidemiologia da LMC

A LMC incide em um a dois indivíduos para cada 100 mil habitantes/ano e representa cerca de 15% dos casos de todas as leucemias no hemisfério ocidental. A mediana de idade

dos pacientes com LMC ao diagnóstico se encontra entre 55 a 60 anos, sendo que em menos de 10% dos casos os pacientes possuem menos de 20 anos (CAGNETTA et al., 2014). O desenvolvimento clínico desse câncer é dividido em três fases: fase crônica, fase acelerada e a crise blástica. A LMC apresenta leve predominância em pacientes do sexo masculino sobre o sexo feminino (TEFFERI et al., 2005).

1.2.2 Fisiopatologia da LMC

A LMC deriva de uma desordem clonal da célula-tronco hematopoiética caracterizada pela translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 (Cr9-q) e 22 (Cr22-q) (Figura 2), dando origem ao cromossomo Philadelphia, em alusão ao local em que ele foi descrito (ROWLEY JD, 1973).

A presença do cromossomo Ph foi a primeira alteração cromossômica estrutural descrita na literatura, quando associada e categorizada a um tipo de câncer específico. Esse rearranjo é conhecido como o principal marcador molecular da LMC, sendo que a presença dessa translocação já tem como característica a pré-disposição de condução da célula ao fenótipo neoplásico (NOWELL, P. et al., 1960).

Existem diferentes pontos de quebra nas sequências BCR e ABL, o que pode originar diferentes produtos oncogênicos, no entanto a sua presença é responsável por várias alterações no curso normal do ciclo celular, promovendo a leucemogênese (JOHANSSON et al., 2002). O gene híbrido ABL-BCR, no cromossomo 9 (9q+), apesar de possuir transcrito detectável, não tem função conhecida e em algumas linhagens celulares ocorre sua deleção, até o momento, sem correlação com o prognóstico das leucemias (APPERLEY JF, 2015).

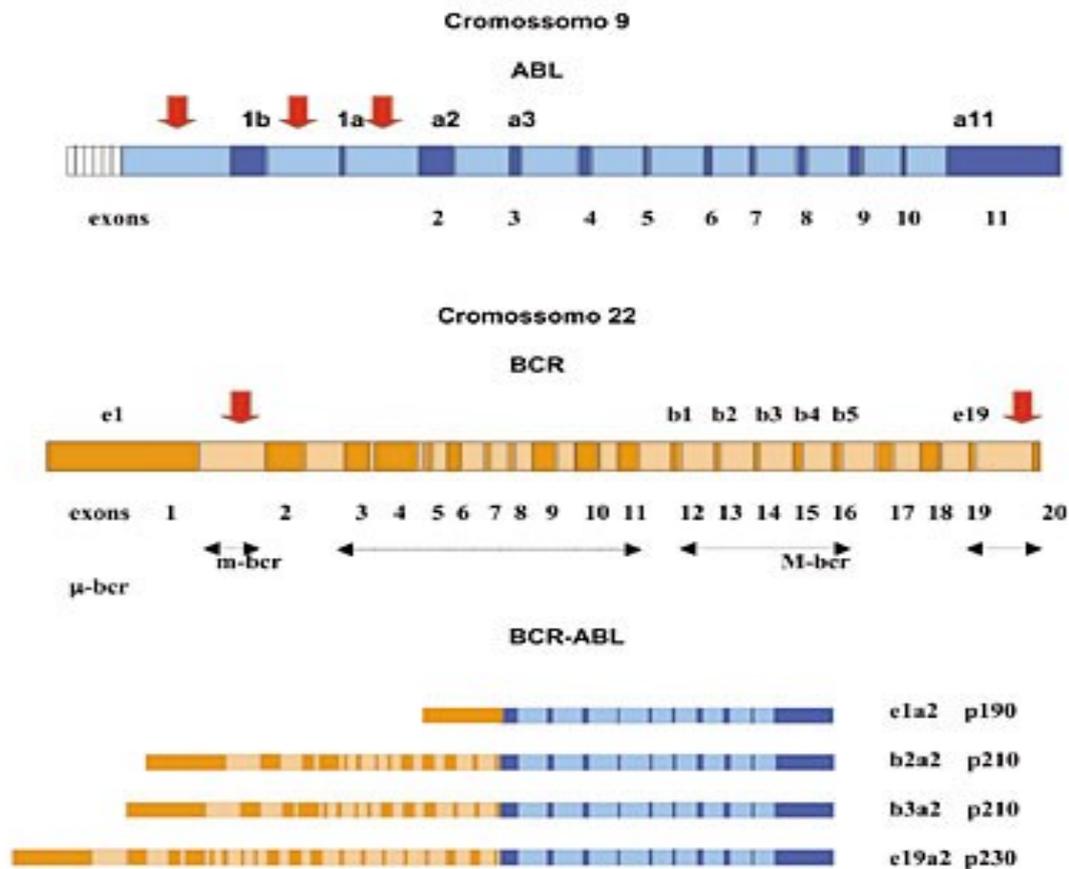


Figura 2. Representação dos genes ABL e BCR no cromossomo Filadélfia. Os éxons estão representados pelas cores azul e laranja escuros nos genes ABL e BCR, respectivamente. Os introns estão em cores azul e laranja claros. As quebras no ABL, ilustradas pelas setas vermelhas, ocorrem acima do exon 1b, entre 1a e a2. Os pontos de quebra no BCR usualmente ocorrem dentro de uma das 3 regiões indicadas pelas duplas setas horizontais. Abaixo, a estrutura de vários RNAm transcritos BCR/ABL e suas respectivas proteínas, os quais são formados de acordo com a posição de ponto de quebra no BCR. (Adaptado de MELO et al, 1996).

No entanto, sabe-se que atuação destas proteínas está diretamente ligada aos diferentes fenótipos leucêmicos, sendo responsáveis por modificações em vias intracelulares, como da proteína Ras; desregulação de fatores de crescimento; resistência ao processo de morte celular programada; e instabilidade genômica (APPERLEY JF,2015).

O gene ABL codifica uma tirosina quinase que fosforila substratos proteicos via domínio SH1, e desse modo se relaciona aos processos de proliferação, adesão celular e resistência a apoptose. A formação da proteína híbrida BCR-ABL leva a perda de controle nessas funções celulares, devido a autonomia dessa proteína de fusão em se autofosforilar e ativar uma série de proteínas e vias de sinalização (BURKE BA, CARROL, BA., 2010;

APPERLEY JF, 2015). No caso das funções gerais do BCR, estão relacionadas com a sinalização intracelular, sendo conhecido como um dos principais sinalizadores do sistema eucariótico (Di BACCO A., 2000).

1.2.3 Bases moleculares da LMC

Como já foi dito anteriormente, a LMC é marcada pela presença do onco-gene qumérico BCR-ABL (KURZROCK et al., 2003). A região codificante do gene ABL, origina dois transcritos, sendo que um com o tamanho de 6kb (kilobases) e o outro 7kb, ambos traduzem a proteína p145abl. A região de maior potencial de quebra, é o éxon a1 e a2, onde íntron da região tem cerca de 18.538pb (FADERL et al., 1999).

As duas isoformas proteicas originárias no éxon a1, devido a um *splicing* alternativo, uma com 26 aminoácidos e a outra com 45 aminoácidos, (ARANA-TREJO, R., 2002) podem ser encontradas no citoplasma celular, atuantes na maturação das células hematopoiéticas e também no núcleo celular, com o papel de regulação da atividade da tirosina quinase, fundamental no ciclo celular (KONOPKA et al., 1985; KURZROCK et al., 2003).

O outro gene de formação é o BCR, o qual está localizado no braço longo do cromossomo 22, na região 22q11, onde também estão *locus* de alguns pseudogenes BCR2,BCR3 e BCR4, todos eles consideradas cópias da porção 3 do gene BCR. O gene BCR tem um tamanho de 135kb, sendo que o maior de todos os éxons presentes, que são 23, é o primeiro com 1728pb (Di BACCO A., 2000).

O éxon com maior extensão abriga domínios importantes na estrutura e funcionamento proteico, sendo eles de: oligomerização e de serina treonina quinase. Os dois produtos principais do BCR, p160bcr e p130bcr (Tabela 1), atuam no controle de maturação de precursores mielóides, mediação de GAPs (*GTPase Activating Protein*), controle de hidrólise de GTP (guanossinas) e na conversão da forma ativa da proteína Ras para a forma GTP-inativa (KURZROCK et al., 2003).

Tabela 1. Relação dos genes BCR–ABL e suas características.

CARACTERÍSTICAS	BCR	ABL	BCR-ABL
Localização Cromossômica	22q11	9q34	22q11
Tamanho do Gene	130 kb	230 kb	Variável
Número de éxons/introns	23/22	11/10	Variável
RNA mensageiro	4.5 e 6.7kb	6.0 e 7.0 kb	7.0; 8.5 e 9.0 kb
Peso molecular dos produtos (em kDa)	130 e 160	145	190; 210 e 230
Principais produtos	p130 ^{bcr} e p160 ^{bcr}	p145 ^{abl}	p190 ^{bcr-abl} ; p210 ^{bcr-abl} e p230 ^{bcr-abl}

Fonte: Adaptado de KURZROCK et al. (2003).

O proto-oncogene ABL faz junção com o BCR, em três possíveis regiões: M-bcr, mbcr e μ -bcr. A região M-bcr, está localizada na região central do gene BCR, onde são encontrados os éxons b1 a b5. Essa região possui uma fragilidade nos éxons b2 e b3 e, em caso de quebra, ocorre a formação da fusão b2a2 ou o *splicing* alternativo no éxon b3, formando a fusão b3a2. proteína resultante desse transcrito é chamada p120bcr-abl, que provoca o fenótico de malignidade neoplásica da LMC, promovendo a mieloproliferação e o aumento da atividade tirosina quinase (ARANA-TREJO., 2002).

A região mbcr, onde se encontram os éxons e1 e e2, pode ser alvo do rearranjo com o gene ABL, dando origem a proteína p190bcr-abl. (FADERL et al., 1999). O fenótipo brando originário do rearranjo t(9;22) é o da fusão com a região μ -bcr, entre os éxons 19 e 20, denominando uma região c3 e c4. Esse transcrito originário, p230bcr-abl, tem uma incidência de apenas 5% e apresenta o melhor prognóstico entre os descritos, causando anemia branda, baixa proporção de granulócitos imaturos, hepatoesplenomegalia branda, expansão de neutrófilos maduros e, em casos raros, ocorre evolução para fase aguda (ADVANI A S, PENDERGAST, 2002).

A instabilidade genômica causada pelo rearranjo BCR-ABL favorece o aparecimento

de mutações que acabam desregulando ainda mais o ciclo celular (JOHANSSON et al., 2002). Além disso, esse rearranjo leva a alterações de vias bioquímicas como a de Ras, inibe a morte celular programada (apoptose) e promove a perda de adesão das células ao estroma da medula óssea (DEININGER et al., 2000).

Um dos processos homeostáticos afetados com os produtos químeros do BCR-ABL é o equilíbrio do ciclo celular controlado pela p145abl, onde ocorre manutenção dos níveis de tirosinas quinases responsáveis pela fosforilação de substratos proteicos no núcleo celular. Com essa desordem, ocorre aumento da atividade quinase, oriundas de mutação do domínio SH3 e da ligação ao domínio SH2 (FADERL et al., 1999; LAURENT et al., 2001).

Os domínios SH2 e SH3 são regulatórios e permeiam interações proteína-proteína e controlam os sinais de transdução. O domínio SH3 é um regulador negativo da atividade quinase, sendo um contraponto ao SH2 que é um potencial ativador e receptor de tirosinas quinases. Com a perda do controle parcial ou completa do domínio SH3, o domínio SH2 é hiperativado (Di BACCO et al., 2000).

O aumento na concentração de proteínas quinases provoca alterações severas na regulação de proliferação celular, no controle apoptótico, anormalidades no citoesqueleto e ativação de vias de sinais de transdução, conduzindo à transformações nas células precursoras hematopoiéticas e originando os fenótipos mais agressivos da LMC (ADVANI A S, PENDERGAST, 2002; KURZROCK et al., 2003).

A perda da adesão celular é um fator determinante para o desenvolvimento clonal maligno. Em células normais a adesão celular funciona controla negativamente a proliferação celular (ARANA-TREJO., 2002). A proteína p210bcr-abl causa fosforilações em substratos específicos, impedindo o perfeito funcionamento do citoesqueleto. Desta forma, a célula hematopoiética passa a ter deficiência na adesão com a medula óssea, atuando de forma independente, induzindo a mieloproliferação (KURZROCK et al., 2003).

A presença da proteína p145abl está diretamente envolvida na via apoptótica de células hematopoiéticas, conduzindo a autodestruição quando é sinalizado um dano genômico (WICKREMASINGHE R., HOFFBRAND. A, 1999). No caso da ação das proteínas codificadas pelo BCR-ABL, ocorre uma inibição da caspase 3, atuante na ativação da apoptose e prolongamento do período G2/M do ciclo celular, resultando na sobrevivência de células mutadas (CANITROT Y., 2003).

A ação dos fatores de crescimento atuam no desenvolvimento, na proliferação, na sobrevivência e na diferenciação de células normais. No caso das células hematopoiéticas, existem vários fatores de crescimento atuantes, desencadeando as cascatas de fosforilação. Com a expressão do gene BCR-ABL, a célula se torna independente à esses fatores, o que resulta em: ativação de sinalizadores intracelulares, expressão de genes do controle do ciclo celular mutados, interação com receptores de fatores de crescimento e/ou produção autócrina (Di BACCO et al., 2000; KURZROCK et al., 2003).

A proteína Ras atua como um transdutor de sinal importante nas vias intracelulares e modulam o ciclo GTP-GDP. Essa função traz equilíbrio a proliferação celular através dos controles positivos (GTP) e negativos (GDP) (KURZROCK et al., 2003). As proteínas p190bcr-abl e p210bcr-abl atuam nas vias de Ras modificando propriedades sinalizadoras. A cascata de eventos mediada por essa série de adaptadores acaba conduzindo a ativação permanente de Ras-GTP, promovendo transformações nas atividades regulatórias, na proliferação e diferenciação em células hematopoiéticas (LAURENT et al., 2001).

1.2.4 Fases clínicas da LMC

Embora a LMC caracteristicamente seja uma doença permeada pela presença do cromossomo Ph, essa leucemia apresenta um quadro clínico heterogêneo, com alterações na apresentação clínica e nos processos de evolução (TEFFERI et al., 2005). Existe uma tendência linear de progressão dessa doença, respeitando as três fases que ela apresenta: fase crônica, fase

acelerada e crise blástica (BEUTLER E, 2001).

A fase crônica é caracterizada pela proliferação clonal maciça das células granulocíticas, sendo que elas ainda apresentam sua capacidade de diferenciação, onde devido a esse grau de maturidade celular o seu potencial terapêutico é favorável, sendo uma doença possivelmente controlada. Com o avançar da fase crônica, o clone leucêmico que antes apresentava o potencial de diferenciação decaía na maturidade e começa a apresentar a fase aguda, onde a doença se torna de difícil controle clínico, evoluindo para uma leucemia aguda ou para a crise blástica (CORTES J, et al., 2003).

Ao diagnóstico, na fase crônica, parte considerável dos pacientes são assintomáticos. A apresentação clínica classicamente mostra esplenomegalia volumosa, hepatomegalia e leucocitose com desvio à esquerda, com predomínio de neutrófilos e células granulocíticas imaturas (BAIN BJ, 2005). A maioria dos pacientes têm basofilia e eosinofilia. Também pode haver discreto aumento de monócitos e podem ser vistos, ocasionalmente, eritroblastos e núcleos ou fragmentos de megacariócitos no sangue periférico (BAIN BJ, 2005.; CORTES J, et al., 2003; GORDON MY, et al., 2001).

Na fase crônica a hemoglobina pode se apresentar normal ou pode haver discreta anemia. O número de plaquetas é geralmente normal ou elevado, havendo plaquetopenia ao diagnóstico em 5% dos casos (BAIN BJ, 2005). Caracteristicamente, a fosfatase alcalina intraleucocitária é baixa em 90% dos pacientes na fase crônica, elevando-se na fase acelerada e na crise blástica (BAIN BJ, 2005.; CORTES J.; KANTARJIAN HM, 2003).

As apresentações laboratoriais descritas estão todas relacionadas com marcadores moleculares. Pacientes com expressão da proteína BCR-ABL p210, apresentam um quadro clássico de evolução da LMC, enquanto que a minoria dos pacientes que expressam a proteína BCR-ABL p19 tendem a um aumento de monócitos e pacientes com a proteína BCR-ABL p230 têm a rara variante neutrofílica (MELO JV, et al., 1996).

A medula óssea dos pacientes com LMC dispõe de um predomínio de granulócitos e a relação grânulo-eritroblástica apresenta-se acima de 10:1. O número de megacariócitos pode ser normal ou aumentado, sendo geralmente de tamanho menor que o normal e hipolobulados (CORTES J.; KANTARJIAN HM, 2003). Habitualmente não se observa displasia na fase inicial da LMC, portanto, é de suma importância ser realizada a biópsia medular ao decorrer da progressão da doença com o objetivo comparativo e de avaliação da presença de fibrose que é um indicador de prognóstico adverso (BAIN BJ, 2005).

Após um período de tempo, que pode variar habitualmente de três a cinco anos, a LMC evolui da fase crônica para um período de doença mais avançada e de difícil controle, chamado de fase acelerada e, desta, pode evoluir para crise blástica. Algumas vezes pode ocorrer a evolução direta da fase crônica para a crise blástica, sem que o paciente apresente o processo progressivo de aceleração (MELO JV, et al., 1996; CORTES J.; KANTARJIAN HM, 2003).

A determinação das fases avançadas da LMC é variável e apresenta algumas controvérsias. A Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu alguns parâmetros com o objetivo de facilitar o diagnóstico e a conduta terapêutica a ser realizada em pacientes com LMC (ABHH, 2013). Como dito anteriormente, quando a doença não é controlada ela avança e descrições foram padronizadas para determinar essa análise, sendo a mais usual do M.D. *Anderson Cancer Center* (MDACC) e, em seguida da *International Blood and Marrow Transplantation* (IBMTR) (BAIN BJ, 2005) (Tabela 2)

Tabela 2. Comparação das três classificações da LMC em fase acelerada

	MDACC	IBMTR	OMS
Blastos(%)	≥ 15	≥ 10	10 -19
Blastos + Promielócitos (%)	≥ 30	≥ 20	NA
Basófilos (%)	≥ 20	1≥ 20	≥ 20
Plaquetas (/mm³)	< 100.000	Aumento ou diminuição	< 100.000 ou

		ersistente independente do tratamento	>1.000.000
Leucócitos (/mm³)	NA	Difícil controle	NA
Anemia	NA	Não responsiva ao tratamento	NA
Esplenomegalia	NA	Em aumento	NA
Citogenética	Evolução clonal	Evolução clonal	Evolução clonal
Outros	NA	Sarcoma granulocítico, fibrose	Proliferação de megacariócitos, fibrose

MDACC: M.D Anderson Cancer Center; IBMTR: International Bone Marrow Transplant Registry; OMS: Organização Mundial de Saúde; NA: não se aplica.

Depois de constantes atualizações dos parâmetros prognósticos, vem sendo compreendido que a fase acelerada da LMC é um processo não responsivo ao tratamento com os inibidores de tirosina quinase, sendo acrescido como fator determinante a falha na resposta ao tratamento e a presença de fibrose na medula óssea (APPERLEY JF, 2015).

A evolução clonal determinada pela OMS não mais é considerada ao diagnóstico de fase acelerada. Pacientes com LMC raramente são diagnosticados em fase acelerada e, com o sucesso dos inibidores da tirosina quinase, o número de pacientes que evoluem da fase crônica para a fase acelerada foi atenuado (CORTES J.; KANTARJIAN HM, 2003).

No caso da crise blástica, o quadro clínico é mais preocupante, no entanto o mais fácil de ser identificado. Ainda que alguns critérios de determinação do diagnóstico sejam pouco compreendidos, o quadro tem marcos bem definidos. A presença do número de blastos seja de $\geq 30\%$ ou quando a soma dos promielócitos e blastos for $\geq 30\%$, é definido como crise blástica. De acordo com a OMS, caso o número de blastos for $\geq 20\%$ já é considerado crise blástica (APPERLEY JF, 2015; CORTES J.; KANTARJIAN HM, 2003).

Vale ressaltar que o número de blastos não é o único fator a ser avaliado, sendo a linhagem celular (linfóide ou mielóide), um fator fundamental. Em 70% dos casos de crise

blástica a transformação é mielóide e em 20% a 30% linfóide, sendo raramente bifenotípica ou bilinhagem, embora esse tipo de leucemia seja mais freqüente na crise blástica de LMC. No caso da mielóide, múltiplas linhagens podem aparecer, sendo elas: mieloblástica, eosinofílica, basofílica, monocítica, megacarioblástica, eritroblástica ou combinação destas (O'BRIEN SG, et al. 2003). A crise blástica linfóide pode surgir subitamente, não necessariamente sendo precedida pela fase acelerada e normalmente não há o aparecimento de displasias e nem basofilia (DEININGER MV, 2000).

Com os estudos dos perfis moleculares da LMC e a progressão em diversas fases da doença, é correto afirmar que o rearranjo BCR-ABL, devido a sua intensidade na atividade da tirosina quinase, é um fator diretamente responsável pela progressividade da instabilidade genômica e um fator influenciador em mudanças epigenéticas que ocorrem na célula primordial ou em uma célula mais madura (APPERLEY JF, 2015;).

Os pacientes de LMC são tratados com terapia alvo e possuem a necessidade de serem monitorados regularmente quanto a sua resposta em relação aos diferentes tipos de tratamento utilizados. Caso seja uma resposta hematológica, ela é baseada na contagem de taxas sanguíneas feitas a partir do hemograma do paciente, sendo levado em consideração: as taxas sanguíneas e achados citológicos. Quando avaliada a resposta citogenética, os exames são baseados na medula óssea e utilizado métodos citogenéticos ou FISH, e tem como objetivo observar a presença dos cromossomos alterados. Outra forma de avaliar o relação de tratamento é a resposta molecular onde é baseada nos resultados do exame de PCR (avaliada a expressão do gene BCR-ABL) em células do sangue periférico e medula óssea (CAGNETTA, A et al., 2014).

Uma das formas de avaliar os fatores prognósticos da LMC é acessando o Índice de Sokal, o qual leva em consideração aspectos clínicos e laboratoriais do paciente. Os indicadores utilizados para classificar o prognóstico são: tamanho do baço em centímetros palpáveis, o número de plaquetas, o percentual de blastos e a idade do paciente. Esses parâmetros são

analisados a partir de uma fórmula, escore de sokal, onde o resultado < 0.8 corresponde a paciente com LMC de baixo risco, de 0,8 a 1,2 de risco intermediário e de $> 1,2$ de alto risco (BACCARANI M., et al 2009).

O índice de sokal possui uma maior efetividade quando o paciente faz uso do fármaco Mesilato de Imatinibe, inibidor da atividade de tirosina quinase, onde a resposta molecular e citogenética do indivíduo são maiores naqueles que apresentarem baixo risco de acordo com o índice (O'BRIEN SG, et al., 2003).

Pacientes que apresentarem escore de sokal alto risco, mas que atingem resposta citogenética em 12 meses têm probabilidade de 90% de sobrevida, enquanto que pacientes de risco intermediário têm probabilidade de 94%, e os de baixo risco de 97% (CAGNETTA et al. 2014).

A sobrevida média para os pacientes classificados com Índice de Sokal baixo, intermediário e alto risco são respectivamente, de 105, 76 e 45 meses. A sobrevida de 10 anos é de 34%, 26% e 8%.

1.3 Leucemia linfóide crônica

1.3.1 Epidemiologia da LLC

A LLC se apresenta com maior prevalência entre idosos, com mediana de idade entre 65 a 70 anos ao diagnóstico, e com casos raros em crianças e jovens em geral. Esse câncer apresenta uma incidência de 25 a 30% dos casos de leucemias que acometem adultos (RAI; JAIN, 2016; SCARFÒ et al., 2016). Um aspecto muito importante relacionado a LLC é que o desenvolvimento da doença é quase duas vezes maior em homens que em mulheres (1,7: 1) (HALLEK, 2008; KIPPS T J, 2017).

1.3.2 Fisiopatologia da LLC

A LLC é uma doença clinicamente heterogênea, sendo que alguns pacientes podem

apresentar um quadro brando, com potencial terapêutico favorável. Em outros casos, a doença pode apresenta-se com quadro de rápida evolução e de difícil controle terapêutico. Essa manifestação antagônica da doença apresenta um correlato biológico bem definido (MELCHERS F, 2000). O limiar entre esses dois cenários pode ser explicado pela presença de mutações somáticas nos genes da região variável de imunoglobulinas (IgV). Aqueles indivíduos que apresentam mutações em IgV apresentam maior sobrevida do que aqueles sem mutações, sendo esse um dos fatores prognóstico mais relevantes na LLC (DOHNER, H et al., 2000).

Outros marcadores associados à sobrevida são CD38 e ZAP70, onde ambos correlacionam diretamente ao estado mutacional de IgV. Pacientes com IgV não mutado apresentam freqüentemente a expressão anormal de CD38 e ZAP70, sugerindo que este subgrupo de indivíduos, que corresponde a cerca de 40% de todos os casos de LLC, trata-se de uma população bastante homogênea (FERRARINI M, CHIORAZZI N et al., 2004).

O anticorpo é composto por 4 cadeias polipeptídicas, sendo duas leves e duas pesadas. As cadeias leves apresentam cerca de 220 aminoácidos e encontram-se conectados a 550 aminoácidos das cadeias pesadas. Na extremidade desse sistema há o sítio de ligação do antígeno. Tanto as cadeias leves como as pesadas colaboram para a especificidade desta região. A região não ligante da cadeia pesada constitui a fração Fc, na qual determina qual a classe do anticorpo. As cadeias pesadas que constituem a molécula de IgM são denominadas μ e possuem importância central no desenvolvimento dos linfócitos B em fases iniciais (HARDY R. R., 2000).

A formação de um linfócito B maduro é um processo com diversas etapas e ocorre basicamente em três regiões: medula óssea, sangue periférico e centro germinativo dos linfonodos (MELCHERS F, BOEKEL E et al. 2000). As células-tronco hematopoiéticas responsáveis pela produção dos linfócitos, produzem um precursor chamado linfócito pré-B, caracterizado pela presença de uma molécula μ e um precursor de cadeia leve, o *surrogate light*

chain. Quando essas duas cadeias são associadas para a maturação do linfócito acontece de forma efetiva a produção das cadeias leves (HARDY RR, 2000; MELCHERS F, BOEKEL E et al. 2000).

Essa nova porção de cadeias leves substituem o *surrogate light chains* por cadeias completas de IgM. Esta IgM na superfície de um linfócito ainda localizado na medula óssea chama-se de BCR (*B-cell receptor*) e é o principal atuante na maturação do linfócito B. Neste estágio, o linfócito B é chamado de linfócito B *naive* (imaturo) e encontra-se em condições de deixar a medula óssea (BRADEN BC; POLJAK RJ1995).

Quando essa célula migra para o sangue periférico, ele começa a expressar o IgD na sua superfície, e é chamada de linfócito B *naive* maduro (BRADEN BC, POLJAK, 1995). Quando atingem esse estágio de maturação estão prontos para serem incorporados nos centros germinativos de órgãos linfáticos, onde ocorrerão transformações que permitirão a seleção e expansão de clones que produzam anticorpos viáveis (CALLIGARIS-CAPPIO F, GHIA P, 2004).

Uma característica muito importante dos linfócitos B é que mesmo na ausência de estimulação de antígenos existe a possibilidade de serem produzidos anticorpos (BRADEN BC, POLJAK, 1995). Essa abrangência pré-imune garante um sítio de ligação antigênico específico, porém com baixa afinidade para antígeno que possa ser apresentado. Quando esse linfócito sofre estimulações repetidas a um determinado antígeno, a produção dos anticorpos se tornam cada vez mais específica (HARDY RR, LI YS et al., 2000).

Os genes que dão origem a todos essas proteínas e a um arsenal de possíveis antígenos apresentáveis são oriundos da permutação de genes que codificam os domínios VL e VH e da capacidade que as regiões hipervariáveis têm de sofrer mutações na estrutura original (ROSENWALD A, et al, 2001). Essa mutagenicidade da região é conhecida como mutações hipersomáticas, definindo o estágio final de maturação dos linfócitos B e, portanto, são

potenciais iniciadores dos clones malignos desenvolvidos em todo o processo, sendo essa hiperatividade molecular o carreador da LLC (GUIEZE, R.; WUC C.J., 2015).

Os clones da LLC apresentam um perfil fenotípico muito próximo aos linfócitos B de memória quando ativados. Porém, existe também a presença de marcadores que são fisiologicamente presentes em linfócitos T, como o CD5+. O CD5 só é expresso em linfócitos B em achados de fetos, mas indetectável na medula óssea após o nascimento. Outros marcadores fenotípicos de linfócitos T também podem ser observados nas células leucêmicas como CD7, CD8, CD9 e CD154 (DAMLE RN, et al., 1999).

Outros elementos importantes apresentados nos linfócitos de LLC são as tirosinas quinases ZAP70 e LCK, moléculas fundamentais para o funcionamento do complexo CD3-HLA nos linfócitos T (WILLIAM J et al., 2002). Observando esse perfil é viável afirmar que no caso da LLC, as células B apresentam comportamentos que seriam fisiologicamente exclusivos aos linfócitos T, sendo que devido a mutações nas fases iniciais de maturação desse linfócito, provocam alterações na programação gênica dessa célula pré-B, ativando fatores transcricionais específicos do linfócito T maduro (GUIZE, R.; WU, C. J.2015). Entretanto, as células características da LLC não são imaturas ou *naives*, elas simplesmente apresentam maturidade celular e atingiram todos os estágios de maturação. Portanto, foram precursores da produção de autoanticorpos, incluindo polirreativos que são comuns em linfócitos imaturos.

A presença da proteína zeta-associada de 70 kD (ZAP70) é um dos fatores prognósticos da LLC. Essa proteína é uma tirosina quinase essencial para sinalizar e ativar os receptores de linfócitos T. Apesar de não ser encontrada em linfócitos B não mutados, a proteína ZAP70 é expressa em células de LLC, especialmente, nos casos em que IgVH não está mutado. Portanto, a expressão de ZAP70 associa-se ao pior prognóstico (HASLINGER C, et al 2002;).

Ainda não se conhece completamente a fisiopatologia da LLC. Não se sabe, por exemplo, como uma célula que ainda não foi apresentada a um antígeno possa gerar duas

caracterizadas pela presença de *B- cell receptor*, um achado descrito como exclusivo de linfócitos B que já foram ativados (GHIOTTO F et al., 2004).

Portanto, o estado atual de conhecimento da LLC indica que a célula precursora de LLC (a célula que sofre o primeiro evento leucemogênico) consegue escapar dos *checkpoints* na medula óssea e evadir à apoptose, para poder se diferenciar em um linfócito B maduro que retém propriedades de células T, mas possui um BCR funcional (HASLINGER C, al 2002). A funcionalidade do BCR é observada indistintamente em casos mutados como não mutados, indicando que alguma forma de estimulação antigênica é comum provavelmente em todos os casos de LLC. A natureza deste "antígeno" é desconhecida, mas independente de ser viral, autólogo ou superantígeno, o papel desempenhado pela estimulação de BCR é incontestável e desempenha um papel central na patogênese da LLC (GHIOTTO et al., 2004).

1.3.3 Diagnóstico e estadiamento clínico da LLC

O conhecimento dos processos biológicos envolvidos na LLC permitiram um melhor entendimento sobre suas características clínicas e laboratoriais. Os principais parâmetros adotados para o diagnóstico foram estabelecidos pela *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia* em 1988 e pelo *National Cancer Institute Working Group* no ano de 1996. Para o diagnóstico do quadro de LLC, o paciente deve apresentar uma contagem de linfócitos superior a 5.000/mm³ em sangue periférico, adicionado de caracterização fenotípica das células leucêmicas por citometria de fluxo (HALLEK et al, 2008).

Os linfócitos leucêmicos possuem um padrão morfológico de serem caracteristicamente pequenos, maduros, com uma margem estreita de citoplasma e um núcleo denso sem nucléolos visíveis e cromatina parcialmente agregada (DAMLE, R. N et all, 1999). Essas células podem ser encontradas também maiores ou atípicas, prolinfócitos, com uma abrangência média de até 55% dos linfócitos sanguíneos. Outro achado no esfregaço sanguíneo são as manchas de Gumprecht, originárias de células rompidas no sangue periférico da maioria dos pacientes com

LLC (HALLEK M., et al, 2008).

A imunofenotipagem é uma das principais metodologias laboratoriais para o diagnóstico de LLC, pois permite distinguir a essa leucemia demais doenças malignas hematopoiéticas, observar a produção de anticorpos monoclonais e identificar antígenos expressos na superfície celular. O diagnóstico da LLC, após análise do hemograma, é firmado pela detecção por citometria de fluxo do seguinte fenótipo: CD5+, CD19+, CD20+, CD23+ e CD38+ (JAFFEE, et al., 2001; BINET et al, 2006).

Como a LLC é uma doença progressiva, ela possui um aspecto de evolução continuada e de maneira lenta, aumentando assim o número de prolinfócitos, de trombocitopenia e da esplenomegalia (DOBBIN, 2005). Baseado nisso, foram estabelecidas diretrizes para estudos desse avanço clínico, sendo as principais propostas por RAI (1975) e BINET (1981), que correlacionam o estadiamento e a sobrevida dos pacientes (DOBBIN, 2005). Os estadiamentos são baseados em um conjunto de características clínicas e laboratórias apresentadas, tais quais: aumento do número de linfonodos, presença ou ausência de esplenomegalia e/ou hepatomegalia e a avaliação hematológica do sangue periférico (RAI et al., 1975; BINET et al., 1981).

O estadiamento proposto por Rai e colaboradores, (Tabela 3) considerava: linfocitose absoluta maior que 15.000/mm³ em sangue periférico associado ou não a adenomegalia, esplenomegalia e/ou hepatomegalia. Além de anemia definida com o valor da hemoglobina menor que 11g/dl e plaquetopenia definida como contagem de plaquetas menor que 100.000/mm³. Com essas características era possível classificar os pacientes em cinco categorias de 0 a IV (RAI et al., 1975).

Tabela 3. Sistema de estadiamento de Rai (1975)

	Risco Baixo		Risco Intermediário		Risco Alto	
	0	I	II	III	IV	
Linfocitose	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	
Linfoadenopatias (áreas acometidas)	Não	Sim	Sim/Não	Sim/Não	Sim/Não	
Hepatomegalia/	Não	Não	Sim	Sim/Não	Sim/Não	

Esplenomegalia					
Hb (g/dL)	>11	>11	>11	<11	Qualquer
Plaquetas (x10³/dL)	>100	>100	>100	>100	<100

Fonte: Adaptado Raí, 1975.

No caso do estadio descrito por Binet (Tabela 4), os pacientes são subdivididos em três categorias. Os pacientes em estadio clínico A são considerados de baixo risco e clinicamente sem evidências de anemia ou plaquetopenia e com até duas cadeias ganglionares afetadas. Os pacientes em estágio B são considerados em risco intermediário e apresentam três ou mais cadeias ganglionares comprometidas. Os pacientes classificados em estadio C apresentam anemia, plaquetopenia e são considerados de alto risco (BINET, et al 1981).

Tabela 4. Sistema de estadiamento de Binet (1981)

	Risco Baixo	Risco Intermediário	Risco Alto
	A	B	C
Linfocitose	Sim	Sim	Sim
Linfoadenopatias (áreas acometidas)	Sim/Não (<3)	SIM/Não (<3)	Sim/Não
Hepatomegalia/ Esplenomegalia	Sim/Não	Sim/Não	Sim/Não
Hb (g/dL)	>10	<10	<10
Plaquetas (x10³/dL)	>100	>100	<100

Fonte: Adaptado Binet, 1981.

1.3.4 Marcadores prognósticos da LLC

Como já foi descrito, o comportamento clínico dos pacientes portadores da LLC é heterogêneo. Enquanto alguns pacientes apresentem a doença branda e ausente de complicações durante muitos anos, outros pacientes desenvolvem os seus aspectos mais agressivos, com progressão e sintomatologia marcante, necessitando de uma terapia intensa e com um prazo curto desde o diagnóstico (ZHANG; KIPPS, 2014).

Alguns fatores são determinantes para decidir qual rumo terapêutico e o clínico o paciente irá trilhar e com o avanço de estudos eles começam a ser evidenciados. Dentre esses

fatores prognósticos, se encontra a expressão de CD38 juntamente com o ZAP-70. Essa correlação ocorre entre as expressões desses marcadores e o estado mutacional de IgVH) (EL-KINAWY et al, 2012).

Essa correlação demonstra que as células B dos pacientes com LLC que apresentarem baixa ou nenhuma expressão de CD38 estão relacionados com um melhor prognóstico, determinando um curso clínico favorável da doença (GOMES et al., 2017). Em contrapartida, as células B que apresentarem uma alta expressão do marcador, estão relacionadas à um prognóstico mais agressivo, com uma progressão clínica mais rápida (DAMLE et al., 2005).

As células B de indivíduos saudáveis normalmente não expressam o ZAP-70, pois utilizam como proteína a Syk, também da família tirosina quinase (DOHNER et al., 2000; GOMES et al., 2017). A alta correlação entre os níveis de ZAP-70 e a mutação IgVH atua como fator prognóstico decisivo. Indivíduos que apresentam a mutação IgVH não expressam ZAP-70 apresentam melhor prognóstico, enquanto indivíduos que não apresentam a mutação expressam ZAP-70 nas células clonais mostram pior prognóstico. Alguns estudos consideram como expressão positiva, valores de ZAP 70 superiores a 20% (GOMES et al., 2017).

A LLC tem como uma das principais características a variabilidade genética, sendo um fator determinante no prognóstico do paciente. Sendo algumas alterações diretamente associadas ao desenvolvimento da doença. A deleção do 13q é a anormalidade genômica mais prevalente na LLC, pois está presente em 45-55% dos casos, e se associa a um prognóstico favorável. A deleção do 17q pode ser encontrada em 7% dos pacientes, contudo a incidência aumenta para 30-37% em LLC refratária e está associada à perda do gene supressor de tumor TP53. Já no caso da deleção do 11q é encontrada em 5-10% dos pacientes ao diagnóstico e estágio inicial da doença, mas aumenta para 23% em estágios avançados, e frequentemente está associado a alterações no gene ATM (envolvido no reparo do DNA). As deleções de 11q e 17p estão associadas ao desfecho clínico adverso. A trissomia do 12 é encontrada em 16% dos

pacientes com LLC e representa um prognóstico intermediário (DOHNER et al., 2000; KIPPS et al., 2017).

1.4 Família ZHX e o câncer

A epigenética é definida como o estudo de modificação do genoma que são herdadas, e que não alteram a sequência de bases do DNA (DONG W, CHEN X et al., 2010). Esse processo permite que o fenótipo da célula seja alterado, sem que modifique o seu genótipo. Dentre as modificações das histonas, matriz proteica na qual o DNA se enrola, estão: metilação, fosforilação e acetilação. Entretanto, na molécula de DNA acontece apenas a metilação (DONG W, CHEN X et al., et al., 2010; GUIÈZE, R, WU, C. J. 2015).

Esses mecanismos epigenéticos apresentam características silenciadoras (repressoras) ou estimuladoras, podendo interferir de forma atuante na regulação da expressão gênica (GUIÈZE; WU, 2015). Um dos grupos proteicos atuantes como reguladores epigenéticos são os *Zinc Fingers and Homeobox* (ZHX), que consistem em um grupo de repressores transcricionais homodiméricos nucleares que interagem com uma subunidade do fator Y nuclear (NF-YA) e contêm dois dedos de zinco do tipo C2H2 e cinco domínios de ligação ao DNA da homeobox (LIU et al., 2015).

O NF-YA é um fator de transcrição nuclear atuante como ligante da sequência CCAAT nas regiões promotoras em uma variedade de genes. O NF-Ya é um dímero composto pelas subunidades NFYB e NFYC, resultando em um trímero que se liga ao DNA com alta especificidade e afinidade (BUNGARTZ G, et al 2012). A subunidade NFYA é a unidade reguladora responsável pelas interações específicas da sequência do complexo. Além disso, há evidências de regulação pós-transcricional neste produto gênico, seja por degradação de proteínas ou controle da tradução (BENATTI P, et al, 2011).

O complexo NF-Y serve como fator pioneiro ao promover a acessibilidade da cromatina para facilitar a atuação de outros fatores de transcrição, dentre eles os da família ZHX

(ANDREW J. et al., 2014; BUNGARTZ G, 2012).

A família ZHX é constituída das proteínas ZHX1, ZHX2 e ZHX3, sendo que cada um deles é composto por um “dedo de zinco” do tipo Cys-Xaa2-Cys-Xaa12-His-Xaa4-His e quatro ou cinco homeodomínios (HDs) (Figura 3) que funcionam como repressores transcricionais (BARTHELEMY I et al., 1996).

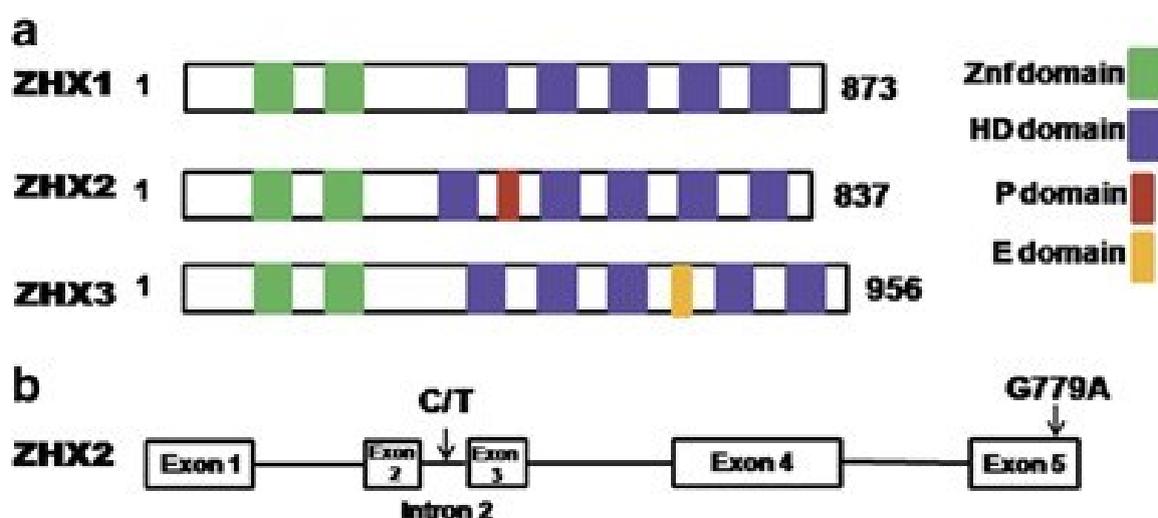


Figura 3. Diagrama dos genes da família ZHX. a) Estruturas de proteínas da família ZHX. b) Estrutura gênica dos polimorfismos de ZHX2. (Adaptado de Liu, Y., Ma, D. & Ji, C., 2015).

Os homeodomínios na família ZHX são de origem vertebrada. Em humanos ZHX1 e ZHX2 estão localizados no cromossomo 8, enquanto o ZHX3 está no cromossomo 20 (KAWATA H et al., 2003; LIU, Y et al., 2015). O ZHX1 foi identificado em 1999 em uma biblioteca de cDNA de células estromais da medula óssea, possui 873 aminoácidos, sendo descrito com alta expressão no cérebro, baixa expressão no fígado e nos rins, e quase indetectável no coração e nos músculos (NAGEL S, et al., 2012).

O ZHX2 humano foi clonado no ano de 1998, onde foi identificado em suas duas formas, polimorfismo G779A e um polimorfismo no íntron 2 (NAGEL S et al., 2012). A expressão do ZHX2 foi detectada em todos os tipos de tecidos, tendo uma alta expressão no ovário, pulmão, coração, rim, cérebro e fígado. No caso do ZHX3, identificado em 1997 em uma biblioteca de

cDNA de testículo, trata-se de um fator codificante de uma proteína de 956 aminoácidos. ZHX1 e ZHX3 compartilham 34,4% de identidade de aminoácidos (LIU, Y et al., 2015).

A correlação da família ZHX com doenças tumorais vem sendo descrita progressivamente, em que a baixa expressão de ZHX parece estar associada com um processo de oncogênese e desenvolvimento clonal (DE ANDRADE T et al., 2010).

II - OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar se a família ZHX (*Zinc Fingers and Homeobox*) está associada no desenvolvimento e/ou progressão da LMC e LLC.

2.1 Específicos:

2.1.1 Leucemia mielóide crônica

- Comparar a expressão dos genes da família ZHX entre pacientes com LMC e indivíduos saudáveis;
- Investigar se o nível de expressão da família ZHX está associado a progressão clínica da LMC;
- Determinar se a expressão da família ZHX impacta na resistência terapêutica em pacientes com LMC.

2.1.2 Leucemia linfóide crônica

- Comparar a expressão dos genes da família ZHX entre pacientes com LLC e indivíduos saudáveis;
- Investigar se há associação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e a leucometria dos pacientes avaliados;
- Analisar a expressão de ZAP-70 nas amostras de LLC e investigar se há associação dos resultados com a expressão gênica;
- Avaliar a presença de alterações citogenéticas numéricas e estruturais nas amostras de LLC e se há associação dos resultados com os dados de expressão gênica.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

Nesse estudo foram analisadas as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais de 56 pacientes atendidos no Instituto Hospital de Base (IHB) e no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP) diagnosticados com LMC. O diagnóstico dos pacientes com LMC foi baseado na leucocitose persistente inexplicável e na presença de anormalidade no cromossomo Ph detectada pela citogenética de rotina. Todos os pacientes tiveram seu prognóstico determinado, de acordo com o Índice de Sokal, que leva em consideração a porcentagem de blastos em sangue periférico, a contagem de plaquetas e o tamanho do baço. Os pacientes que obtiverem pontuação inferior a 0.8 foram classificados como baixo risco. Pacientes com pontuação entre 0.8 e 1.2 foram classificados como de risco intermediário, enquanto aqueles com pontuação superior a 1.2 são os de alto risco. Em adição, foram utilizadas amostras de sangue periférico de 16 doadores hematologicamente saudáveis como amostras controle.

No caso da LLC, foram utilizadas amostras de 51 pacientes diagnosticados atendidos na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP/SP). O diagnóstico de LLC desses pacientes foi determinado pela morfologia celular, pela linfocitose absoluta e pelo padrão imunofenotípico característico da doença. Como grupo controle utilizamos 8 amostras de células B isoladas de indivíduos saudáveis. Inicialmente todas as amostras foram submetidas ao isolamento de células mononucleares por uso do gradiente de densidade Ficoll-Paque 1.077 (SigmaAldrich), conforme detalhado a seguir.

O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) foi apresentado à todos os pacientes e voluntários saudáveis e a execução do estudo foi aprovada pelo comitê de ética local.

3.2. Isolamento das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

O isolamento das CMSP para as amostras de LLC e controle ocorreu em tubo de 15ml, o qual recebeu 3ml de Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 4ml de sangue total (coletados em tubo de EDTA) e 4ml de PBS (tampão fosfato-salino). Posteriormente, as amostras controle foram submetidas a seleção imunomagnética de linfócitos B. Para isso, foram utilizadas esferas magnéticas acopladas ao anticorpo anti-CD19, seguindo as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec). Em suma, as amostras controle foram incubadas para que ocorresse ligação das esferas magnéticas e anti-CD19 na superfície das células B. Posteriormente, as amostras foram passadas em um campo magnético, de modo que as células CD19 marcadas com as beads ficaram retidas. Em seguida, a coluna foi retirada do campo magnético e as células obtidas para avaliação da pureza. Todas as células CD19 + isoladas apresentaram pureza superior a 90%, conforme determinado por citometria de fluxo.

3.3. Citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada para diagnóstico da LLC, onde utilizou-se 10^6 células em cada um dos três 3 tubos a seguir: CD20 FITC, CD79b PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC; e Anti- λ FITC, anti- κ PE, CD19 PE-Cy5, CD5 APC. Todos os anticorpos monoclonais foram obtidos da Becton Dickinson (San Jose, CA, USA), exceto os anticorpos anti- λ e anti- κ (Dako, Carpinteria, CA, USA). Outra determinação realizada por citometria de fluxo foi a determinação da expressão do marcador prognóstico ZAP-70 (BD, San Jose, CA, USA), sendo considerado positivo os casos em que mostraram positividade superior a 20% (SARGENT; CRAIG; SWERDLOW, 2009).

3.4. Citogenética

Nas amostras de LMC foi analisada a presença do cromossomo Ph detectada por 46

citogenética de rotina; ou do oncogene molecular BCR – ABL detectado por hibridização fluorescente in situ (FISH) ou teste molecular. Os pacientes com LMC denominados em "resistentes" ou "responsivos" (remissão citogenética completa após 12 meses de tratamento com IM) foram definidos de acordo com os critérios propostos pela *European Leukemia Net* (leukemia-net.org).

Para a determinação e análise do cariótipo das amostras de LLC, foi utilizado Bandeamento-G. Para isso, as células foram mantidas em meio RPMI 1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD) suplementado com de 20% de SBF (soro bovino fetal), DSP30 (TIBMOlBiol, Berlin, Germany) e Il-2. Após 72 horas de cultivo, foi adicionado Colcemid (Sigma, Munich, Germany) e realizado o espalhamento cromossômico. A análise do cariótipo foi realizada no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.5. Extração do RNA e transcrição reversa

Após a análise de pureza das amostras dos pacientes com LLC e LMC e dos doadores saudáveis, iniciou-se o processo de extração de RNA pelo método de TRIZOL-LS. Em suma, as células foram tratadas com 750 µL de TRIZOL-LS e 250 µL de PBS por 5 minutos. Posteriormente, 200 µL de clorofórmio gelado foi acrescido na mistura. Esse material passou por uma centrifugação por 15 min a 12.000g, em temperatura de 4°C. A fase aquosa resultante foi retirada e transferida para um outro tubo, onde foram adicionados 500µL de isopropanol gelado. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 12.000g a 4°C. Finalizado esse processo, foi adicionado 1mL de álcool gelado 100%. Por fim, a mistura foi centrifugada por 5 min a 7.500g, a 4°C, sendo o etanol descartado e o *pellet* ressuspensão em 20µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato).

Após obtenção, o RNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro Nanodrop®. Para síntese do DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1µg do total de RNA e o Kit de

transcrição reversa *High Capacity* (Applied BioSystems®, Foster City, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

3.6. PCR em tempo real

A análise quantitativa da expressão dos genes da família ZHX foi realizada no equipamento de PCR em tempo real StepOne Plus® (ThermoFisher®). A metodologia empregada para a análise da expressão dos genes foi Sybr Green (ThermoFisher®). O gene calibrador utilizado foi GAPDH, cuja eficiência de amplificação é a mesma dos genes alvos, o que possibilitou a análise dos dados pela metodologia ddCt (Tabela 5) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001).

Tabela 5. Primers utilizados no estudo.

Primer	Sequência (5'-3')
GAPDH - Forward Human 1	ACAGTTGCCATGTAGACC
GAPDH - Reverse Human 1	TTGAGCACAGGGTACTTTA
ZHX1 - Forward Human 1	ACTGAAATCTGCCTAAAACG
ZHX1- Reverse Human 1	CAAAGATTGGGCAAATTCAC
ZHX2 - Forward Human 1	TAGACAGGGAAGTCTGTAG
ZHX2 - Forward Human 1	GAGACCATCTCTTCTTTCTTC
ZHX3 - Forward Human 1	TTAGGACTGAAATGCAACTG
ZHX3 - Reverse Human 1	GTTTCCCTCTTCACTTTATGC

3.7. Análise *in silico* na plataforma *Bloodspot*

Com objetivo de validar nossos achados, foi analisada a expressão dos genes alvos desse estudo no banco de dados de perfis de expressão gênica e programas de transcrição para hematopoiese – *Bloodspot* (www.bloodspot.eu). Essa análise envolveu amostras controle de medula óssea saudável (n=73) analisadas em comparação com as respectivas leucemias, (LMC, n=76, LLC, n=448) as informações utilizadas foram parte do Leukemia MILE Study. Todos os genes foram avaliados com duas sondas, sendo elas uma de maior

intensidade e uma de menor intensidade. Os dados foram extraídos por EXCEL e realizada análise estatística.

3.8. Análise estatística

Para realizar a análise estatística foi utilizado o software Prism 7 (GraphPad® Software Inc., San Diego, CA, USA). O nível de significância adotado foi de 5% (CI 95%). Todos os testes aplicados foram não paramétricos, pois a população não apresentou uma distribuição normal. Para as comparações envolvendo dois grupos, utilizamos o teste Mann-Whitney e para três grupos ou mais, o Kruskal-Wallis test. Quando avaliamos a correlação da expressão gênica entre dois genes diferentes, utilizamos o teste de correlação Spearman r , com intervalo de confiança de 95%. Para a avaliação categórica da nossa coorte foi utilizado o teste Fisher e Qui-quadrado, dados representados em uma tabela de contingência.

4.RESULTADOS

4.1 Leucemia mielóide crônica

4.1.1 Características clínico-laboratoriais da coorte estudada

No caso da LMC, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 50 anos (variando de 18 a 69 anos). A distribuição em gênero mostra 26 casos do sexo feminino (46,4%) e do sexo masculino 30 casos (53,5%). Levando em consideração as fases da doença, 38 pacientes (67,8%) se encontram na fase crônica, 9 pacientes (16,0%) estão na fase acelerada e 9 pacientes (16,0%) estão na fase blástica. Em relação ao fármaco utilizado, 33 pacientes (58,9,0%) utilizaram o Mesilato de Imatinibe, 15 pacientes (26,7%) utilizavam o Desatinibe, 2 pacientes utilizavam o Nilotinibe (3,5%) e 6 pacientes (10,7%) eram pacientes em diagnóstico.

Com relação a resposta ao tratamento, 21 pacientes (37,5%) apresentavam Resposta Citogenética Completa com o uso do Mesilato de Imatinibe e 31 pacientes (55,3%) apresentavam Resistência ao Mesilato de Inatinibe. De acordo com o Índice de Sokal, 11 pacientes (19,6%) apresentavam baixo risco, 19 pacientes (33,9%) apresentavam risco intermediário e 26 pacientes (46,4%) apresentavam alto risco.

4.1.2 Expressão da família ZHX na leucemia mielóide crônica

Inicialmente, foi avaliada a expressão dos genes ZHX em amostras de LMC em comparação com amostras controle. Observamos que as amostras com LMC apresentam expressão reduzida dos genes ZHX1 ($p=0,0005$), ZHX2 ($p=0,01$) e ZHX3 ($p=0,0001$), em comparação com indivíduos saudáveis (Figura 4).

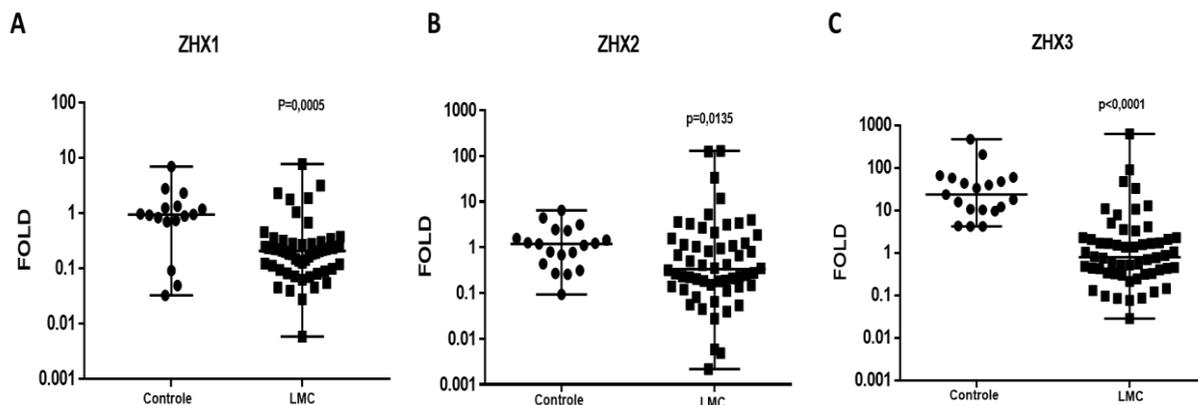


Figura 5 Expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC e indivíduos saudáveis. A análise da expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC (56 pacientes) em comparação com doadores saudáveis (19 indivíduos), podendo ser observado uma hiperexpressão dos genes da família ZHX em comparação com portadores da LMC. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

4.1.3 Associação entre a expressão diferencial dos genes da família ZHX

com fases da doença, tratamento utilizado e resposta ao tratamento.

Após o ensaio de expressão gênica, investigamos se a expressão dos genes da família ZHX apresentavam alguma associação com a fase clínica dos pacientes com LMC. Não encontramos qualquer impacto quanto a expressão de ZHX1 ($p=0,7$) e ZHX3 ($p=0,9$) de acordo com a evolução clínica dos pacientes. Entretanto, parece haver uma tendência dos pacientes em fase avançada da LMC apresentarem menor expressão de ZHX2 ($p=0,06$) (FIGURA 5).

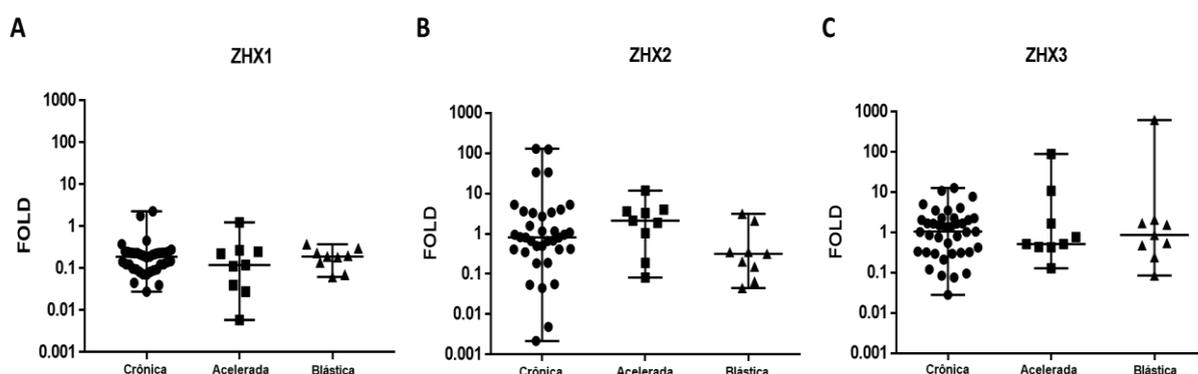


Figura 5. A expressão dos genes da família ZHX de acordo com a fase da LMC. As amostras de LMC foram classificadas de acordo com as fases da doença em crônica, acelerada e blástica e foi avaliada a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 nessas fases. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis.

Em seguida avaliamos se a expressão dos genes da família ZHX poderia sofrer algum impacto dos inibidores de tirosina cinase utilizados pelos pacientes. Não evidenciamos qualquer alteração na expressão dos genes ZHX1 ($p=0,8$) e ZHX2 ($p=0,09$). É interessante, pois detectamos que os dois pacientes que faziam uso do fármaco Nilotinibe apresentaram uma baixa expressão de ZHX3 ($p=0,02$) em comparação com os demais fármacos (Figura 6).

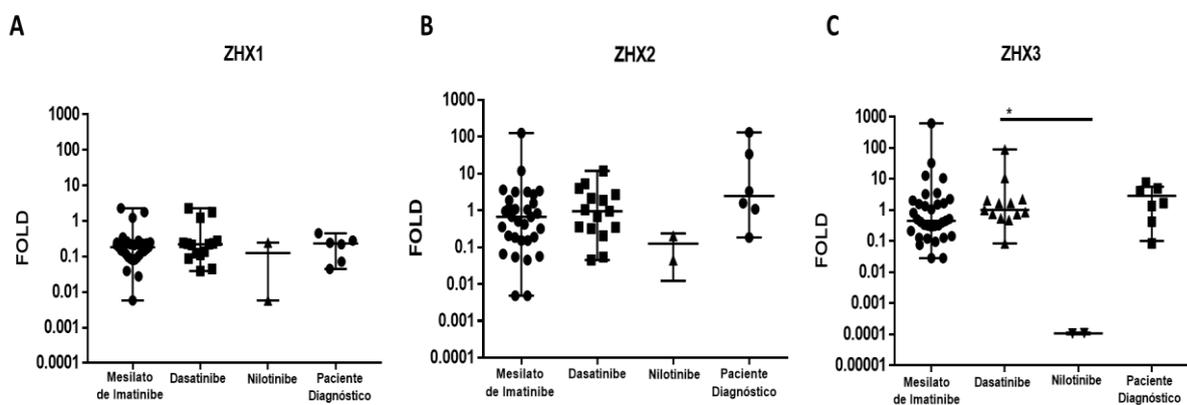


Figura 6. Expressão diferencial dos genes ZHX se associado a resistência ao tratamento: fármaco utilizado.

A expressão dos genes da família ZHX foi classificada de acordo com o tratamento recebido pelos pacientes com LMC, sem significância estatística quando avaliado os genes ZHX1 e ZHX2. A expressão de ZHX3 ($p=0,02$) foi reduzida nos usuários do fármaco Nilotinibe em comparação com os pacientes que usavam os demais fármacos. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal Wallis.

No que diz respeito à resposta ao tratamento, não encontramos diferença na expressão dos genes ZHX1 ($p=0,1$), ZHX2 ($p=0,2$) e ZHX3 ($p=0,3$), seguindo a resposta terapêutica dos pacientes ao mesilato de imatinibe (Figura 7).

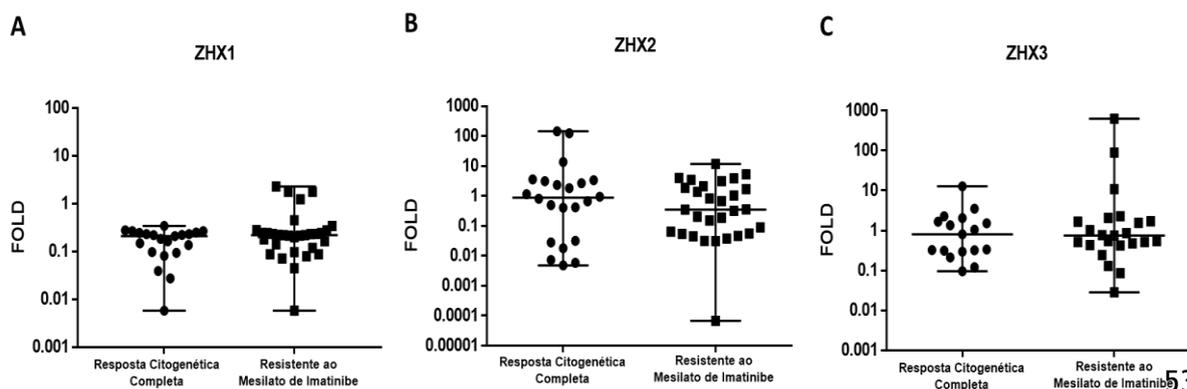


Figura 7. Expressão diferencial dos genes ZHX de acordo com a resposta ao tratamento com Mesilato de Imatinibe. A expressão dos genes da família ZHX foi classificada de acordo com a resposta ao tratamento. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

4.1.4 Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e o índice de Sokal.

Não evidenciamos qualquer alteração de expressão entre os genes ZHX1 ($p=0,3$), ZHX2 ($p=0,9$) e ZHX3 ($p=0,7$), de acordo com o índice de Sokal apresentado pelos pacientes (Figura 8).

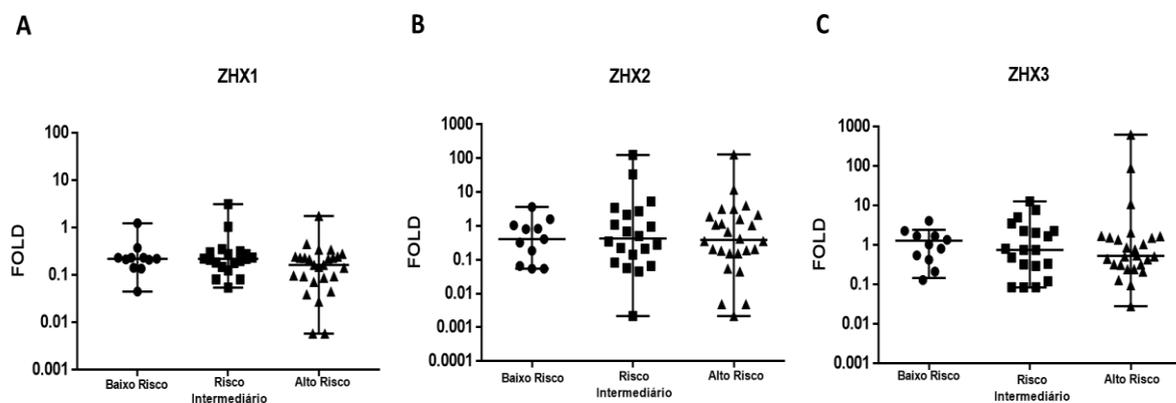


Figura 8. Associação da expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 conforme o índice de Sokal. A expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 foi classificada de acordo com o índice de sokal e não apresentou significância estatística. Análise estatística realizada pelo método de Kruskal Wallys.

4.1.5 Associação *in silico* da expressão dos genes ZHX na LMC em comparação com amostras de medula óssea saudável

Por fim, avaliamos *in silico*, usando a base de dados BloodSpot (Estudo MILE), a expressão dos genes da família ZHX na LMC. Para isso, analisamos a expressão das sondas disponíveis na base de dados, sendo elas: *microarray probe* 223213_at e *microarray probe* 223214_at para ZHX1, *microarray probe* 203556_at e *microarray probe* 1557706_at para ZHX2 e por fim, *microarray probe* 212535_at e *microarray probe* 217367_at para ZHX3. Avaliando a expressão das sondas descritas no estudo como de maior intensidade, foi observado menor expressão do gene ZHX1 ($p<0,04$) e ZHX2 ($p<0,0001$) em comparação com a medula

óssea saudável nas sondas. Não observamos diferença de expressão do gene ZHX3 ($p=0,4$) entre as amostras de LMC e medula óssea saudável (Figura 9).

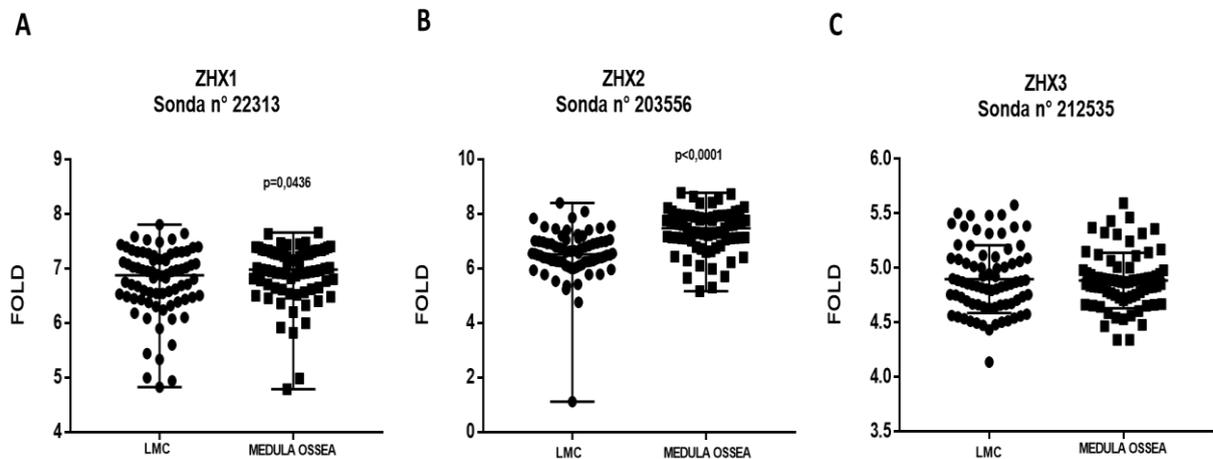


Figura 9. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC, com a sonda de maior intensidade, na LMC e em medula óssea controle. A análise de dados do banco de dados do grupo de estudo MILE revelou que a expressão dos genes ZHX1 e ZHX2 apresentam uma baixa expressão em 76 pacientes com LMC em comparação com 73 amostras de controle disponíveis, respectivamente, *microarray probe* 223213_at e *microarray probe* 203556_at. Não apresentou significância estatística na análise realizada com o gene ZHX3. Análise realizada com teste de Mann-Whitney.

Ao avaliar a sonda de menor intensidade, não detectamos diferença estatisticamente significativa para ZHX1, mas os genes ZHX2 ($p=0,001$) e ZHX3 ($p=0,0005$) apresentaram-se com expressão reduzida na LMC, em comparação com as amostras de medula óssea saudável (Figura 10).

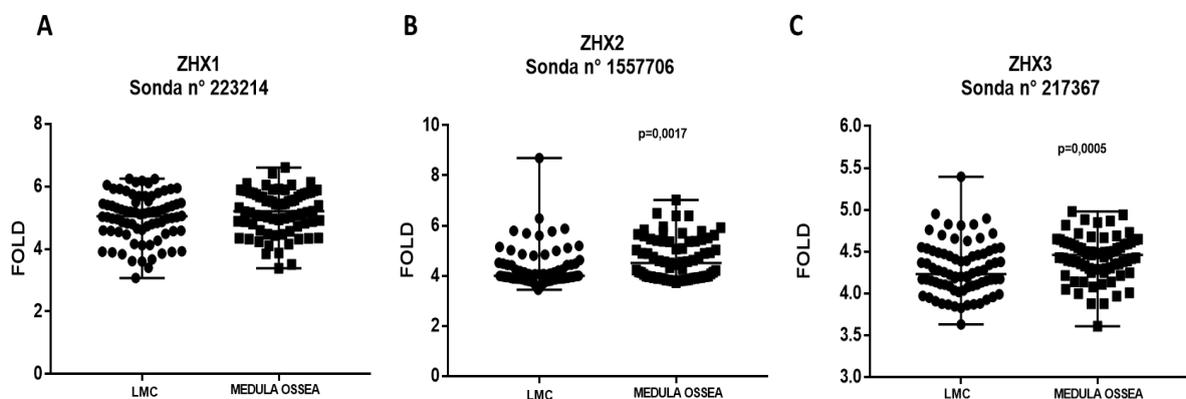


Figura 10. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC, com a sonda de menor intensidade. A análise de dados do banco de dados do grupo de estudo MILE revelou que a subexpressão dos genes ZHX2 e ZHX3 em 76 pacientes com LMC em comparação com 73 amostras de medula óssea saudável disponíveis, respectivamente, *microarray probe* 223214_at e *microarray probe* 217367_at.

microarray probe 1557706_at e *microarray probe 217367_at*. Não foi encontrada significância estatística para o gene ZHX1. Análise estatística realizada com teste de Mann-Whitney.

4.1.6. Correlação entre os genes ZHX na LMC

Nas amostras de LMC não encontramos correlação entre a expressão de ZHX1 e ZHX2 ($p=0,4$, $r=0,01$) e ZHX2 e ZHX3 ($p=0,6$ e $r=0,21$). No entanto, quando observada a correlação entre ZHX1 e ZHX3 ($p=0,3$ e $r=0,25$) pode ser observada uma pequena correlação. (Figura 11).

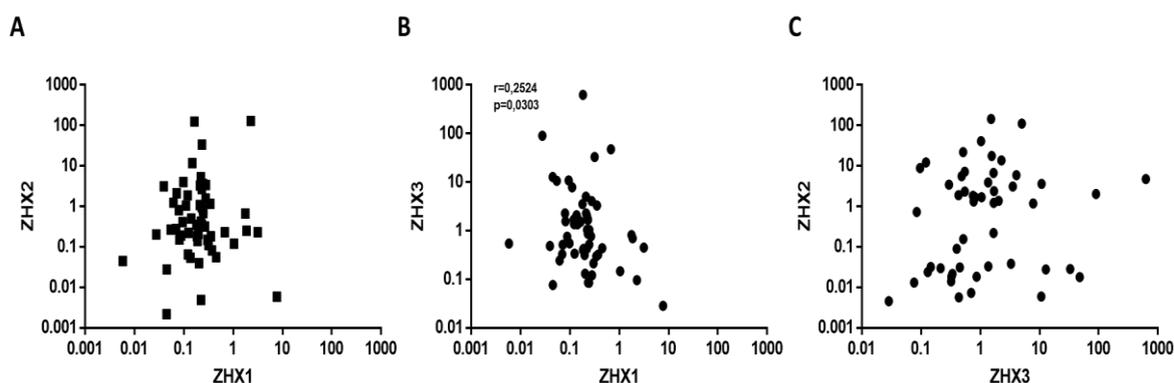


Figura 11. Correlação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LMC. Avaliamos se a expressão dos genes da família ZHX apresentam alguma correlação quando expressos na LMC. A análise foi realizada com teste de correlação-Spearman r.

4.2 Leucemia linfóide crônica

4.2.1 Características clínico-laboratoriais da coorte estudada

A escolha dos participantes da pesquisa foi determinada levando em consideração características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, sendo envolvidos 51 participantes diagnosticados com LLC. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 65 anos, tendo uma variação entre 43 e 85 anos de idade. Dos 51 participantes, 21 casos eram do sexo feminino (41,2%) e do sexo masculino 30 casos (58,8%).

Levando em consideração a relação clínica do paciente ao diagnóstico, as análises revelaram que 35 pacientes (68,6%) se apresentavam no estado Binet A, 10 pacientes (19,6%) no estado Binet B e 5 pacientes (9,8%) em Binet C. Quanto as alterações

citogenéticas, 14 pacientes (27.4%) apresentaram cariótipo de prognóstico favorável (deleção 13q e cariótipo normal); 20 pacientes (39,2%) cariótipo intermediário (trissomia do 12, deleção 11q e outros achados com 1 anormalidade); e 17 pacientes (33,3%) com cariótipo desfavorável (cariótipo complexo, deleções 17p e 11q).

As análises de contigência revelaram que os pacientes com baixa expressão de ZHX1 apresentavam maior número de leucócitos ($p = 0,03$), cariótipo alterado ($p = 0,007$) e citogenética desfavorável ($p = 0,002$), sendo observadas também pelo número de alterações cromossômicas ($p = 0,003$). Os pacientes com baixa expressão de ZHX2 assim como no gene ZHX1, também apresentavam cariótipo alterado ($p = 0,04$), citogenética desfavorável ($p = 0,09$) e também acúmulo de alterações cromossômicas ($p = 0,01$). Quando observada a expressão dicotomizada do gene ZHX3 também é possível observar relação da baixa expressão do gene quando visto as alterações no cariótipo ($p = 0,01$), citogenética desfavorável ($0,002$) e no número de alterações cromossômicas ($0,04$). Além disso, é possível observar uma baixa expressão dos genes ZHX2 em pacientes do sexo masculino em relação ao sexo feminino ($p=0,01$). E também uma baixa expressão do gene ZHX3 em relação a contagem do número de plaquetas ($p=0,02$) (Tabela 6).

Tabela 6. Características clínicas e gerais dos pacientes.

Características Gerais (LLC)	N total (%)	ZHX1		P	ZHX2		P	ZHX3		P
		Low	High		Low	High		Low	High	
Idade mediana (range)	65 (43, 85)	65,5 (54, 80)	59 (43, 85)	0.44	66.5 (54, 80)	59 (43, 85)	0.15	66 (49, 80)	59 (43, 85)	0.27
Sexo				0.24			0.01			0.15
Feminino	21 (41.1)	9 (34.6)	12 (48)		5 (20.8)	13 (56.5)		8 (38.1)	13 (61.9)	
Masculino	30 (58.9)	17 (65.4)	13 (52)		19 (79.2)	10 (43.5)		17 (56.7)	13 (43.4)	
Binet				0.26			0.60			0,54
A	35 (68.7)	17 (68)	19 (69.2)		16 (48.5)	17(55,5)		16 (45.7)	19 (54.3)	
B	11 (21.5)	4 (16)	7 (27)		5 (50)	6(50)		4 (40)	6 (60)	
C	5 (9.8)	4 (16)	1 (3.8)		3 (80)	1 (20)		1 (20)	4 (80)	
Plaquetas mediana, x10/L	142,5(11, 312)	137,5(15, 261)	147 (11, 312)	0.16	141,5(15, 312)	140 (11, 284)	0,55	142.5(11, 267)	143 (27, 312)	0.02
Leucócitos mediana x 10 / L	45.2(7.8, 170.1)	61.1(29, 170.1)	23.4(7.8, 93.2)	0.03	45.3(10.5, 170.1)	30.1(7.8, 93.2)	0.15	54.3(19.9, 170.1)	30.8 (7.8, 114,2)	0.09
ZAP 70 +				0.18			0,37			0.23
Negativo	16 (32)	6 (24)	10 (40)		7 (30.4)	9 (39.1)		6 (37.5)	10 (62.5)	
Positivo	34 (68)	19 (76)	15 (60)		16 (69.6)	14 (50.9)		18 (53)	16 (47)	
Cariótipo				0.007			0,04			0,01
Integro	12 (23.5)	2 (7.7)	10 (40)		3 (12.5)	9 (39.1)		2(16.7)	10 (83.3)	
Alterado	39 (76.5)	24 (92.3)	15 (60)		21 (87.5)	14 (60.1)		23 (59)	16 (41)	
Citogenética				0.002			0,09			0.002
Favorável	14 (27.5)	2 (7.7)	12 (48)		4 (16.7)	10 (43.5)		2 (14.2)	12 (85.8)	
Intermediário	20 (39.2)	11 (42.3)	9 (36)		11(45.8)	9 (39.1)		10 (50)	10 (50)	
Desfavorável	17 (33.3)	13 (50)	4 (16)		9 (37.5)	4 (17.4)		13 (76.5)	4 (23.5)	
Alterações cromossômicas				0.003			0,01			0,04
0	12	2 (7.7)	12 (40)		3 (12.5)	9 (39.1)		2 (16.6)	10 (83.4)	
1 ou 2	26	13 (50)	13 (52)		13 (54.2)	13 (56.5)		11 (42.3)	15 (57.7)	
3 ou mais	13	11(42.3)	2 (8)		8 (33.3)	1 (4.4)		1 (7.7)	12 (92.3)	

Os valores representam o número (porcentagem) ou mediana (intervalo) quando indicados nos títulos das linha.

As diferenças estatísticas significativas estão em negrito.

4.2.2 Expressão da família ZHX na leucemia linfóide crônica

Nossas análises mostram que não há diferença na expressão dos genes ZHX1 ($p=0,1$), ZHX2 ($p=0,3$) e ZHX3 ($p=0,3$) entre as amostras de pacientes com LLC e indivíduos saudáveis (Figura 12).

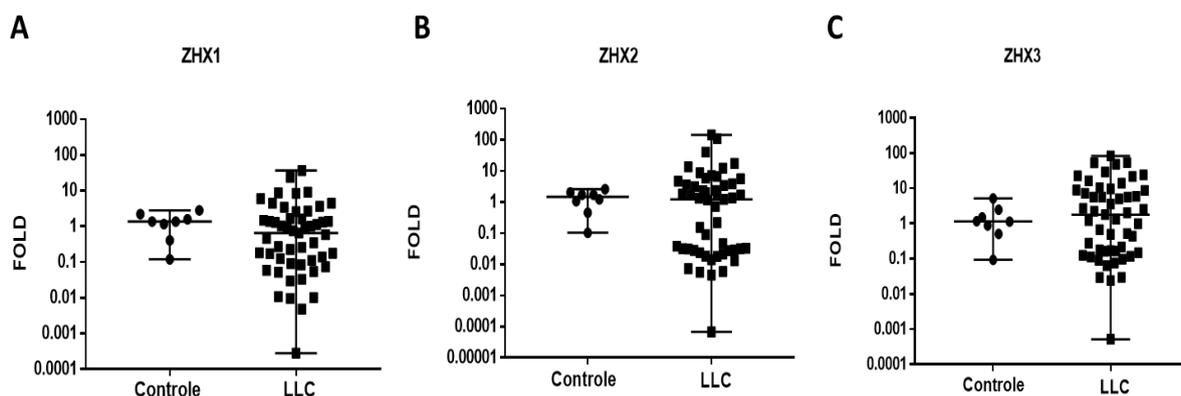


Figura 12. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC e em células B controle. A análise de expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC em comparação com células B controle (8 doadores saudáveis) não apresentou significância estatística. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

Considerando que o padrão de expressão dos genes alvos desse estudo foi muito heterogênea, dicotomizamos as amostras em “elevada” e “baixa” expressão desses genes. O limiar divisório adotado foi a mediana de expressão dos genes.

Como pode ser visto a seguir (Figura 13), não encontramos associação entre o padrão de expressão dos genes ZHX1 ($p=0,2$), ZHX2 ($p=0,5$) e ZHX3 ($p=0,5$) com o estágio de Binet.

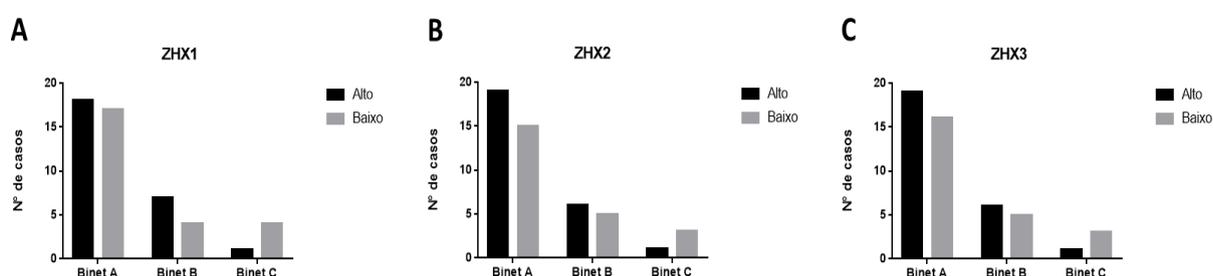


Figura 13. Associação da expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de casos conforme o estadiamento de Binet. A expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 foi dicotomizada em baixa e alta expressão, e classificada de acordo com o estágio de Binet apresentado pelos pacientes. Análise estatística realizada pelo teste de Fisher.

4.2.3 Associação entre a expressão dos genes da família ZHX com a leucometria e a contagem de plaquetas

Observamos que os pacientes que possuem baixa expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 apresentam aumento do número de leucócitos circulantes ($p=0,002$; $p=0,0003$ e $p=0,0005$; respectivamente) (Figura 14).

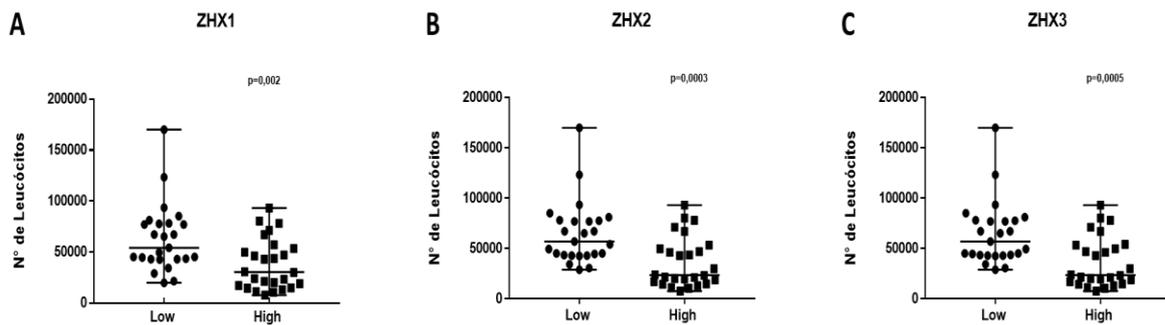


Figura 14. Associação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de leucócitos em pacientes com LLC. A contagem de leucócitos foi classificada de acordo com o padrão de expressão dos genes da família ZHX, apresentando uma expressão diminuída quando associada a uma leucometria acentuada dos pacientes. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

Por outro lado, a expressão dos genes ZHX1($p=0,2$), ZHX2 ($p=0,2$) e ZHX3($p=0,2$) não parece impactar no número de plaquetas dos pacientes (Figura 15).

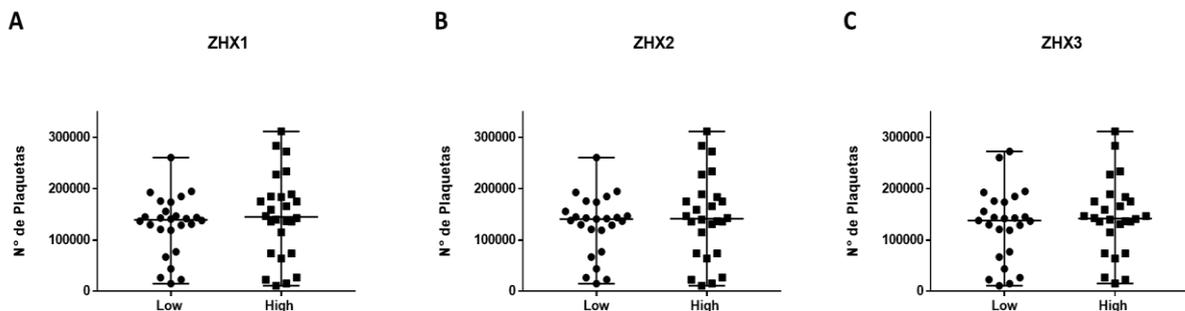


Figura 15. Associação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de plaquetas em pacientes com LLC. A contagem de plaquetas foi classificada de acordo com o padrão de expressão dos genes da família ZHX. Análise estatística foi realizada pelo teste de Mann Whitney.

4.2.4 Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e a expressão da proteína ZAP-70 em pacientes com LLC

Avaliamos também quantitativamente o padrão de expressão dos genes da família ZHX1, de acordo com a expressão da proteína ZAP-70. Como pode ser visto na Figura 16. Não há associação entre a expressão dos genes ZHX1 ($p=0,1$), ZHX2 ($p=0,1$) e ZHX3 ($p=0,1$) e o padrão de expressão de ZAP-70.

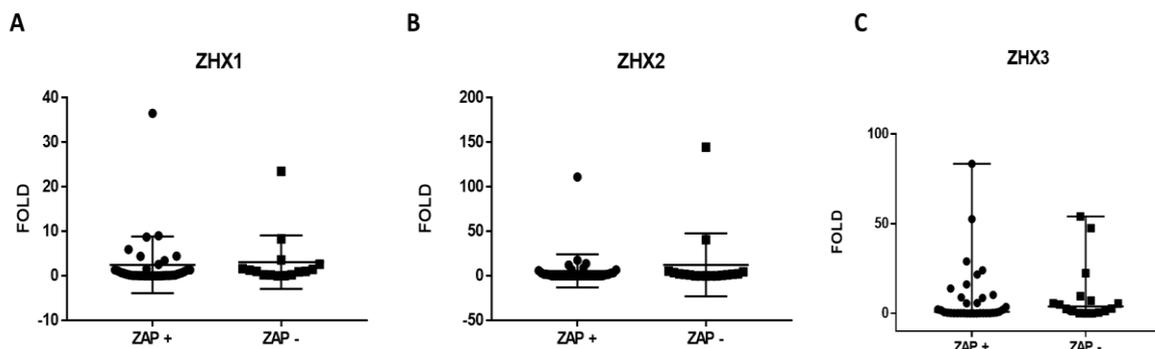


Figura 16. Associação entre o padrão de expressão de ZAP-70 e a expressão dos ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC. As amostras LLC foram classificadas quanto a expressão de ZAP-70, seguindo o *cut-off* de 20%. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney.

4.2.5 Associação entre a expressão dos genes da família ZHX e o cariótipo dos pacientes com LLC

Como forma de avaliar se a expressão dos genes da família ZHX impacta no cariótipo dos pacientes, classificamos as amostras de LLC considerando o seu cariótipo, em favorável, intermediário e desfavorável.

A associação da expressão dos genes ZHX comparados com os padrões prognósticos investigados, mostrou que a menor expressão de ZHX1 ($p=0,01$), ZHX2 ($p=0,005$) e ZHX3 ($p=0,001$) é preditiva de um cariótipo desfavorável na LLC (Figura 17).

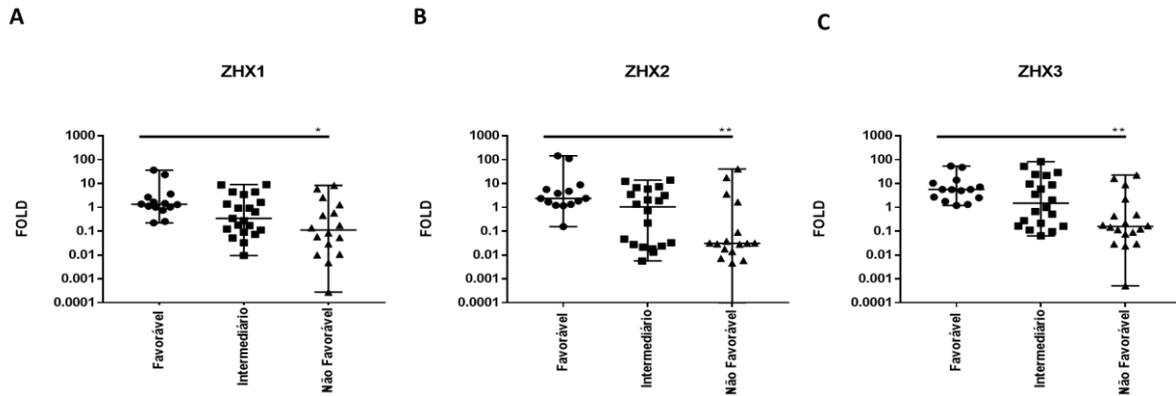


Figura 17. Associação entre a expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o cariótipo dos pacientes com LLC. O padrão de expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC foi analisado, considerando-se o prognóstico de cada cariótipo, sendo observado na expressão do gene ZHX1 ($p=0,01$), ZHX2 ($p=0,005$) e ZHX3 ($p=0,001$). A análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis.

Adicionalmente, classificamos o cariótipo dessa corte de acordo com o número de alteração cromossômicas apresentadas pelos pacientes. Os cariótipos foram classificados como: normal (sem alterações), 1 e 2 alterações cromossômicas e cariótipo complexo (3 ou mais alterações). Como pode ser visto na Figura 18, a baixa expressão dos genes da família ZHX está associada ao acúmulo de alterações citogenéticas, sendo ZHX1 ($p=0,004$), ZHX2 ($p=0,001$) e ZHX3 ($p=0,0005$).

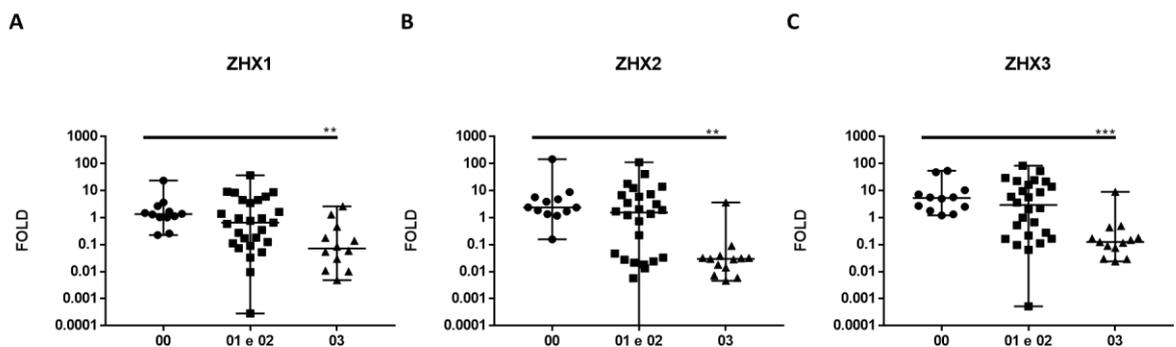


Figura 18. Associação entre a expressão dos gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 e o número de alterações cromossômicas em pacientes com LLC. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC foi relacionada com a aquisição de alterações citogenéticas, sendo classificadas de acordo com o número de alterações: 0 alterações, 01 e 02 alterações e 3 ou mais alterações cromossômicas. Apresentando respectivamente $p=0,004$, $p=0,001$ e $p=0,0005$. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis.

4.2.6 Avaliação *in silico* da expressão dos genes ZHX na LLC em comparação com amostras de medula óssea saudável

Por fim, avaliamos *in silico*, usando a base de dados BloodSpot, a expressão dos genes da família ZHX na LLC. Para isso, analisamos a expressão das sondas disponíveis na base de dados, sendo elas: *microarray probe 223213_at* e *microarray probe 223214_at* para ZHX1, *microarray probe 203556_at* e *microarray probe 1557706_at* para ZHX2 e por fim, *microarray probe 212535_at* e *microarray probe 217367_at* para ZHX3.

Avaliando a expressão das sondas descritas no estudo como de maior intensidade, foi observado maior expressão do gene ZHX1 ($p < 0,0001$) na LLC em comparação com a medula óssea saudável, padrão repetido na expressão do gene ZHX2 ($p = 0,05$). Não observamos diferença de expressão do gene ZHX3 ($p = 0,3$) entre as amostras de LLC e medula óssea saudável (Figura 19).

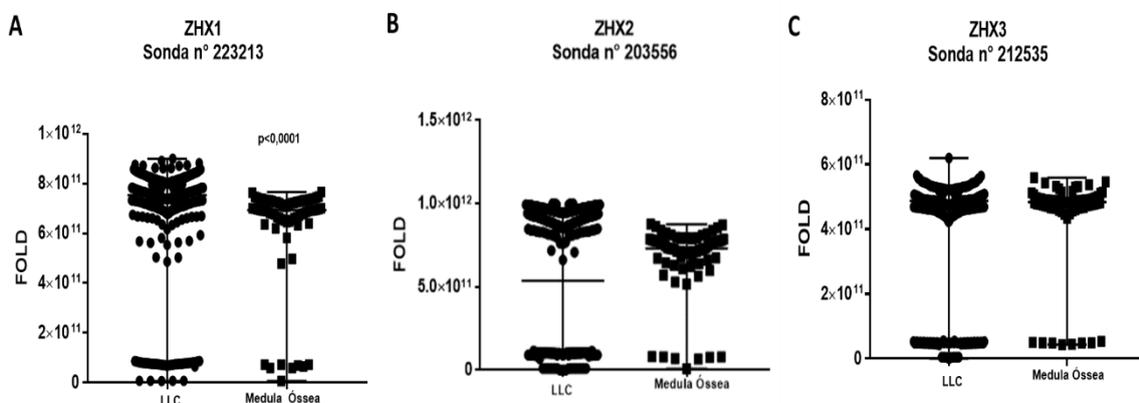


Figura 19. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC, com a sonda de maior intensidade, na LLC e em medula óssea controle. A análise de dados do banco de dados do grupo de estudo MILE revelou que a expressão do gene ZHX1 é regulada positivamente em 448 pacientes com LLC em comparação com 73 amostras de controle disponíveis, *microarray probe 223213_at*. Não apresentou significância estatística com os outros genes observados. Análise realizada com teste de Mann-Whitney.

Ao avaliar a sonda de menor intensidade, detectamos que os genes ZHX1 ($p = 0,0001$), ZHX2 ($p = 0,002$) e ZHX3 ($p = 0,003$) se apresentavam hiperexpressos em comparação com a medula óssea saudável (Figura 20).

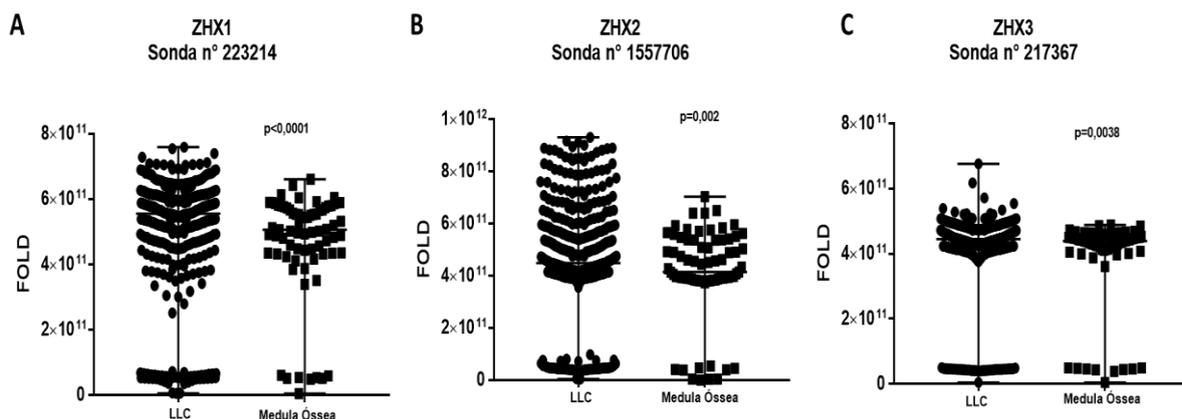


Figura 20. Expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC, com a sonda de menor intensidade, na LLC e em medula óssea controle. A análise de dados do banco de dados do grupo de estudo MILE revelou que a expressão do gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 é regulada positivamente em 448 pacientes com LLC em comparação com 73 amostras de controle disponíveis, respectivamente, *microarray probe 223214_at*, *microarray probe 1557706_at* e *microarray probe 217367_at*. Análise realizada com teste de Mann-Whitney.

4.2. Correlação entre os genes ZHX na LLC.

Nas amostras de LLC encontramos forte correlação entre a expressão de ZHX1 e ZHX2 ($p<0,0001$, $r=0,9$), ZHX1 e ZHX3 ($p<0,0001$ e $r=0,9$) e ZHX2 e ZHX3 ($p=0,0001$ e $r=0,9$) (Figura 21).

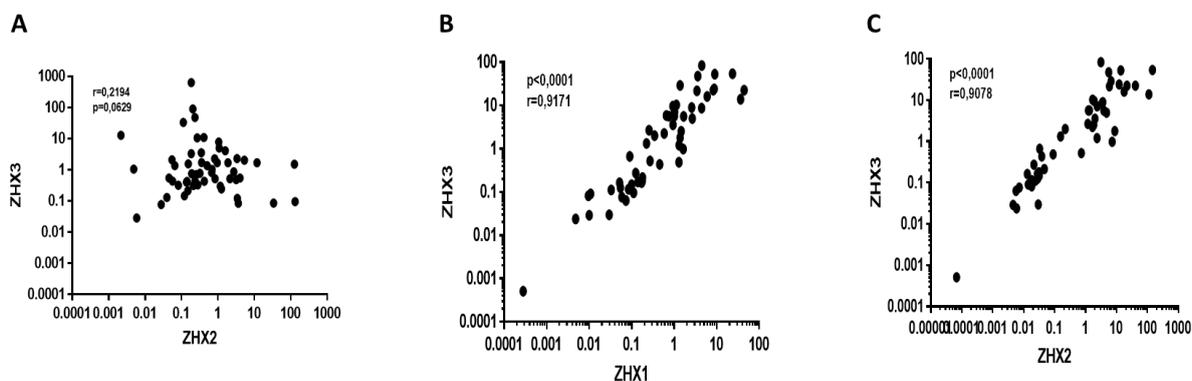


Figura 21. Correlação entre a expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC. Avaliamos se a expressão dos genes da família ZHX apresentam alguma correlação quando expressos na LLC. Encontramos forte correlação entre todos os membros, com significância estatística. A análise foi realizada com teste de correlação-Spearman r.

V - DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Padrões aberrantes de expressão gênica estão diretamente associados ao desenvolvimento e progressão do cancer. No presente estudo identificamos que os genes da família ZHX apresentam expressão alterada tanto na LMC, como na LLC. Mais importante, conseguimos identificar que esse padrão anômalo de expressão está diretamente associado à aquisição de mau prognóstico na LLC.

Inicialmente avaliamos a expressão de ZHX1, ZHX2 e ZHX3 em amostras de LMC e observamos que todos os membros da família ZHX apresentam expressão reduzida nessa leucemia, quando comparada às amostras controle, de indivíduos hematologicamente saudáveis. A partir desse achado focamos em identificar se essa expressão alterada poderia estar associada às fases da LMC, à resposta terapêutica dos pacientes aos inibidores de tirosina quinase e ao prognóstico, aferido pelo índice de Sokal. Entretanto, não identificamos nenhuma associação maior entre a expressão desses genes e esses parâmetros investigados. Destaca-se apenas que os pacientes tratados com Nilotinibe apresentaram baixa expressão de ZHX3, mas esse achado precisa ser validado, considerando que nossa corte possui apenas 2 casos de pacientes com esse tratamento. As alterações de expressão de membros da família ZHX podem se relacionar tanto ao processo fisiopatológico do cancer, como ao desenvolvimento e progressão do tumor (DE ANDRADE T, et al., 2010). Nos nossos achados não identificamos associação com as fases e prognóstico da doença, o que sugere que as alterações de expressão observadas podem estar mais associadas às fases iniciais de desenvolvimento da doença, após ocorrência da translocação e formação do cromossomo Ph1.

Legartova e colaboradores investigaram o papel de ZHX2 no mieloma múltiplo e reportaram que o gene ZHX2 está com expressão reduzida nessa doença e que atua no controle do ciclo celular, tendo como função a supressão tumoral (LEGARTOVA S, et al., 2010). Do

mesmo modo, ZHX2 também se apresenta com expressão reduzida e parece apresentar função de gene supressor de tumor no cancer gástrico (BAIL F, et al., 2020).

Nas amostras de LLC não identificamos diferença no nível de expressão dos membros da família ZHX ao compara-las com as amostras de doadores saudáveis. Entretanto o padrão de expressão desses membros se mostrou muito heterogenio na doença, o que nos vez dicotomizar as amostras com “baixa” e “elevada” expressão dos genes. É interessante, embora nenhuma associação da expressão desses genes com a expressão do marcador pronóstico ZAP-70 e estágio de Binet tenha sido identificada, os pacientes que apresentavam baixa expressão dos genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 mostraram aumento do número de leucócitos e alterações cariotípicas de mau prognóstico e acúmulo de aberrações cromossômicas.

Padrão similar também é descrito no caso do Linfoma de Hodgkin, onde o gene ZHX2, que tem papel supressor tumoral, tem expressão reduzida e parece atuar no desenvolvimento clonal da doença (NAGEL. S., 2012). Na literatura também descreve aumento de expressão de membros da família ZHX, em especial ZHX2, em células B e pré-B envolvidas na fisiopatologia do Linfoma de Hodgkin, quando comparadas com outras células hematopoiéticas (MARSHALL CB, et al., 2020). Importante, estudos focados na expressão gênica do gene ZHX2 em mieloma múltiplo identificaram que a baixa expressão do ZHX2 está associada ao risco de progressão do mieloma (SHAUGHNESSY J Jr., ZHAN F, BARDOGIE B, STEWARTt AK, 2005). A hiperexpressão do gene ZHX2 também se associa a um estado com duração prolongada de resposta ao tratamento e impacta na sobrevida global dos pacientes com mieloma múltiplo (S. LEGARTOVA, 2008 ARMELLINI A, 2008). Os resultados obtidos em estudos relacionados com carcinoma hepatocelular e câncer gástrico revelam que a expressão de ZHX1, ZHX2 e ZHX3 é reduzida nessas amostras quando comparada com a contraparte saudável. Tem sido reportado também que a expressão alterada de ZHX está associada ao pior prognostico do cancer gastrico (WANG J, Liu D, et al. 2013; MA X, et al, 2016). Em um estudo

avaliando a expressão do gene ZHX2 em tumores renais, foi observado que a depleção de ZHX2 causou diminuição na expressão de vários genes relacionados a apoptose, proliferação celular, invasão / metástase e metabolismo (ZHANG J, et al., 2018 YUE X, et al 2012).

No nosso estudo *in silico* a expressão do gene ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC encontra-se aumentada quando comparada com as células obtidas de medula óssea saudável, ou seja, os genes ZHX tendem a ser mais expressos em células B leucêmicas em comparação com todos os outros componentes medulares normais. Acreditamos que essa diferença de expressão gênica encontrada entre as amostras do nosso estudo e as amostras utilizadas no MILE *study* ocorra, pelo menos em parte, pelos diferentes controles utilizados, tendo em vista que no nosso estudo as amostras de LLC foram comparadas com células B purificadas. Outro ponto relevante é que de modo interessante a expressão de ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC revelada pela análise *in silico*, embora mostre um aumento de expressão desses genes na LLC, também mostra de modo bem marcado que uma quantidade de amostras de LLC apresenta níveis muito reduzidos desses transcritos. Entretanto, não se tratam dos mesmos pacientes, ao avaliarmos o nível de expressão dos três membros da família ZHX nesse grupo de baixa expressão revelado na análise *in silico*.

Quando avaliamos a correlação da expressão dos membros da família ZHX nas leucemias crônicas identificamos uma forte correlação entre os genes ZHX1, ZHX2 e ZHX3 na LLC. Tem sido discutido o papel de uma regulação transcricional comum, com envolvimento do fator Y nuclear (NF-Y) que possui como função a supressão transcricional e o BS69, que também é associado à inibição da expressão gênica (KNOW RJ, et al., 2017). Dentre os genes ZHX2 e ZHX3 ainda há em comum o mesmo domínio de expressão HD1, atuante na modulação gênica regulatória deles. No caso da LMC, não evidenciamos correlação com significância estatística entre os membros da família ZHX.

Por fim, nossos achados mostram que os membros da família ZHX podem ter impacto no desenvolvimento e prognóstico das leucemias crônicas. Em especial, na LLC nossa hipótese

é que esses genes atuem como supressores tumorais, conforme já foi demonstrado para outras neoplasias de células B. Pesquisas futuras serão importantes para validar o valor prognóstico da família ZHX em cortes independentes de LLC e também para elucidar os mecanismos exatos pelos quais o ZHX influenciam o início e a progressão das leucemias crônicas.

VI – CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Com os resultados apresentados foi possível observar que a a baixa expressão de genes da família ZHX, quando comparados com a LLC e seus respectivos fatores prognósticos, inferem que quanto menor a sua expressão mais desfavorável será o prognóstico dos pacientes. Essa expressão reduzida do genes da família ZHX sugerem qua na LLC essa família pode atuar como supressor de tumor.

No caso da LMC, é observado uma expressão reduzida dos genes da familia ZHX em comparação com indivíduos saudáveis. No entanto, não encontramos associação entre um nível de expressão desses genes e a resposta terapeutica ou prognóstico dos pacientes.

Os dados encontrados, mesmo que de forma preliminar podem indicar o desenvolvimento de novos estudos que visem correlacionar a ação dos *Zinc Fingers and Homeobox* e mecanismos oncohematológicos, evidenciando que os genes da família ZHX podem ter o papel como potencial biomarcador prognóstico na LLC.

VII - REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ADVANI A S, PENDERGAST. Mbc-Abl variants: biological and clinical aspects. *Leukemia research* v.26, p. 713-720. 2002.
- ANDREW, J. O.; et al. Histone-Fold Domain Protein NF-Y Promotes Chromatin Accessibility for Cell Type-Specific Master Transcription Factors. *Molecular Cell*. v.55, p. 708-722. 2014.
- APPERLEY, J. F. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet Journal*. v.385, p.1447- 1459. 2015.
- ARANA-TREJO, R. M. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clinical & Laboratory Haematology*. v.24, p.145150. 2002.
- ARMELINI, A.; SARASQUETE, ME.; GARCIA-SANZR et al. Low expression of ZHX2, but not RCBTB2 or RAN, is associated with poor outcome in multiple myeloma. *Haematol*.v.141.p.212-15.2008
- BACCARANI, M.; CORTES, J., PANE, F.; et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*. v.35, p. 6041-6051. 2009.
- BAIN BJ. Diagnosis from the blood smear. *The New England Journal of Medicine*. v.353. p.498-507.2005.
- BENATTI, P.; et al. Specific inhibition of NF-Y subunits triggers different cell proliferation defects. *Nucleic Acids Research*. v.39, p.5356-5368. 2011.
- BEUTLER, E.; Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. *Blood*. v.98, p. 2597-2602. 2001.

- BINET, J.; et al. Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. v.107, p.859-861. 2006.
- BINET, J.; et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*. v.48, p.198-206. 1981.
- BORTOLHEIRO, T. C.; CHIATTONE, C. S. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.30, suppl.1, p.3-7. 2008.
- BRADEN, B. C.; POLJAK, R.J. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *The FASEB Journal*. v.9, p.9-16. 1995.
- BUNGARTZ, G.; LAND, H.; SCADDEN, D. T.; EMERSON, S.G. NF-Y is necessary for hematopoietic stem cell proliferation and survival. *Blood*. v.119, p.1380-1389.2012.
- BURKE, B.; CARROLL, M. BCR-ABL: a multi-faceted promoter of DNA mutation in chronic myelogenous leukemia. *Nature. Leukemia*. v.24, p.1105-1112. 2010.
- CAGNETTA, A.; ADAMIA, S.; et al. Role of genotype-based approach in the clinical management of adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Leukemia Research*. Elsevier. v.38, n.6, p 649-659. 2014.
- CALLIGARIS-CAPPIO, F.; GHIA, P. The nature and origin of the B-chronic lymphocytic leukemia cell; a tentative model. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. v.18, p.849-863. 2004.
- CANITROT, Y p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood*. v.103; p1632-1637. 2003.
- CORTES, J.; KANTARJIAN, H. Advanced-phase chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology*. v.40, p.79-86. 2003.
- DAMLE, R. N.; WASIL, T.; FAIS, F.; et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression

- as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. v.14, p.1840-1847.1999.
- DE ANDRADE, T.; MOREIRA, L.; DUARTE, A.; et al. Expression of new red cell related genes in erythroid differentiation. *Biochemical Genetics*. v.48, p.164-171.2010.
- DEININGER, M. W. N.; et al. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. v.96. p.3343-3356. 2000.
- Di BACCO, A. Molecular Abnormalities in Chronic Myeloid Leukemia: Deregulation of Cell Growth and Apoptosis. *The Oncologist*. v.5. p.405-415. 2000.
- DOBBIN, J. A. Transformação da LLC-B: síndrome de Richter. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.27, p.287-289. 2005.
- DOHNER, H.; STILGENBAUER, S.; BENNER, A. Genomic aberrations and survival in CLL. *The New England Journal of Medicine: Research & Review*. v. 343, p.1910-1918. 2000.
- EL-NINAWY, N.S.; SHARAF, H. M.; EL HAMID. M.A. Prognostic significance of del 17p, ZAP-70 and CD38 as independent indicators for B-CLL: Correlation to response to treatment and disease outcome. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. v.13, p.173-181. 2012.
- FADERL, S. et al. The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. v.341, p.164-172.1999.
- GARICOCHEA, B. Patogênese da leucemia linfóide crônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.27, n.4, p.241-246. 2005.
- GOMES, L. C.; EVANGELISTA, F. C. G.; DE SOUSA, L. P.; et al. Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, 2017.

- GUIEZE, R.; WU, C. J. Genomic and epigenomic heterogeneity in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. v136, p.445-453. 2015.
- HALLEK, M.; et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute–Working Group 1996 guidelines. *Blood*. v.111, p. 5446-5456. 2008.
- HARDY, R.R.; et al. B-cell commitment, development and selection. *Immunological Reviews*. V.125, p.23-32. 2000.
- HASLINGER, C.; et al. Transcriptome correlates of genetically distinct B-CLL subtypes: genomic aberrations are associated with characteristic expression profiles. *Blood*. v.100, p.1215. 2002.
- JAFFE, E. S.; et al. Pathology and genetics of tumor of hematopoietic and lymphoid tissues. World Health Organization classification of tumors. 2001.
- JOHANSSON, B.; FIORETOS, T.; MIELMAN, F. Cytogenetic and Molecular Genetic Evolution of Chronic Myeloid Leukemia. *Acta Haematologica*. v.107, p. 76-94. 2002.
- KANTARJIAN, H. et al. Imatinib mesylate therapy in newly diagnosed patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia: high incidence of early complete and major cytogenetic responses. *Blood*. v.101, p. 97-100. 2003.
- KAWATA, H.; et al. Zinc-fingers and homeoboxes (ZHX) 2, a novel member of the ZHX family, functions as a transcriptional repressor. *The Biochemical Journal*. v.373, p. 747-757. 2003.
- KIPPS, T. J. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature reviews*. 2017.
- KONOPKA, J. B.; WATANABE, S. M.; SINGER, J.W; COLLINS, S. J.; WITTE, O. N. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia

- patients express c-abl proteins with a common structural alteration. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.82, p.1810-1814. 1985.
- KURZROCK, R., KANTARJIAN H.M.; DRUKER, B. J.; TALPAZ, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. Annals of internal medicine. v.128, p819-830. 2003.
- KWON, R.J.; KIM, YH.; JEONG DC; LIU, L.; et al. Expression and prognostic significance of zinc fingers and homeoboxes family members in renal cell carcinoma. Plos One.v12. 2018.
- LEGARTOVA, S.; et al. Expression of RAN, ZHX-2, and CHC1L genes in multiple myeloma patients and in myeloma cell lines treated with HDAC and Dnmts inhibitors. Neoplasma. v.57, p.482-487. 2010.
- LIU, Y.; MA, D.; JI, C. . Zinc fingers and homeoboxes family in human diseases. Cancer Gene Ther. v.22, p.223–226. 2015.
- LU, Q.; QIU, X.; HU, N.; WEN, H.; SU, Y.; Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. Ageing Research Reviews, Oxford, v. 5, p. 449-467, 2006.
- MA, X.; HUANG, M.; WANG, Z.; et al. ZHX1 Inhibits Gastric Cancer Cell Growth through Inducing Cell-Cycle Arrest and Apoptosis. Journal of Cancer . v.7, p.60-68. 2016.
- MACE, C.; AVILA, M.D.N.; MARSHALL, C. B.; et al. The zinc fingers and homeoboxes 2 protein ZHX2 and its interacting proteins regulate upstream pathways in podocyte diseases. Kidney International. v.97, p.753-764. 2020.
- MELCHER, F.; et al. Identification of CD19–B220+c-Kit+Flt3/Flk-2+cells as early B lymphoid precursors before pre-B-I cells in juvenile mouse bone marrow, International Immunology. v.12, p.313-324. 2000.
- MELO, J.V.; HOCHHAUS, A.; YAN, X. H.; GOLDMAN, J.M. Lack of correlation between

- ABL-BCR expression and response to interferon-alpha in chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. v.92; p.684-686.1996.
- MESSMER, B. T.; et al. Multiple Distinct Sets of Stereotyped Antigen Receptors Indicate a Role for Antigen in Promoting Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Experimental Medicine* . v.200, p.519-525.2004.
- NAGEL, S SCHNEIDER B, MEYER C, KAUFMANN M, et al. Transcriptional deregulation of homeobox gene ZHX2 in Hodgkin lymphoma. *Leukemia Research*. v.36, p.646-655. 2012
- NOWELL PC, HUNGERFORD DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. v.25:85-109. 1960.
- O'HARE, T. AP24534, a Pan-BCR-ABL Inhibitor for Chronic Myeloid Leukemia, Potently Inhibits the T315I Mutant and Overcomes Mutation-Based Resistance. *Cancer Cell*. V.16, p401-412. 2009.
- O'BRIEN, S. G.; et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronicphase chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*. v.384, p.994-1004.2003.
- RAI, K.R.; JAIN, P. Chronic lymphocytic leukemia (CLL)-Then and now. *American Journal of Hematology*. v.91, p330-340. 2016.
- RAI, K. R.; et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia: recent progress and future directions. *Blood*. v.46, p 219-234. 1975.
- ROSENWALD, A.; et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*. v.194, p.1639-1647. 2001.
- ROWLEY, J. A.; New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous

- Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. v.243, p.290-293. 1973.
- SCARFO, L.; FERRERI, A. J.; GHIA, P. Chronic lymphocytic leukaemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* . v.104, p169-182. 2016.
- SHAUGNESSY, J. JR.; BARLOGIE, B.; STEWART, A. K. Gene expression profiling and multiple myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. v.18, p.537-552.2005.
- STORLAZZI, C.T. et al. Breakpoint characterization of der(9) deletions in chronic myeloid leukemia patients. *Genes Chromosom. Cancer*. v.35, p.271-276. 2002.
- SETÚBAL, D.C.; et al. Therapy of chronic myeloid leukemia with imatinib mesylate in Brazil: study of 98 cases. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. v.27, p159-165. 2005.
- SOKAL, J.E.; et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. v.63; p.789-799. 1984.
- TEFFERI A.; DEWALD G. W.; LITZOW M.L.; CORTES J.; et al. Chronic myeloid leukemia: current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier, v. 80, p. 390-402, 2005.
- ZAGO, M.A.; FALCÃO R. P.; PASQUINI R. *Hematologia: fundamentos e prática*. 1. Ed. São Paulo: Atheneu, 2001.
- WICKREMASINGHE, R.; HOFFBRAND, A. Biochemical and Genetic Control of Apoptosis: Relevance to Normal Hematopoiesis and Hematological Malignancies. *Blood*. v.93, p.3587-3600. 1999.
- WILLIAM, J.; et al. Evolution of auto-antibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science*. v.397, p.2066-2070. 2002.

YOU, Y.; BAI, F.; LI, H.; MA, Y.; YAO, L.; HU, J.; TIAN, Y. Prognostic value and therapeutic implications of ZHX family member expression in human gastric cancer. *Am J Transl Res.*v.12, p3376-3388. 2020.

YUE, X.; ZHANG, Z.; LIANG, X.; GAO, L.; et al Zinc fingers and homeoboxes 2 inhibits hepatocellular of cyclins A and E. *Gastroenterology.* v.142.p 1559. 2012.

ZHANG, S.; KIPPS, T. J.; The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* v.9, p.103-118. 2014.

VIII – ANEXOS

LETTER TO THE EDITOR

Open Access

Low expression of ZHX1 and ZHX2 impacts on the prognosis of chronic lymphocytic leukemia



Natália Joseph Gladistone Maciel^{1,2}, Luma Dayane Carvalho Filiú-Braga¹, Francisco Assis Rocha Neves², Eduardo Magalhaes Rego³, Antonio Roberto Lucena-Araujo⁴ and Felipe Saldanha-Araujo^{1*}

Abstract

Experimental evidence points to the role of Zinc fingers and homeoboxes protein 1 and 2 (ZHX1 and ZHX2) in the development and progression of several types of cancer, including hematological malignancies. Here, we determined whether the altered expression of *ZHX1* and *ZHX2* has clinical implications in patients with CLL. Interestingly, CLL patients with low expression *ZHX1* and *ZHX2* presented higher WBC counts. Importantly, our data showed that CLL patients with cytogenetic alterations presented reduced transcriptional levels of *ZHX1* and *ZHX2* in comparison with patients with normal karyotype. Moreover, when stratifying CLL patients according to the karyotype prognosis value, we observed that the expression of *ZHX1* and *ZHX2* was significantly reduced in CLL patients presenting adverse karyotypes. Finally, we stratified patients according to the number of chromosomal aberrations and observed a negative association between *ZHX1* and *ZHX2* expression and the accumulation of chromosomal abnormalities in CLL patients. Our data showed that the low expression of *ZHX1* and *ZHX2* is associated with a worse prognosis in CLL, followed by a greater number of leukemic cells and unfavorable cytogenetics findings in the diagnosis. Further studies will be important to confirm the prognostic value of *ZHX1* and *ZHX2* in independent CLL cohorts.

Keywords: ZHX1, ZHX2, Chronic lymphocytic leukemia, Karyotype, Prognosis

To the Editor,

Zinc fingers and homeoboxes protein 1 and 2 (ZHX1 and ZHX2) are two members of the zinc-finger and homeobox families, which act as transcriptional repressors. Experimental evidence points to the role of such ZHX members in the development and progression of several types of cancer, including hematological malignancies [1]. Nevertheless, the expression of ZHX members on CLL remains unknown.

In this article, we determined whether the altered expression of *ZHX1* and *ZHX2* has clinical implications in patients with CLL. Initially we accessed the BloodSpot

database by the International Microarray Innovations in Leukemia (MILE) study group [2], which was performed in a cohort of 73 healthy bone marrow samples and 448 CLL patients. Additionally, *ZHX1* and *ZHX2* expression was determined by quantitative real-time PCR in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from 51 CLL patients, diagnosed according to Matute's score, and treated at the University Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto (University of São Paulo, Brazil). For comparison purposes, 8 samples of peripheral blood B-sorted cells from age-matched healthy volunteers were included. Flow cytometry analysis of ZAP70 expression was performed, following the identification of the CD19+ CD5+ population. Patients presenting at least 20% of leukemic cells expressing ZAP-70 were designated as "ZAP-70 positive". Cytogenetic

* Correspondence: felipearaujo@urtp.br

¹Laboratório de Hematologia e Células-Tronco, Universidade de Brasília, Av. L2 Norte, Brasília, DF 70910-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.