



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

ÁGATHA TEREZA MIRANDA TAVARES

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *PRDM16* EM
PACIENTES PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA**

BELÉM - PA

2024

ÁGATHA TEREZA MIRANDA TAVARES

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *PRDM16* EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat.

BELÉM - PA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

T231a Tavares, Ágatha Tereza Miranda.
 Avaliação do perfil de expressão do gene PRDM16 em
 pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda / Ágatha
 Tereza Miranda Tavares. — 2024.
 104 f. : il. color.

 Orientador(a): Prof. Dr. André Salim Khayat
 Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
 Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
 Genética e Biologia Molecular, Belém, 2024.

 1. Leucemia linfóide. 2. Domínios PR-SET. 3. Elementos
 Reguladores de Transcrição. 4. Perfil da Expressão Gênica. I.
 Título.

CDD 599.935

ÁGATHA TEREZA MIRANDA TAVARES

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *PRDM16* EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat.

Data: 05 de novembro de 2024.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. André Salim Khayat
Orientador - UFPA

Dr. Fernando Augusto Rodrigues Mello Junior
Membro externo - HOI

Dr. Fabiano Cordeiro Moreira
Membro interno - UFPA

Dra. Alayde Vieira Wanderley
Membro externo - HOIOL

Dr. Samir Mansour Moraes Casseb
Membro suplente - UFPA

BELÉM

2024

*À minha família, que sob muito sol, fizeram-me
chegar até aqui, na sombra.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo, por sempre semearem oportunidades incríveis na minha vida e por manterem minha energia segura e focada no meu objetivo, apesar das várias adversidades. À Universidade Federal do Pará, ao Programa de Genética e Biologia Molecular e ao Núcleo de Pesquisas em Oncologia, por subsidiarem minha formação acadêmica e profissional.

À menina dos meus olhos, minha mãe Franciane Miranda, meu maior exemplo de perseverança, força e inspiração para que eu continue crescendo nessa vida.

À minha avó, Maria Tereza Miranda, por ser minha fortaleza e peça fundamental do meu crescimento. À minha tia Aida Miranda, por sempre zelar por mim, do seu jeito.

Ao meu pai, João de Castro, por ter me proporcionado a melhor educação que eu poderia receber e por nunca ter deixado faltar nada na minha formação pessoal e profissional.

À minha madrinha, Simone Cruz, por ter me motivado a ser curiosa sobre as coisas e, consequentemente, ser uma pesquisadora.

Ao meu irmão, Kauan Miranda, pelas tapinhas nas costas incentivadoras enquanto estava escrevendo essa dissertação.

Aos meus cachorros, Thor, Ludmilla, Miah, Sansão, Miguel, Juninho, Bóris, e principalmente ao Golias, por ser meu amor e minha alegria ao final dos dias cansativos.

Ao restante da minha família, que desde sempre acreditou no meu potencial e cuidou para que eu pudesse me dedicar aos estudos, principalmente aos meus avós, Maria, João e Procópio (todos *in memoriam*) e aos meus tios Nanã Miranda, Diego Martins, Márcia Tavares e Natal.

Ao meu namorado, Lorrان de Moraes, por ter tido todo o carinho, atenção, amor e paciência para entender, apoiar e me incentivar nessa fase da minha vida.

Às minhas sogras, Leide e Zélia Leão, que sempre me incentivaram a lutar por lugares maiores e melhores.

Às minhas amigas mais íntimas, Lorena Correa, Eduarda Randel, Richelli Barbosa e Sandy Gomes, por sempre me lembrarem de que eu sou capaz e por sempre tratarem nossa amizade com tanto carinho e zelo.

À minha psicóloga, Ana Violeta Pinheiro, por ter me ajudado a trilhar um caminho mais saudável e seguro durante esse período do mestrado.

Ao meu orientador, André Khayat, pela sua paixão pela ciência, a qual me contagiou, me fazendo entender e acreditar na importância do meu trabalho.

Aos membros da minha linha de pesquisa, Marcelo Oliveira, Márcio Aquino, Dejair Duarte, Karla Valéria, Jhony Botelho e Dra. Bruna Khayat, por me acolherem e partilharem o mesmo sonho que eu. Agradeço especialmente à Lucas Rotella, por ser meu mentor e por ter revisado esta dissertação; e à Vitória Viana, por ter guiado meus primeiros passos no mestrado e, no meio desse caminho, ter se tornado uma grande amiga que levo no coração.

Ao restante do grupo “*et al.*”, por serem simplesmente incríveis. À Aline, pelas caronas e incentivos calorosos. À Ingryd, por sanar minhas dúvidas com tanta gentileza. À Manu, pelas conversas sobre a vida. À Thaíssa, pelos corujões científicos. Ao Ramon, pelas “terapias” necessárias do dia a dia. À Monique e à Victoria, por sempre levantarem o astral da sala. Aos queridos Eliel, Nay, Israel, Lucas, Amanda e Cybelle, pelas risadas “frouxas” até nos dias difíceis. Aos demais integrantes do meu grupo de pesquisa e do NPO que ajudaram na minha evolução durante esses dois anos. E aos diversos estagiários rotatórios que passaram um tempo comigo, me dando a oportunidade de ensinar e de aprender também.

À equipe do laboratório de biologia molecular do Hospital Ophir Loyola e à equipe do Hospital Oncológico Infantil Otávio Lobo, por sempre me receberem tão gentilmente.

Aos pacientes que participaram deste estudo, por serem sinônimo de força e superação, o que me motiva a continuar nessa linha de pesquisa. Ao Instituto Áster, por me mostrar o lado humano da oncologia.

A todos que contribuíram na minha jornada pessoal e acadêmica, de alguma forma, e que participaram da construção que sou hoje. Apenas gratidão.

*Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também,
uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que
impressionam como se fossem um conto de fadas. (Marie Curie)*

RESUMO

Sob a ótica molecular, o câncer é um emaranhado de alterações multifacetadas que conectam as esferas genética, epigenética e ambiental. A leucemia, um câncer hematopoiético, afeta principalmente os glóbulos brancos e é marcada por desregulações na proliferação e diferenciação celular. Nesse contexto, a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) é o tipo de câncer pediátrico mais comum. O diagnóstico precoce é essencial e inclui a análise de biomarcadores genéticos. Além das classificações moleculares existentes, novas pesquisas estão focadas em reguladores epigenéticos como o gene *PRDM16*, cujas alterações na leucemogênese já foram pontuadas anteriormente. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi identificar o perfil de expressão do gene *PRDM16* na LLA pediátrica. Para tanto, foi avaliada a expressão do gene em amostras de pacientes pediátricos recém diagnosticados e atendidos em um hospital de referência da cidade de Belém-PA, considerando também dados clínicos, laboratoriais e moleculares. O ensaio de expressão gênica foi conduzido com o gene *PRDM16* e dois genes referência (*ABL1* e *ACTB*), utilizando sondas *TaqMan*®. Além disso, o estudo contou com um grupo controle de indivíduos saudáveis. As análises estatísticas foram conduzidas pela plataforma *Endogene Analyzer* e nos softwares PSPP versão 1.2, Jamovi 2.3 e Bioestat 5.3. Entre os pacientes, houve predominância do gênero masculino, amostras de sangue periférico e faixa etária de 2 a 9 anos. Quadros de leucopenia, anemia e plaquetopenia foram os prevalentes. As fusões mais frequentes foram *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e *BCR::ABL1*. *PRDM16* foi significativamente superexpresso no grupo LLA, em comparação ao controle ($p = 0,001$; FC = 10,21). Encontrou-se *PRDM16* mais alterado na LLA-T ($p = 0,000$; FC = 36,01) do que na LLA-B ($p = 0,024$; FC = 6,46), sendo essa tendência sustentada nas demais avaliações estatísticas. Além disso, um menor nível de superexpressão de *PRDM16* associou-se a casos de trombocitose ($p = 0,025$). Curiosamente, uma pequena parcela dos pacientes demonstrou silenciamento do gene, o que se associou com a ausência de fusões gênicas ($p = 0,033$). A análise de curva ROC apontou que *PRDM16* é um bom discriminante entre LLA-B e LLA-T (AUC = 0,95). Os dados supracitados indicam que existe uma predominância de superexpressão do fator de transcrição *PRDM16* em pacientes pediátricos com LLA, apesar de existem casos de modulação negativa do gene. Dada a sua contribuição para a regulação de diversos genes importantes para a diferenciação do início da cadeia hematopoiética, esse achado de desregulação de *PRDM16* pode contribuir para a elucidação do complexo processo leucemogênico.

Palavras-chave: Leucemia linfóide, Domínios PR-SET, Elementos Reguladores de Transcrição, Perfil da Expressão Gênica.

ABSTRACT

From a molecular perspective, cancer is a tangle of multifaceted changes that connect the genetic, epigenetic and environmental spheres. Leukemia, a hematopoietic cancer, primarily affects white blood cells and is marked by dysregulations in cell proliferation and differentiation. In this context, Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common type of pediatric cancer. Early diagnosis is essential and includes analysis of genetic biomarkers. In addition to existing molecular classifications, new research is focused on epigenetic regulators such as the *PRDM16* gene, whose changes in leukemogenesis have been previously reported. Therefore, the objective of this work was to identify the expression profile of the *PRDM16* gene in pediatric ALL. To this end, gene expression was evaluated in samples from pediatric patients recently diagnosed and treated at a reference hospital in the city of Belém-PA, also considering clinical, laboratory and molecular data. The gene expression assay was conducted with the *PRDM16* gene and two reference genes (*ABL1* and *ACTB*), using TaqMan® probes. Furthermore, the study included a control group of healthy individuals. Statistical analyzes were conducted using the Endogene Analyzer platform and PSPP version 1.2, Jamovi 2.3 and Bioestat 5.3 softwares. Among the patients, there was a predominance of males, peripheral blood samples and an age range of 2 to 9 years. Leukopenia, anemia and thrombocytopenia were prevalent. The most frequent fusions were *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* and *BCR::ABL1*. *PRDM16* was significantly overexpressed in the ALL group compared to control ($p = 0.001$; FC = 10.21). *PRDM16* was found to be more altered in T-ALL ($p = 0.000$; FC = 36.01) than in B-ALL ($p = 0.024$; FC = 6.46), and this trend was supported in the other statistical evaluations. Furthermore, a lower level of *PRDM16* overexpression was associated with cases of thrombocytosis ($p = 0.025$). Interestingly, a small portion of patients demonstrated gene silencing, which was associated with the absence of gene fusions ($p = 0.033$). The ROC curve analysis showed that *PRDM16* is a good discriminant between B-ALL and T-ALL (AUC = 0.95). The aforementioned data indicate that there is a predominance of overexpression of the *PRDM16* transcription factor in pediatric patients with ALL, although there are cases of negative modulation of the gene. Given its contribution to the regulation of several genes important for the differentiation of the beginning of the hematopoietic chain, this finding of *PRDM16* deregulation may contribute to the elucidation of the complex leukemogenic process.

Key words: Lymphoid Leukemia, PR-SET Domains, Regulatory Elements, Transcriptional, Gene Expression Profiling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O modelo de progressão das células-tronco leucêmicas.....	19
Figura 2: Tipos de câncer mais frequentes na região norte do Brasil em 2023, exceto pele não melanoma.....	21
Figura 3: Evolução do conhecimento biológico das leucemias agudas.....	22
Figura 4: Subtipos genéticos de LLA de acordo com o valor prognóstico.....	27
Figura 5: Modelo de reconhecimento de DNA específico do local por domínios de dedo de zinco C2H2	29
Figura 6: Várias regulamentações das funções das proteínas ZNF na progressão do câncer.	30
Figura 7: Mecanismos carcinogênicos de mutações envolvendo a proteína KMT2A na leucemia.....	32
Figura 8: Estrutura genética da família de proteínas PRDMs.....	33
Figura 9: Árvore filogenética de metiltransferases.....	34
Figura 10: Isoforma PRDM16F.....	37
Figura 11: Sequência dos domínios das isoformas PRDM16F e PRDM16S.....	38
Figura 12: Interação de PRDM16 como metiltransferase H3K4 em células pré-leucêmicas....	39
Figura 13: Dinâmica da atividade de metiltransferase de PRDM3 e PRDM16 e os efeitos do silenciamento dos genes.....	39
Figura 14: Esquema do processamento inicial da amostra.....	48
Figura 15: Esquema da extração de RNA.....	49
Figura 16: Esquema de análise de qualidade do RNA extraído.....	50
Figura 17: Esquema de conversão de RNA em cDNA.....	51
Figura 18: Esquema da testagem de fusões gênicas por Nested PCR.....	53
Figura 19: Esquema da testagem de expressão do gene <i>PRDM16</i>	55
Figura 20: Expressão diferencial de <i>PRDM16</i> entre grupo LLA e grupo controle.....	62
Figura 21: Expressão diferencial de <i>PRDM16</i> entre grupo controle e casos de LLA-B e LLA-T.....	62
Figura 22: Comparação de grau de hipereexpressão de <i>PRDM16</i> entre LLA-B e LLA-T.....	65
Figura 23: Comparação de ocorrência de fusões gênicas entre casos de expressão ou silenciamento de <i>PRDM16</i>	68
Figura 24: Curva ROC comparando grupo LLA vs. grupo controle.....	69
Figura 25: Curva ROC comparando grupo LLA-B vs. grupo LLA-T.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da OMS de 2022 para leucemia linfóide aguda.....	22
Tabela 2: Sequência de <i>primers</i> das 5 principais fusões gênicas documentadas em LLA.....	52
Tabela 3: Informações das sondas <i>TaqMan®</i> para <i>PRDM16</i> , <i>ACTB</i> e <i>ABL1</i>	54
Tabela 4: Dados clínicos dos pacientes com LLA.....	58
Tabela 5: Dados laboratoriais dos pacientes com LLA.....	59
Tabela 6: Dados moleculares dos pacientes com LLA.....	60
Tabela 7: Perfil de expressão do gene <i>PRDM16</i> nos pacientes com LLA.....	60
Tabela 8: Análise de Ct comparativo e fold change da expressão de <i>PRDM16</i> nos pacientes com LLA.....	61
Tabela 9: Análises de médias de FC, correlação e associação dos dados clínicos, laboratoriais e moleculares com os níveis de expressão de <i>PRDM16</i>	64
Tabela 10: Comparação entre médias de parâmetros com a expressão de <i>PRDM16</i>	66
Tabela 11: Comparação entre médias de parâmetros entre amostras com e sem a expressão de <i>PRDM16</i>	66
Tabela 12: Comparação entre dados clínicos, laboratoriais e moleculares e expressão ou silenciamento de <i>PRDM16</i>	66

LISTA DE SIGLAS

ABL1 – *ABL proto-oncogene 1*
aCGH – Matriz de Hibridização Genômica Comparativa
ACTB – *Actin beta*
ALDH2 – *Aldehyde dehydrogenase 2 family member*
AP-1 – *AP-1 transcription factor subunit*
AUC – Área sob a curva
BACH2 – *BTB domain and CNC homolog 2*
BCR – *Breakpoint Cluster Region*
C – Cisteína
CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CAR-T cell – Terapia com células T do receptor de antígeno quimérico
C2H2 – ZNF com sequências C-x-C-x-H-x-H em *tandem*
cDNA – DNA complementar
CDKN2A – *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*
CEBPA – *CCAAT enhancer binding protein alpha*
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CD – *Cluster of differentiation*
CLP – Progenitor linfóide comum
CMP – Progenitor mielóide comum
CNA – Alteração no número de cópias
CNS – Conselho Nacional de Saúde
Ct – *Cycle threshold*
CtBP – Região de ligação proteica C-terminal
CTH – Célula-tronco hematopoiética
DNMT3A – *DNA methyltransferase 3 alpha*
ERO – Espécies reativas de oxigênio
ETV6 – *ETS variant transcription factor 6*
FAB – Grupo Franco Americano Britânico
FC – *Fold change*
FLT3 – *Fms related receptor tyrosine kinase 3*
FLT3-ITD – Duplicação interna em tandem de *FLT3*
GAPDH – *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

GATA1 – *GATA binding protein 1*
GATA2 – *GATA binding protein 2*
GLOBOCAN – Observatório Global do Câncer
GMP – Progenitor granulocítico e monocítico
H – Histidina
H3 – Histona 3
H4 – Histona 4
H₂O NF – *Água nuclease free*
HKMT – Histonas lisina metiltransferases
HMT – Histonas metiltransferases
HOIOL – Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo
HOXA – *Homeobox A cluster*
HOXB4 – *Homeobox B4*
HPRT – *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase*
iAMP21 – Amplificação intracromossômica do cromossomo 21
IC – Intervalo de confiança
IGL@ – *Immunoglobulin lambda locus*
IGSF9 – *Immunoglobulin superfamily member 9*
IKZF1 – *IKAROS family zinc finger 1*
INCA – Instituto Nacional do Câncer
IMC – Índice de Massa corporal
K – Lisina
KMT2A – *Lysine methyltransferase 2A*
LIM – Domínios *Lin-11, Isl-1 e Mec-3*
LLA – Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA-B – Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
LLA-CPB – LLA de células precursoras B
LLA-T – Leucemia Linfoblástica Aguda de células T
LLC – Leucemia Linfocítica Crônica
LMA – Leucemia Mieloide Aguda
LMC – Leucemia Mieloide Crônica
LMPP – Progenitores linfoides multipotentes
LSC – Células-tronco leucêmicas
LSK – *Linage-Stage Sca-1+ c-Kit+*

MEP – Progenitor megacariocítico e eritrocítico

MFN2 – *Mitofusin 2*

MIQE – *Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*

MPP – Progenitores multipotentes

NCI – *National Institute of Cancer*

Nested RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase por Transcriptase Reversa

NPM1 – *Nucleophosmin 1*

NPO – Núcleo de Pesquisa em Oncologia

NTC – Controle negativo

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*

PBX1 – *Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1*

Ph – Cromossomo Filadélfia

PHD – Homeodomínio de Planta

qPCR – Reação Em Cadeia da Polimerase Quantitativa

PR – Domínio *PRDF1-RIZ1*

PRDF1 – Domínio regulador positivo do fator de ligação I 1

PRDM – Proteína com domínio PR

PRDM16 – Gene da proteína 16 com domínio PR

PR-minus – Isoforma sem PR

PR-plus – Isoforma completa

PTEN – *Phosphatase and tensin homologue*

PU.1 – proteína codificada pelo gene *Spi-1 proto-oncogene*

RING – Novo Gene Realmente Interessante

RIZ1 – Gene 1 do dedo de zinco que interage com a proteína do retinoblastoma 1

RNAseq – Sequenciamento de RNA

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcriptase Reversa

RUNX1 – *RUNX family transcription factor 1*

SAM/AdoMet – S-adenosil metionina

SET – Su (var) 3-9, Enhancer of zeste e Trithorax

SKI – *SKI proto-oncogene*

SMAD – *Mothers against dpp*

SMD – Síndrome Mielodisplásica

STIL – *STIL centriolar assembly protein*

STAT5 – *Signal transducer and activator of transcription 5*

TAL1 – *TAL bHLH transcription factor 1*

TALE – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

TCF3 – *Transcription factor 3*

TGF- β – *Transforming growth factor beta*

THADA – *THADA armadillo repeat containing*

TP53 – *Tumor protein p53*

UBTF – *Upstream binding transcription factor*

UNACON – Unidade de Alta Complexidade em Oncologia

Zn – Íon zinco

ZNF – Dedo de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 LEUCEMIAS	19
1.1.1 Considerações gerais	19
1.1.2 Epidemiologia	20
1.1.3 Classificação das leucemias	21
1.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	23
1.3 BIOMARCADORES GENÉTICOS NA LLA	24
1.4 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL	28
1.4.1 Proteínas dedo de zinco	28
1.4.2 Histonas metiltransferases	31
1.5 FAMÍLIA PRDM	33
1.5.1 Características estruturais	33
1.5.2 Características funcionais	34
1.5.3 Família PRDM e câncer	35
1.6 <i>PRDM16</i>	37
1.6.1 Propriedades funcionais de <i>PRDM16</i>	40
1.6.2 Apresentação de <i>PRDM16</i> no câncer	40
1.6.3 Papel de <i>PRDM16</i> nas malignidades hematológicas	41
2. JUSTIFICATIVA	43
3. OBJETIVOS	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 TIPO DE ESTUDO	46
4.2 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	46
4.3 LOCAL DE ESTUDO	46
4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	47
4.5 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS	47
4.5.1 Coleta de dados	47
4.5.2 Coleta de amostras biológicas	48
4.6 EXTRAÇÃO DE RNA	49
4.7 ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DE RNA	49
4.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA EM cDNA	50
4.9 ANÁLISE DE FUSÕES GÊNICAS PARA LLA	51

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>PRDM16</i>	54
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
4.12 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS	57
5. RESULTADOS	58
5.1 DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E MOLECULARES	58
5.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>PRDM16</i>	60
5.3 EXPRESSÃO DE <i>PRDM16</i> vs. DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E MOLECULARES	63
5.4 EXPRESSÃO vs. SILENCIAMENTO DE <i>PRDM16</i>	66
5.5 ANÁLISE DE CURVA ROC DE <i>PRDM16</i>	68
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ANEXO I: PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA	100
ANEXO II - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	101

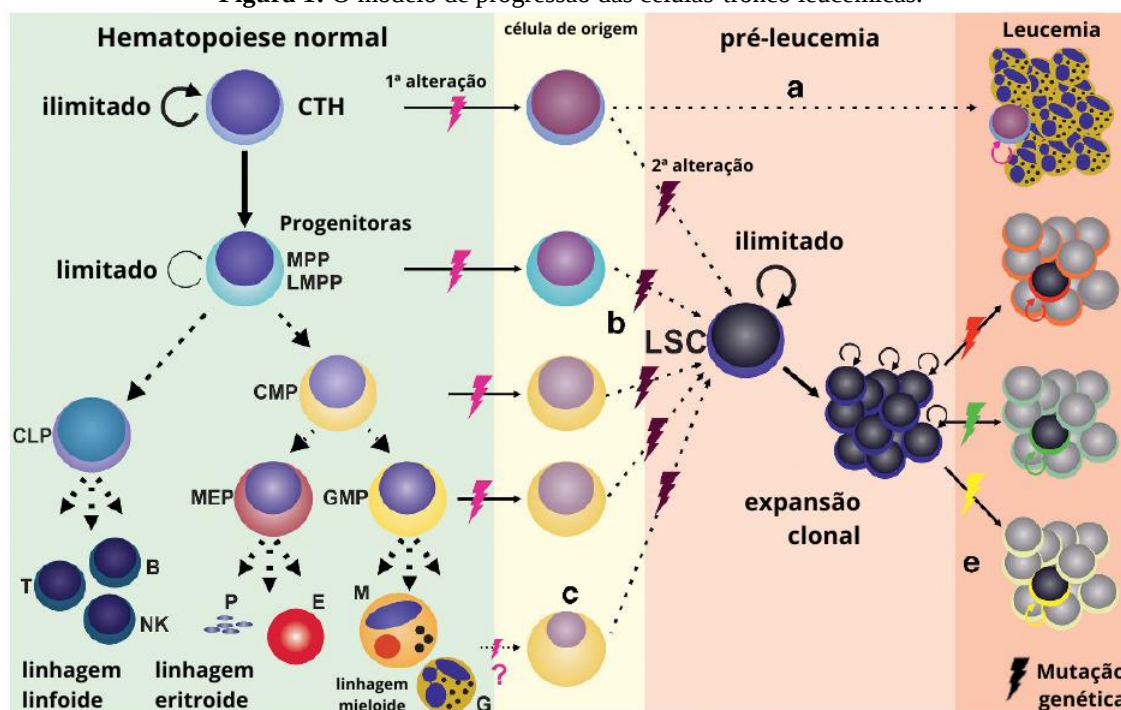
1. INTRODUÇÃO

1.1 LEUCEMIAS

1.1.1 Considerações gerais

As leucemias são um tipo de malignidade hematológica caracterizada pela desregulação da produção dos elementos sanguíneos, principalmente os leucócitos, mediada pelo acúmulo de alterações moleculares em vias de proliferação, diferenciação e renovação celular na medula óssea (Du *et al.*, 2022). O ciclo hematopoiético parte de células-tronco pluripotentes que sofrem diferenciações em cadeia com auxílio de proteínas específicas e modulação da expressão gênica, originando as células maduras sanguíneas e imunológicas funcionais (Rieger; Schroeder, 2012). Porém, o mau funcionamento desse microambiente, desencadeado por anormalidades genéticas, resulta em um grau de instabilidade capaz de provocar o acúmulo exagerado de células anormais das linhagens linfóide e/ou mieloide na medula óssea, culminando na liberação desses clones na corrente sanguínea ou em tecidos extramedulares (Figura 1) (Tebbi, 2021). Alguns autores acreditam que as leucemias são neoplasias essencialmente metastáticas, visto que o microambiente medular favorece a transmigração de clones leucêmicos, causando repercussões patológicas graves para o organismo (Riether; Schürch; Ochsenbein, 2015; Whiteley *et al.*, 2021).

Figura 1: O modelo de progressão das células-tronco leucêmicas.



O modelo demonstra que células tronco hematopoiéticas (CTHs) normalmente têm capacidade de autorrenovação ilimitada. Sendo assim, as CTH se diferenciam em progenitores multipotentes de amplificação transitória (MPPs) e progenitores linfoides multipotentes (LMPPs), os quais se autorrenovam de forma limitada. Dessa forma, MPPs e LMPPs se diferenciam em progenitores específicos: CLP: progenitor linfoide comum; CMP: progenitor mieloide comum; GMP: progenitor granulocítico e monocítico; MEP: progenitor megacariocítico e eritrocítico. Esses, continuam sua diferenciação e multiplicação de cada linhagem especificamente, sem deter a capacidade de autorrenovação. Na leucemia, existe um acúmulo de mutações em diferentes estágios da hierarquia hematopoiética que culminam na formação de células-tronco leucêmicas (LSCs). B: linfócitos B; T: linfócitos T; NK: células NK; P: plaquetas; E: eritrócitos; M: monócitos; G: granulócitos. **Fonte:** Adaptado de Riether; Schürch; Ochsenbein, 2015.

1.1.2 Epidemiologia

Quando tratamos da epidemiologia das leucemias, é importante levar em consideração os fatores de risco associados à doença e o perfil do paciente leucêmico. Dentre os fatores de risco, o tabagismo é o mais relatado, isso porque está associado à rápida progressão da doença e morte precoce, devido ao potencial leucemogênico dos compostos do cigarro (Du *et al.*, 2022; Martins *et al.*, 2023). Em segundo lugar estão comorbidades, como alto Índice de Massa corporal (IMC) associado à obesidade, que desencadeiam mudanças metabólicas, imunológicas e inflamatórias no organismo, favoráveis ao ambiente leucemogênico, promovendo um efeito protetor para células leucêmicas, as quais têm grande afinidade para altos níveis glicêmicos (Yi *et al.*, 2020; Du *et al.*, 2022). Além desses, a exposição a agentes tóxicos, tanto ambientais como ocupacionais, exposição à radiação ionizante, histórico familiar, exposição anterior à quimioterapia também são fatores de riscos (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020).

Sobre o perfil do paciente leucêmico, é constatado que casos de leucemia são mais frequentes em homens, com os subtipos dominantes variando entre as faixas etárias, com os picos principais abrangendo as faixas etárias menores de 15 anos e maiores de 70 anos (INCA, 2022). Globalmente, a leucemia é o 13º tipo de câncer mais frequente e 10ª causa de morte, sendo responsável por aproximadamente 500 mil casos novos e cerca de 300 mil mortes na estimativa de 2022 do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) (Ferlay *et al.*, 2024). No Brasil, é o 10º tipo de câncer mais frequente na estimativa do triênio 2023-2025, projetando-se a incidência de 11.540 casos, com 6.250 casos em indivíduos do sexo masculino (Santos *et al.*, 2023). Essa diferença entre os sexos se destaca ainda mais quando

analisamos a região Norte, onde a leucemia é o 6º tipo de câncer mais frequente entre homens e mulheres na estimativa de 2023 (Figura 2) (INCA, 2022).

Figura 2: Tipos de câncer mais frequentes na região norte do Brasil em 2023, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	2.760	26,5%			Mama feminina	2.410	22,4%
Estômago	1.200	11,5%			Colo do útero	1.980	18,4%
Traqueia, brônquio e pulmão	880	8,5%			Cólon e reto	740	6,9%
Cólon e reto	690	6,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	650	6,0%
Cavidade oral	440	4,2%			Estômago	630	5,9%
Leucemias	440	4,2%			Leucemias	350	3,3%
Fígado	430	4,1%			Ovário	340	3,2%
Sistema nervoso central	320	3,1%			Fígado	320	3,0%
Esôfago	270	2,6%			Glândula tireoide	320	3,0%
Laringe	260	2,5%			Sistema nervoso central	270	2,5%

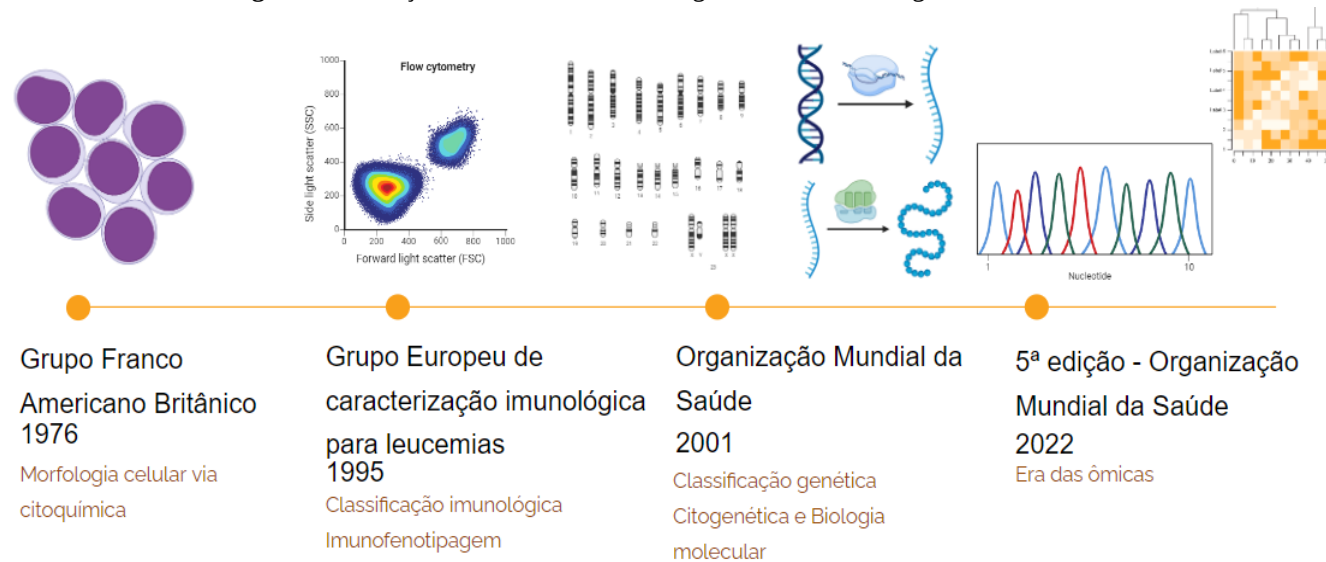
*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2022.

1.1.3 Classificação das leucemias

As leucemias são classificadas de acordo com dois critérios: quanto à evolução e quanto à linhagem afetada, apresentando quatro subtipos principais: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crônica (LMC), Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC). Ademais, sabe-se que existem também leucemias de fenótipo misto, envolvendo as duas linhagens. Dessas, as leucemias agudas caracterizam-se por ter evolução mais rápida e, conseqüentemente, pior prognóstico (Alexander *et al.*, 2018; INCA, 2022).

A evolução do conhecimento biológico das leucemias agudas trouxe consigo avanços concomitantes de suas classificações (Cabral, 2023). A primeira classificação internacional foi a do Grupo Franco Americano Britânico (FAB), que em 1970 levou em consideração a morfologia celular por análises citoquímicas (Bennett *et al.*, 1976). Já em 1995, o Grupo Europeu de Caracterização Imunológica classificou a leucemia por critérios imunológicos, através de análises imunofenotípicas (Bene *et al.*, 1995). Na virada do século XXI, em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elencou a análise genética como componente da investigação leucêmica, introduzindo a citogenética e a biologia molecular na composição da classificação das leucemias (WHO, 2001). Tal classificação teve sua última atualização em 2022, onde a OMS introduziu a era das “ômicas” na classificação, reforçando a necessidade da investigação molecular no diagnóstico e manejo da leucemia, levando em consideração a história clínica, morfologia celular, imunofenotipagem, citoquímica, citogenética e genética molecular (Figura 3) (Alaggio *et al.*, 2023).

Figura 3: Evolução do conhecimento biológico das leucemias agudas.

Fonte: Própria autora.

Dentre os quatro subtipos principais, a LLA é o tipo que afeta principalmente os linfoblastos, os precursores de linfócitos B ou T (Duffield; Mullighan; Borowitz, 2023). Sua classificação é primeiramente determinada pela morfologia das células afetadas, sendo a de células B (LLA-B) a mais frequente, representando de 80 a 85% dos casos (Lejman *et al.*, 2022); enquanto que a de células T (LLA-T) abrange apenas de 15 a 20% dos casos (Bardelli *et al.*, 2021). Além disso, segundo a OMS, a LLA é classificada em 15 subtipos diferentes do ponto de vista molecular, sendo 13 referentes à LLA-B e 2 à LLA-T, conforme mostra a Tabela 1 (Alaggio *et al.*, 2023).

Tabela 1: Classificação da OMS de 2022 para Leucemia Linfoblástica Aguda.

Neoplasias de células B precursoras

Leucemias/linfomas linfoblásticos de células B

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B, NOS

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com alta hiperplóidia

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com hipodiploidia

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com iAMP21

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com fusão *BCR::ABL1*

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com características semelhantes a *BCR::ABL1*

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com rearranjo *KMT2A*

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com fusão *ETV6::RUNX1*

Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com características semelhantes a <i>ETV6::RUNX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com fusão <i>TCF3::PBX1</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com fusão <i>IGH::IL3</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com fusão <i>TCF3::HLF</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) B com outras anormalidades genéticas definidas
Neoplasias de células T precursoras
<i>Leucemias/linfomas linfoblásticos de células T</i>
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) T, NOS
Leucemia/linfoma linfoblástico(a) precursor T precoce

Fonte: Adaptado de Alaggio *et al.*, 2022.

1.2 LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Existem dois picos de incidência na LLA, o primeiro acometendo principalmente crianças de 2 a 5 anos, podendo se estender até menores de 15 anos e geralmente associada a boas taxas de sobrevida (Moorman, 2012; Miranda-Filho *et al.*, 2018); enquanto que o outro pico ocorre na faixa etária acima dos 50 anos, correspondendo à 20% dos casos, com taxas de sobrevida que variam entre 30 a 40%, visto que há empecilhos para o manejo em pacientes idosos, como comorbidades, resistência ao tratamento e recidivas (Paul; Kantarjian; Jabbour, 2016). No mundo, a neoplasia corresponde a 30% dos cânceres pediátricos (Lejman *et al.*, 2022), enquanto que no Brasil, dados do último quinquênio revelam que a LLA é o tipo de câncer mais comum na faixa etária entre 0 a 19 anos, com 7.726 casos contabilizados, sendo 20% ocorridos na região Norte (DATASUS, 2023).

Alguns dos fatores de risco de LLA pediátrica são síndromes genéticas, ancestralidade hispânica, exposição à radiação ionizante, exposição pré-natal a teratogênicos e exposição tardia do sistema imune a agentes infecciosos (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020; Marcotte *et al.*, 2021; Schmidt *et al.*, 2021). Quando se trata de sintomas, por conta do comprometimento da capacidade de defesa imunológica e da funcionalidade dos tecidos hematopoiéticos, os principais achados são relatos de febre, sangramentos, palidez, infecções frequentes, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Clarke *et al.*, 2016).

Por ser uma leucemia aguda, a LLA necessita de um diagnóstico precoce para garantir boa sobrevida e prognóstico. A partir da suspeita clínica, a rotina de investigação diagnóstica consiste em primeiramente analisar alterações de hemograma, principalmente em casos de leucocitose, além da presença de um alto número de blastos em sangue periférico (Smith *et al.*, 1996). Em seguida, são conduzidos testes de imunofenotipagem, os quais identificam o tipo de célula atingida a partir de proteínas da superfície celular chamadas de CDs (*clusters of differentiation*) (Pacca *et al.*, 2023). Além disso, a cariotipagem e a biologia molecular são ferramentas essenciais para identificar as alterações genéticas das células leucêmicas (Harris *et al.*, 2019).

Após a conclusão do diagnóstico, o regime terapêutico aplicado à LLA é composto por quatro fases: indução, consolidação, reindução/intensificação e manutenção (Malard & Mohty, 2020). Tal esquema utiliza quimioterapia citotóxica com multiagentes, tais como glicocorticoides, vincristina, asparaginase, metotrexato e 6-mercaptopurina (Pieters; Mullighan; Hunger, 2023). Adicionalmente, o transplante alogênico é uma alternativa importante para pacientes de alto risco (Inaba; Mullighan, 2020), além de tratamentos emergentes com grande potencial de remissão, como a terapia com células T do receptor de antígeno quimérico (CAR-T cell) (Leahy *et al.*, 2022). Atualmente, a utilização de biomarcadores genéticos tem sido fundamental para o aprimoramento da conduta terapêutica, melhorando o prognóstico e contribuindo para o tratamento personalizado, hoje chamado de medicina de precisão.

1.3 BIOMARCADORES GENÉTICOS NA LLA

Os biomarcadores genéticos são um dos grandes avanços dos últimos anos na rotina do manejo terapêutico da LLA, visto seu impacto clínico, utilizando para este tipo de análise de alterações genéticas como cariótipos complexos, translocações, fusões gênicas e mutações pontuais/variantes de nucleotídeo único (Inaba; Mullighan, 2020; Duncavage *et al.*, 2022). Dentre essas alterações, as aneuploidias são características da LLA, configurando lesões oncogênicas iniciais da leucemogênese. Acredita-se que esses defeitos provenientes de falhas na segregação mitótica e nos pontos de verificação da divisão celular sejam a causa de mutações em supressores tumorais e proto-oncogenes (Molina *et al.*, 2021). A hiperploídia, por exemplo, é o tipo mais comum, geralmente conferindo bom prognóstico para o paciente, em especial a alta hiperploídia (51 a 57 cromossomos) (Panuciak *et al.*, 2023). Por outro lado, ainda dentro das aneuploidias, a amplificação intracromossômica do cromossomo 21

(iAMP21) confere um prognóstico intermediário/alto risco, necessitando de quimioterapia mais intensiva (Moorman, 2016), correspondendo a 2% dos casos de LLA-B (Rocha *et al.*, 2022).

Outro grupo de biomarcadores muito associados à LLA são as fusões gênicas, principalmente advindas de translocações cromossômicas ou deleções, as quais têm um grande espectro de valor prognóstico. Em relação à LLA-B, a fusão *ETV6::RUNX1* t(12;21)(p13;q22) é a mais frequente, mundialmente, em LLA-B pediátrico, com taxas de 20 a 25%, sendo associada a um bom prognóstico e com indício de ser uma alteração intrauterina (Inaba; Pui, 2021; Rodríguez-Hernández *et al.*, 2021). Essa translocação envolve dois genes que codificam fatores de transcrição importantes para o início da cascata hematopoiética: o *ETS variant transcription factor 6*, *ETV6*, que participa da regulação da diferenciação e proliferação celular através de complexos de repressão transcricional (Biwas *et al.*, 2020); e o *RUNX family transcription factor 1*, *RUNX1*, o qual se junta a uma ampla gama de parceiros para promover, geralmente, a ativação transcricional atuante na autorrenovação e diferenciação de precursores das células sanguíneas (Lie-a-ling *et al.*, 2020). Quando fusionados, os genes codificam uma proteína capaz de impulsionar a autorrenovação e sobrevivência em detrimento da perda de diferenciação de precursores B, os quais se tornam células pré-leucêmicas à espera de outras alterações secundárias aptas a converter tal quadro em leucemia (Sundaresh & Williams, 2017; Kimura & Mulligan, 2020).

Com um prognóstico intermediário, a fusão *TCF3::PBX1* t(1;19)(q23;p13.3) está relacionada com a infiltração de células leucêmicas no sistema nervoso central e necessita de protocolos terapêuticos intensos (Moorman, 2012). Fisiologicamente, o *Transcription factor 3*, *TCF3*, codifica uma proteína E, que atua como um fator de transcrição da família hélice-alça-hélice, ativando a transcrição a partir da ligação com sequências E-box nos genes alvos e apresentando um papel essencial na linfopoiese B e T (Miyazaki *et al.*, 2020). Com certa importância sistêmica, o *Pre-B-cell leukemia homeobox transcription factor 1*, *PBX1*, produz um fator de transcrição de homeodomínio que, quando dimerizado com os outros membros de sua família, conseguem atuar no desenvolvimento e diferenciação de diversos tecidos, desde os folhetos germinativos até tecidos completamente diferenciados (Zou *et al.*, 2023). A fusão entre os dois genes gera uma proteína com o domínio N-terminal de TCF3 e C-terminal de PBX1, a qual atua na transformação maligna de células pré-B a partir da ativação transcricional de alvos oncogênicos (Lee *et al.*, 2021; Kimura & Mulligan, 2020).

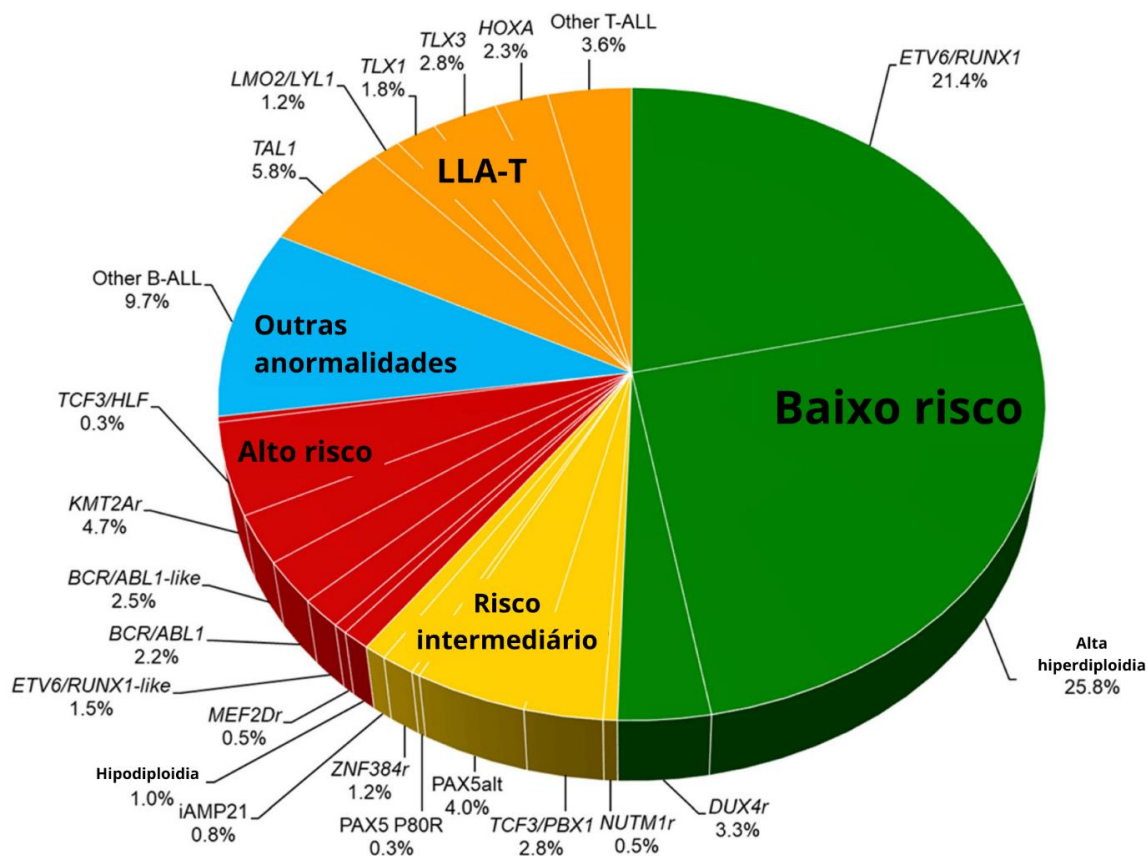
Os prognósticos adversos são associados à fusão *BCR::ABL1* t(9;22) (q34;q11) e aos rearranjos envolvendo *KMT2A*, os menos frequentes na LLA-B pediátrica, além de serem pacientes que geralmente apresentam resistência à terapia (Ivanov *et al.*, 2023; Meyer *et al.*, 2023). O gene *Breakpoint Cluster Region*, *BCR*, produz uma proteína com papel significativo na sinalização e divisão celular, e na LLA pode ser encontrado fusionado ao gene *ABL proto-oncogene 1*, *ABL1*, que detém propriedades de tirosina quinase atuante na divisão, adesão e diferenciação celular. Essa junção culmina em um cromossomo anormal, popularmente denominado de cromossomo Filadélfia (Ph), o qual forma uma oncoproteína *BCR::ABL1*, que na LLA, geralmente é codificada na isoforma p190. Essa proteína quimérica tem a atividade de tirosina quinase potencializada de tal forma que não necessita de ativação, promovendo um estado de proliferação descontrolada, imortalizada e indiferenciada das células B (Komorowski *et al.*, 2020; Leak; Horne; Copland, 2023). Já o gene *Lysine methyltransferase 2A*, *KMT2A*, pode ser encontrado em rearranjo com mais de 80 parceiros genéticos, geralmente no mesmo ponto de interrupção gênica, sugerindo padrões na dinâmica de fusão. Apesar da variedade de possibilidade de parceria, os rearranjos que envolvem o gene acabam formando complexos proteicos anormais que promovem uma grave desregulação epigenética, responsável pela transcrição aberrante de diversos genes, inclusive oncogenes que contribuem para a autorrenovação, crescimento e vantagens de sobrevivência das células leucêmicas (Winters & Bernt, 2017; Kimura & Mulligan, 2020).

Por fim, na LLA-T uma das fusões mais conhecidas é a *STIL::TAL1*, associada a mutações em genes importantes como *PTEN* (*Phosphatase and tensin homologue*) e *CDKN2A* (*Cyclin dependent kinase inhibitor 2A*) (Furness *et al.*, 2018). Diferente das fusões supracitadas, *STIL::TAL1* decorre de uma deleção intersticial submicroscópica (Kimura & Mulligan, 2020). O gene *STIL centriolar assembly protein*, *STIL*, normalmente codifica uma proteína citoplasmática responsável pela verificação do fuso mitótico, implicando em sua atuação na segregação cromossômica durante o ciclo celular (Jana, 2021). Já o *TAL bHLH transcription factor 1*, *TAL1*, é um fator de transcrição com domínio hélice-alça-hélice básico multifacetado que participa de processos como organização e diferenciação celular, em especial da linfopoiese T, que precisa ser estritamente regulado pois pode apresentar atividades oncogênicas (Yui & Rothenberg, 2014). Nesse contexto, a fusão *STIL::TAL1* promove uma ativação descontrolada do fator de transcrição *TAL1*, uma vez que ele já não conta com promotores essenciais para sua regulação, formando um circuito autorregulatório positivo que resulta em interrupção da diferenciação, ao passo que aumenta de forma anormal

a proliferação e sobrevivência, causando uma expansão clonal de células leucêmicas T (Sanda *et al.*, 2012; Hnisz *et al.*, 2016). Além dessas, existem várias outras alterações documentadas por diferentes grupos de pesquisa com valor prognóstico associado (Figura 4) (Inaba; Pui, 2021).

Em um estudo de análise de sequenciamento de RNA (RNAseq) realizado com 1.988 casos de LLA-B atendidos no *St. Jude Children's Research Hospital* foram identificados 23 subtipos de alterações genéticas, com frequências variantes entre as faixas etárias infantil, juvenil, jovens adultos e adultos (Gu *et al.*, 2019). Esse resultado evidencia a complexidade da doença e das variações moleculares que podem ser encontradas para além da classificação atual da OMS, a qual já assegura que a LLA terá mais estratificações moleculares com o passar dos anos, em vista das novas descobertas de biomarcadores (Alaggio *et al.*, 2023). Por isso, é válido notar que apesar de já existirem classificações moleculares bem estabelecidas, esse campo continua a ganhar novas categorias com impacto clínico e terapêutico, constantemente associadas a um processo intrínseco a toda célula humana: a regulação transcricional (Vijayakrishnan *et al.*, 2019).

Figura 4: Subtipos genéticos de LLA de acordo com o valor prognóstico.



Fonte: Adaptado de Inaba; Pui, 2021.

1.4 REGULAÇÃO TRANSCRICIONAL

A transcrição é um dos processos essenciais para as células eucariontes e procariontes, visto que determina a expressão gênica e, consequentemente, a síntese de proteínas, as quais são a principal ferramenta para a manutenção do funcionamento celular (Djebali *et al.*, 2012; Kopp; Mendell, 2018). Nesse sentido, a célula precisa ter um sistema de regulação eficaz para coordenar todas as etapas de replicação, transcrição e tradução. Esses mecanismos incluem a ação de fatores de transcrição, interação de proteínas reguladoras e modificações epigenéticas (Bylino; Ibragimov; Shidlovskii, 2020).

Na LLA, alterações nos mecanismos que regulam a atividade transcricional, tais como mutações nos fatores de transcrição, produção de proteínas reguladoras truncadas/anormais e modificações na disponibilidade do DNA por modificações de histonas, podem culminar na ativação ou inibição anormal de genes envolvidos com o crescimento e manutenção celular, quebrando a homeostase tecidual e engatilhando mudanças malignas (Inaba; Mullighan, 2020; Inaba; Pui, 2021).

Portanto, compreender como os mecanismos moleculares de regulação transcricional são afetados no processo cancerígeno é um ponto fundamental para o avanço no tratamento do câncer (Ivanov *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2023). Nesse contexto, dois grupos de proteínas estão sendo investigados no estudo da oncologia molecular, devido seus importantes papéis na regulação da transcrição: os fatores de transcrição dedo de zinco e histonas metiltransferases, que são moduladoras epigenéticas.

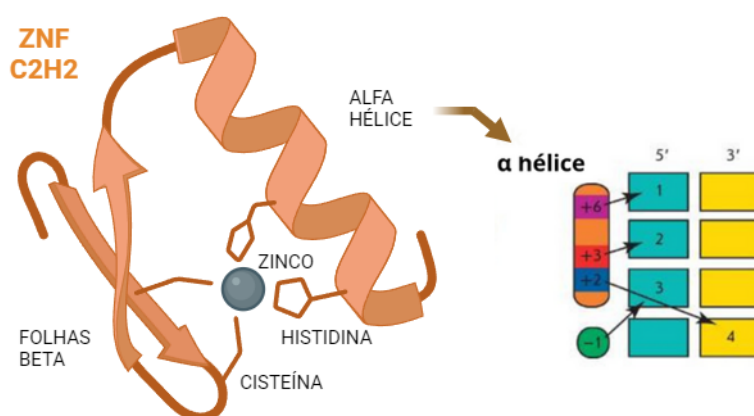
1.4.1 Proteínas dedo de zinco

Os dedos de zinco (*zinc finger*, ZNF) formam um amplo grupo de proteínas presentes em diversos processos celulares, por isso, podem ser encontradas em vários locais da célula, desde a membrana plasmática até o núcleo. Esse grupo recebe essa nomenclatura devido às ligações entre os aminoácidos cisteína (C) e histidina (H), as quais são mantidas por íons de zinco (Zn), em diversas conformações e são classificadas entre 30 categorias (Gray *et al.*, 2015; Singh; van Attikum, 2021), podendo uma proteína conter mais de um tipo de ZNF (Cassandri *et al.*, 2017). Sendo assim, por meio de diversas combinações de múltiplos domínios de dedo de zinco, as ZNFs têm a capacidade de ampliar significativamente sua função na regulação genética em diferentes contextos ou em resposta a estímulos celulares variados (Swamynathan, 2010; Bu *et al.*, 2021).

Fisiologicamente, as ZNFs atuam em processos atrelados à proliferação, diferenciação, autofagia e apoptose celular, através de interações com DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Essa ação contribui para a homeostase tecidual, uma vez que essas proteínas regulam os diferentes tipos de tecido, tais como pele, adipócitos, músculo, entre outros (Chen *et al.*, 2020; Daher *et al.*, 2020; Rakhra; Rakhra, 2021; Kim *et al.*, 2023). De forma tecido específica, as ZNFs podem atuar a nível nuclear, na regulação transcricional e no reparo do DNA, assim como a nível citoplasmático, com atividades relacionadas à migração, construção de citoesqueleto, degradação proteica e na transdução de sinal (Cassandri *et al.*, 2017; Moison *et al.*, 2021; Xiao; Li; Felsenfeld, 2021). Visando essas funções, as ZNFs já são mimetizadas na área de engenharia genética com o intuito de promover edições genéticas relacionadas à terapia alvo (Carroll, 2011).

O grande espectro funcional dessas proteínas se deve às diferentes conformações de ligação entre C-Zn-H. Dentre os tipos de ZNFs, o grupo clássico C2H2 abriga atualmente 720 genes codificantes, contendo especialmente fatores de transcrição com um padrão conformacional de duas folhas β e uma α hélice (Zhang *et al.*, 2011), que detêm sequências C-x-C-x-H-x-H em *tandem*, as quais interagem com o DNA de forma direta, reprimindo ou potencializando a expressão gênica a partir do reconhecimento de três pares de bases específica de uma sequência de DNA relativamente longa (Cassandri *et al.*, 2017). O modelo canônico de ligação expõe que os aminoácidos -1, 3 e 6 da ZNF C2H2 reconhecem os três primeiros nucleotídeos 5' na fita molde, enquanto que o aminoácido 2 reconhece o quarto nucleotídeo na fita complementar, em uma movimentação à jusante da sequência alvo (Figura 5) (Fedotova *et al.*, 2017).

Figura 5: Modelo de reconhecimento de DNA específico do local por domínios de dedo de zinco C2H2.

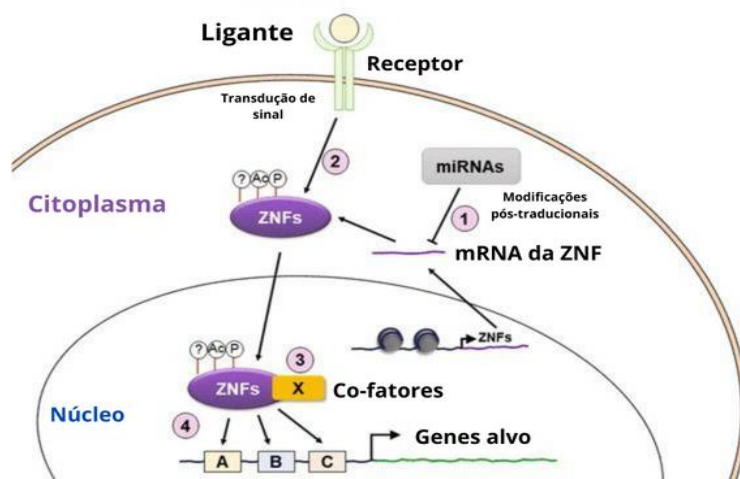


Fonte: Adaptado de Fedotova *et al.*, 2017.

Por outro lado, outras conformações de ZNF estão se destacando recentemente, como os domínios Novo Gene Realmente Interessante (RING) e seu papel na ubiquitinação (Han *et al.*, 2022; Middleton *et al.*, 2023); o Homeodomínio de Planta (PHD) e a remodelação da cromatina (Gaurav; Kutateladze, 2023; Ngwa; Farrukh; Pradel, 2021); e os domínios LIM (*Lin-11*, *Isl-1* e *Mec-3*) e as interações com o citoesqueleto (Wei; Zhang, 2020; Anderson *et al.*, 2021).

A família das ZNFs engloba genes importantes na cascata cancerígena, como supressores tumorais e oncogenes (Jen; Wang, 2016). Por conta disso, estudos apontam a desregulação da expressão de tais proteínas em todas as fases do processo carcinogênico, enfatizando sua contribuição nos processos de proliferação, inibição da apoptose, migração e invasão em cânceres sólidos (Brix *et al.*, 2020; Wu *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022b) e hematológicos (Liu *et al.*, 2020; Liu; Zhang, 2024). A desregulação das expressões gênicas e proteicas de ZNFs no câncer pode ser modulada por diversos mecanismos: estímulos ambientais, modificações pós-traducionais, ação de microRNAs e interação com diferentes proteínas (Figura 6). Estes fatores resultam em expressão de mRNAs alterada, ativação de cascatas de sinalização benéficas para o ambiente tumoral, recrutamento de co-ativadores ou co-repressores de transcrição ou modificadores de cromatina, além de promover ligações com o DNA de forma a estimular a transcrição de oncogenes/inibir a transcrição de supressores tumorais (Cassandri *et al.*, 2017; Jen; Wang, 2016). Isso expõe a versatilidade das proteínas ZNFs em atuar em diferentes contextos cancerígenos, reforçando a importância da apuração da sua contribuição na dinâmica celular e do entendimento dos mecanismos de ação dessas proteínas.

Figura 6: Várias regulamentações das funções das proteínas ZNF na progressão do câncer.



Fonte: Adaptado de Jen & Wang *et al.*, 2016.

1.4.2 Histonas metiltransferases

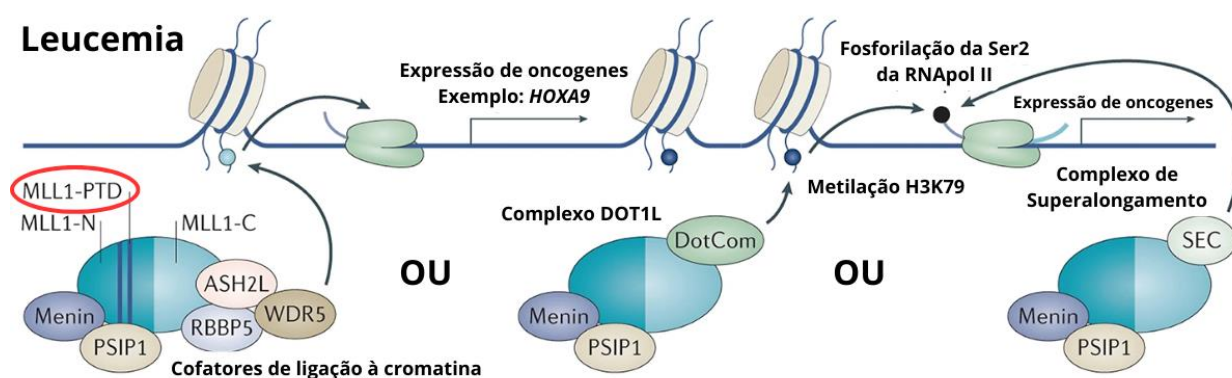
A epigenética abrange um conjunto de mecanismos que regulam a expressão gênica em nível transcricional por meio de modificações químicas na disponibilidade da cromatina e, conseqüentemente, dos processos de transcrição e tradução (Costa; Pacheco, 2013; Amin *et al.*, 2024). Nesse sentido, a metilação das histonas configura uma das modificações pós-traducionais mais caracterizadas dentre os modelos epigenéticos. As proteínas histonas são responsáveis por formar um complexo proteico chamado nucleossomo, o qual é responsável por envolver aproximadamente 150 pares de base do DNA em uma unidade de cromatina (Onufriev; Schiessel, 2019; Leite *et al.*, 2017). Logo, modificações em suas extremidades N ou C-terminais modulam a conformação estrutural do nucleossomo, podendo recrutar efetores de ativação ou inibição da expressão gênica (Li *et al.*, 2022c).

A metilação consiste na transferência de grupos metil para resíduos de arginina ou lisina de histonas. Esse processo é mediado pelas histonas metiltransferases (HMTs), um amplo grupo de enzimas dividido em duas categorias principais: as histonas lisina metiltransferases e as histonas arginina metiltransferases (Tan *et al.*, 2021). O mecanismo catalítico das HMTs acontece por três vias: mono, di ou trimetilação (Tammen; Friso; Choi, 2013). Nessa dinâmica, as HMTs utilizam um cofator chamado S-adenosil metionina (SAM ou AdoMet), que atua como doador de grupos metil (Schubert; Blumenthal; Cheng, 2003; Sun; Huang; Wei, 2021).

Dentre os dois tipos de HMTs, as histonas lisina metiltransferases (HKMTs) atuam principalmente nas histonas H3 e H4 (Zhao; Allis; Wang, 2021). A propriedade de ligação das HKMTs nos resíduos de lisina (K) envolve, na maioria, o domínio SET presente nessas enzimas, que é nomeado assim por ter sido descoberto em três HKMTs que deram nome ao domínio: *Su (var) 3-9*, *Enhancer of zeste* e *Trithorax* (Guo *et al.*, 2019). Com o auxílio dos doadores SAM e de seu domínio SET, as HKMTs adicionam grupos metil em uma molécula de ϵ -amina da cadeia lateral das lisinas K4, K9, K27, K36 e K79 em H3 e K20 em H4 (Janna *et al.*, 2020; Koryakov, 2024). Essas diferentes formas de interação resultam em variados estímulos de modificação das histonas, por vias *cis* ou *trans*, culminando em comportamentos como a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79, que está relacionada com ativação transcricional, em contraste com H3K9, H3K27 e H4K20, que são metiladas com o intuito de silenciar a transcrição (Li *et al.*, 2022c).

Com tais habilidades regulatórias, as HKMTs desempenham papéis essenciais no desenvolvimento, diferenciação celular, resposta a estímulos, organização nuclear e manutenção da homeostase de basicamente todos os tecidos do organismo humano (Shi *et al.*, 2022b; Zhao; Skovgaard; Wang, 2024). Por isso, no processo carcinogênico essas proteínas desempenham atividades interligadas à rede de alterações celulares e moleculares, ressaltando ainda mais a pluralidade da heterogeneidade tumoral (Watanabe *et al.*, 2008; Curry *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019). Nas leucemias agudas, por exemplo, um dos grandes biomarcadores genéticos é o gene *KMT2A* rearranjado com mais de 100 parceiros gênicos, sendo um exemplo clássico de como mutações em metiladores de histonas podem ser altamente oncogênicas. Geralmente, fusões gênicas relacionadas com a proteína de fusão de *KMT2A* rearranjado aumentam as taxas de trimetilação H3K4, promovendo a ativação auto-forçada de oncogenes, como os da família *HOX*, pelo recrutamento de coativadores transcripcionais em sua cauda C-terminal, como SEC, H3K79, DOT1L (Figura 7) (Albert; Helin, 2010; Zhao; Allis; Wang, 2021).

Figura 7: Mecanismos carcinogênicos de mutações envolvendo a proteína KMT2A na leucemia.



Fonte: Adaptado de Zhao, Allis, Wang, 2021.

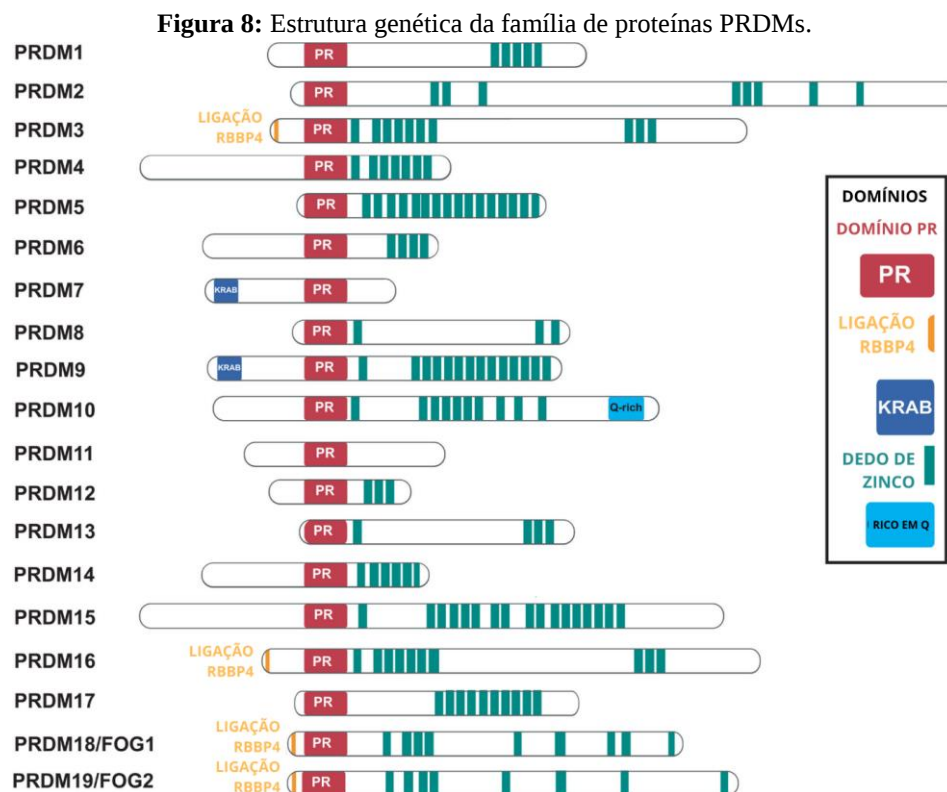
A magnitude da participação das HMTs no câncer fez com que os avanços nas tecnologias voltadas para saúde abordassem o desenvolvimento de moléculas para terapia alvo que modulem essas enzimas no ambiente tumoral (Hung *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2024), inclusive em casos de leucemia (Sawesi *et al.*, 2022). Considerando a grande relevância das vias supracitadas na regulação transcrricional, uma família de proteínas se destaca por associar propriedades de ZNFs e HKMTs: a família de proteínas com domínio PR (PRDM). Essa família é conhecida pela capacidade de participar da regulação da transcrição gênica, a partir da ligação direta com regiões promotoras, pelo recrutamento de co-fatores transcripcionais e pela modificação de histonas (Di Tullio *et al.*, 2022).

1.5 FAMÍLIA PRDM

1.5.1 Características estruturais

A família PRDM é composta por genes que codificam proteínas com uma combinação peculiar: um domínio PR na extremidade N-terminal e um ZNFs na direção C-terminal (Fog; Galli; Lund, 2012). Essa família possui grande importância para o desenvolvimento de muitos invertebrados e vertebrados, com o número de genes variando entre 2 a 19 membros entre as espécies (Vervoort *et al.*, 2016). Em humanos, 18 dos 19 membros apresentam combinações variáveis entre os dois elementos, com exceção de *PRDM11* que detém somente o domínio PR (Figura 8) (Clifton *et al.*, 2014; Sorrentino *et al.*, 2018).

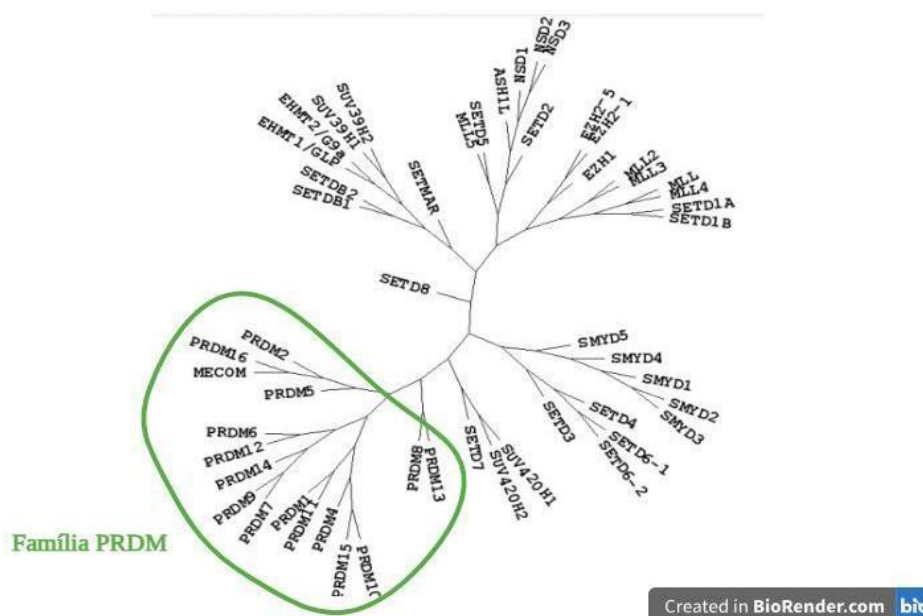
A sigla PR foi dada pelo fato desse domínio ter sido encontrado, pela primeira vez, compartilhado entre dois genes, que agora também são da família *PRDM*: *PRDF1* (domínio regulador positivo do fator de ligação I 1, agora *PRDM1*) e *RIZ1* (gene 1 do dedo de zinco que interage com a proteína do retinoblastoma 1, agora *PRDM2*) (Huang; Shao; Liu, 1998; Fog; Galli; Lund, 2012; Di Tullio *et al.*, 2022). Ademais, as ZNFs codificadas pela família *PRDM* são semelhantes a Krüppel, conferindo a capacidade de se ligar a sequências ricas em GC (Swamynathan, 2010).



Fonte: Adaptado de Di Tullio *et al.*, 2022.

O domínio PR detém uma estrutura altamente homóloga ao domínio SET. Acredita-se que exista uma justificativa evolutiva por trás dessa semelhança, ou seja, os genes *PRDM* podem ter evoluído da associação entre um gene com domínio SET ancestral e genes codificadores de ZNFs, fazendo com que o domínio PR seja considerado um subtipo de SET (Figura 9) (Vervoort *et al.*, 2016; Allali-Hassani *et al.*, 2019).

Figura 9: Árvore filogenética de metiltransferases.



Fonte: Adaptado de Allali-Hassani *et al.*, 2019.

1.5.2 Características funcionais

Por conta das suas peculiaridades estruturais, as proteínas PRDMs atuam como fatores transcrpcionais, seja pela atividade de metiltransferase HKMT conferida pelo domínio PR ou pela ligação direta com DNA por conta dos ZNFs (Mzoughi *et al.*, 2016). Dessa forma, as proteínas dessa família são ferramentas importantes de regulação da expressão gênica por diferentes vias, seja por ligação direta ao DNA ou epigenéticas. Outra maneira das PRDMs atuarem em vias epigenéticas, quando não possuem propriedades de HKMTs, é pela interação proteína-proteína e o recrutamento de outras enzimas modificadoras de histonas para os promotores específicos, a fim de modular a transcrição de genes alvo (Hohenauer; Moore, 2012).

Isso ocorre porque, apesar de todas as proteínas PRDMs apresentarem domínio PR, a atividade HKMT foi comprovada *in vitro* apenas para as PRDM2, PRDM7, PRDM9 e

PRDM16/PRDM3. Através de estudos cinéticos foi observado que essas PRDMs podem mono-, di- ou trimetilar diferentes lisinas da histona 3, onde a PRDM2 atinge a lisina 9 (Kim; Geng; Huang, 2003); a PRDM9 atinge as lisinas 4 e 36 (Eram *et al.*, 2014), assim como sua homóloga PRDM7 (Blazer *et al.*, 2016); e a PRDM16/PRDM3 atingem as lisinas 4 e 9 (Pinheiro *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2016).

Fisiologicamente, essas proteínas atuam em atividades de desenvolvimento, principalmente no desenvolvimento embrionário. No início da embriogênese, por meio de redefinições epigenéticas e repressão de genes somáticos, as PRDMs agem na manutenção da homeostase de células-tronco, formação de células germinativas primordiais, formação de tecidos e órgãos, maturação hematopoiética, desenvolvimento dos sistemas neuronais, entre outros (Han; Lin, 2016; Han *et al.*, 2020; Sybirna; Wong; Surani, 2019; Rienzo *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2011).

Conforme o organismo humano vai amadurecendo, os níveis fisiológicos de expressão das PRDMs vão sendo regulados negativamente, por isso, é normal que adultos apresentem uma baixa expressão das proteínas na maioria dos tecidos. Entretanto, situações patológicas podem mudar esse padrão, como o caso do câncer (Ou; Li; Tang, 2018; Rienzo *et al.*, 2021).

1.5.3 Família PRDM e câncer

Estudos apontam que os genes *PRDM* são alvos frequentes de *splicing* alternativo, fenômeno que gera isoformas sem ZNFs ou domínio PR (Di Zazzo *et al.*, 2013). Devido a isso, ocorrem falhas na regulação das vias em que as PRDMs atuam, o que pode ser uma das alterações que desempenham papéis nas doenças em que os membros da família se envolvem (Fumasoni *et al.*, 2007; Sorrentino *et al.*, 2018). Por conta do processo de *splicing* ou pelo uso de diferentes promotores, é comum observar no câncer um comportamento dicotômico na família PRDM, onde as duas isoformas principais da maioria das proteínas PRDMs se comportam de maneira oposta, uma contendo o domínio PR e outra sem essa estrutura. Os relatos apontam que a isoforma contendo PR geralmente atua como supressor tumoral, enquanto que a variante sem PR atua como um oncogene (Mzoughi *et al.*, 2016). Sendo assim, o silenciamento da isoforma completa (PR-*plus*) e/ou o aumento de expressão da isoforma sem PR (PR-*minus*) pode alavancar o processo carcinogênico, sobretudo de *PRDM1*, *PRDM2*, *PRDM5*, *PRDM8*, *PRDM9*, *PRDM13*, *PRDM14* e *PRDM16* (Di Zazzo *et al.*, 2013).

Além dos fenômenos fisiológicos que podem alterar a estrutura proteica das PRDMs, praticamente todos os membros da família já foram associados a deleções, silenciamento epigenético, superexpressão ou mutações em geral, em tumores sólidos e malignidades hematológicas (Casamassimi *et al.*, 2020). Ao analisar a literatura, é possível encontrar uma série de estudos que relatam o impacto de alterações de expressão dos genes e proteínas da família PRDM em vários tipos de câncer, além de elencar possíveis vias que são afetadas por essa desregulação.

No geral, as PRDMs são consideradas supressoras tumorais. Por isso, nos cânceres sólidos, os genes dessa família, geralmente, são regulados negativamente, a exemplo de *PRDM1* em cânceres de pulmão (Zhu *et al.*, 2017), glioma (Wang *et al.*, 2013), melanoma (Iwanaga *et al.*, 2020) e cólon (Liu *et al.*, 2018a; Kim; Moon, 2021); de *PRDM5* em cânceres colorretal, gástrico (Watanabe *et al.*, 2007), intestinal (Galli *et al.*, 2014), nasofaríngeo, esofágico, hepatocelular (Shu *et al.*, 2011) e cervical (Cheng *et al.*, 2010); de *PRDM8* em carcinoma hepatocelular (Chen *et al.*, 2018); de *PRDM13* em glioma (Zhang *et al.*, 2018); e a combinação de *PRDM2*, *PRDM5* e *PRDM16* em câncer de pulmão (Tan *et al.*, 2014).

Paralelamente, outros tipos de tumores apresentam superexpressão dos PRDM, como o *PRDM1* em câncer de estômago (Hung *et al.*, 2024), mama (Sciortino *et al.*, 2017) e pâncreas (Chiou *et al.*, 2017); a isoforma PR-minus de *PRDM2*, chamada de RIZ2, em colorretal (Di Donato *et al.*, 2023) e tumores testiculares (Di Zazzo *et al.*, 2016); o *PRDM14* em mama (Nishikawa *et al.*, 2007); e o *PRDM9*, superexpresso em 20% de 32 tipos de câncer em análises pan-câncer (Houle *et al.*, 2018).

De forma geral, as alterações nos PRDM são associadas a mau prognóstico, recidiva e baixa sobrevida, uma vez que se correlacionam com aumento de proliferação, invasão, migração e metástase em cânceres sólidos (Tan *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Di Donato *et al.*, 2023; Hung *et al.*, 2024).

Quando se trata de malignidades hematológicas, estudos relativos a linfomas relatam a superexpressão de *PRDM15* (Mzoughi *et al.*, 2020), enquanto que *PRDM1* (Liu *et al.*, 2019) e *PRDM11* (Fog *et al.*, 2015) são hipoexpressos. Na LMA foram encontrados níveis elevados de *PRDM5*, associado a baixa sobrevida (Zhou *et al.*, 2019). Enquanto que na LLA infantil, alterações alélicas já foram relatadas para *PRDM9* (Hussin *et al.*, 2013). Adicionalmente, em uma análise de 1006 casos de LLA de células precursoras B (LLA-CPB), foi observado que

os genes *PRDM9* e *PRDM15* encontravam-se hipermetilados em casos de *KMT2A* rearranjado, e hipometilados em casos hiperdiploides, sendo associados com idade inferior a 1 ano e CD10-, o qual é um marcador importante de blastos leucêmicos em estágio maturativo precoce. O *PRDM15* hipermetilado também foi correlacionado com casos de *TCF3::PBX1* e com o grupo de prognóstico de alto risco. Em contrapartida, casos positivos para *ETV6::RUNX1* apresentaram hipometilação de *PRDM15* e hipermetilação de *PRDM9* (Vieira, 2017). Essas variações da modulação da viabilidade de expressão sugerem que os genes *PRDM* provavelmente são parte do grupo de alterações secundárias que auxiliam as alterações primárias do processo carcinogênico.

1.6 *PRDM16*

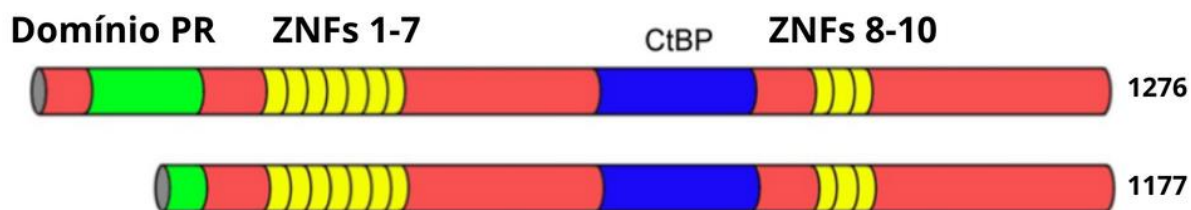
Um dos membros da família *PRDM* conhecido por suas atividades de histona lisina metiltransferase e dedo de zinco, é o gene da proteína 16 com domínio PR, *PRDM16*, também amplamente conhecido como *MEL1*. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 1 (1q36.32), contando com 17 éxons e codificando a proteína PRDM16F/MEL1F (Figura 10), que contém uma combinação de um domínio PR e 10 ZNFs, em um total de 1276 aminoácidos e 170 kDa (NCBI, 2024; UNIPROT, 2024). Sendo alvo de *splicing* alternativo, a segunda isoforma mais conhecida, e oncogênica, de *PRDM16* é a forma PR-minus, chamada de PRDM16S/MEL1S, resultado da iniciação da transcrição no éxon 4, uma vez que o domínio PR é transcrito entre os éxons 2 e 5. Além disso, o gene codifica uma região de ligação proteica C-terminal (CtBP), responsável por intermediar as interações de ambas isoformas com outras moléculas (Figura 11) (Pisano *et al.*, 2014).

Figura 10: Isoforma PRDM16F.



Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

Figura 11: Sequência dos domínios das isoformas PRDM16F e PRDM16S.



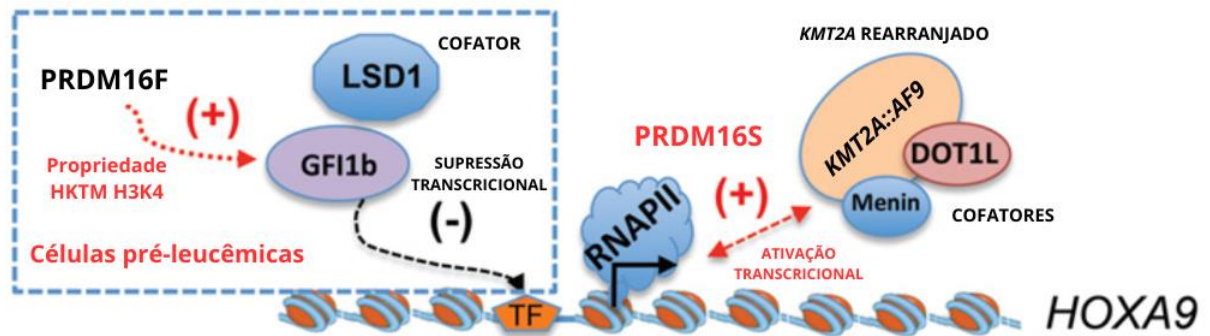
Fonte: Adaptado de Pisano *et al.*, 2014.

Assim como todos da família *PRDM*, o gene *PRDM16* codifica uma proteína multifuncional, conferindo propriedades singulares para cada domínio expresso (Di Zazzo *et al.*, 2013). Sua atividade de ZNF C2H2 faz com que a proteína PRDM16 atue como um fator de transcrição, principalmente na supressão transcricional. O melhor exemplo desse fenômeno é encontrado na sinalização TGF- β (*Transforming growth factor beta*), a qual ativa uma vasta lista de genes e, portanto, necessita de mecanismos reguladores rigorosos de acordo com a necessidade e contexto celular. Isso acontece pela ligação da proteína ao fator de transcrição SMAD (*Mothers against dpp*), diminuindo a afinidade desse complexo à sequência de DNA (Hohenauer; Moore, 2012). Resumidamente, TGF- β estimula o complexo de quinases transmembranas T β Rs que, quando ativado, fosforila as SMADs 2 e 3, as quais se juntam a SMAD 4 no núcleo e modulam os genes alvo, a partir da interação com cofatores, tal qual o complexo de repressores PRDM16/SKI (Takahata *et al.*, 2009; Hurwitz *et al.*, 2023).

Sua atividade de HKTM atua sobre as lisinas das histonas 3, especificamente as lisinas 4 e 9, ativando ou reprimindo, respectivamente, a expressão dos genes alvo (Shull *et al.*, 2020). Nas análises *in vitro* e *in vivo* de Zhou *et al.* (2016), foi demonstrado que PRDM16 atua como HKMT na H3K4 de células hematopoiéticas com *KMT2A* rearranjado, por processos de mono e dimetilação, convertendo a histona em H3K4me1 ou H3K4me2, respectivamente. A metilação foi capaz de aumentar as marcas de heterocromatina e dificultar o acesso à cromatina, o que dificultou a ativação do cluster oncogênico *HOXA* pelas proteínas quiméricas de *KMT2A* rearranjada. Além disso, essa reação enzimática foi capaz de reprimir especificamente a transformação leucêmica induzida por *KMT2A* mutada, a partir da ativação de regiões promotoras de genes como o fator de transcrição hematopoiético GFI1b, esse que por sua vez também inibiu a transcrição de *HOXA* (*Homeobox A cluster*). Em contrapartida, notou-se que a perda do domínio PR e, conseqüentemente, de sua atividade metiltransferase desencadeou um rápido processo leucemogênico, enfatizando que a isoforma PRDM16F atua como supressora tumoral para leucemia, enquanto que PRDM16S funciona como um

oncogene ligado à agressividade tumoral e transformação leucêmica quando associado com mutações em *KMT2A*, que conferem mau prognóstico na leucemia (Figura 12).

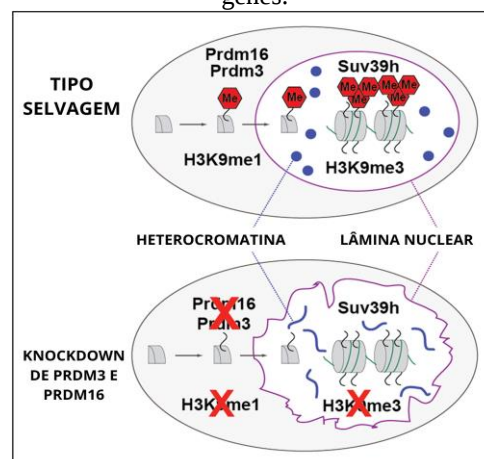
Figura 12: Interação de PRDM16 como metiltransferase H3K4 em células pré-leucêmicas.



Fonte: Adaptado de Zhou *et al.*, 2016.

Segundo Pinheiro *et al.* (2012), a atividade de lisina metiltransferase de PRDM16 combina-se com a de PRDM3, um parceiro altamente homólogo de PRDM16, em uma dinâmica onde a propriedade enzimática das duas proteínas catalisa a monometilação da lisina 9 de histonas 3 livres no citoplasma, acionando o gatilho de transporte dessas histonas H3K9me1 para o ambiente nuclear. No núcleo, as H3K9me1 passam por outro processo de metilação, mediado por enzimas associadas à cromatina Suv39h, que se incorporam à heterocromatina pericêntrica, convertendo H3K9me1 em uma histona trimetilada: H3K9me3. Tal dinâmica parece ser tão essencial para a célula, que o *knockdown* dessas PRDMs bloqueia essa organização da heterocromatina, afetando, inclusive, a estrutura da membrana nuclear (Figura 13).

Figura 13: Dinâmica da atividade de metiltransferase de PRDM3 e PRDM16 e os efeitos do silenciamento dos genes.



Fonte: Adaptado de Pinheiro *et al.*, 2012.

1.6.1 Propriedades funcionais de PRDM16

Com base em suas funcionalidades, PRDM16 atua em contextos relacionados à atividade dos adipócitos, desenvolvimento de sistemas neurais com funções dependentes de aspectos espaço temporais, diferenciação e maturação da cartilagem craniofacial, diferenciação na formação vascular arterial e venosa e da estrutura miocárdica (Leszczyński *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021; Shull *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2023; Thompson *et al.*, 2023; Kühnisch *et al.*, 2023).

Nos tecidos hematopoiéticos, sabe-se que *PRDM3* e *PRDM16* exercem papéis semelhantes, mas não redundantes, visto que a perda de um deles leva a falhas na diferenciação e na atividade das células-tronco hematopoiéticas (CTHs) (Matsuo *et al.*, 2015). O gene *PRDM16* é expresso de forma seletiva por células troncos e progenitoras, sendo um regulador crítico da renovação, quiescência, apoptose e diferenciação de CTHs. Dentre os genes regulados pela PRDM, podem ser citados *RUNX1*, *PBX1*, *GATA2* (*GATA binding protein 2*) e *TP53* (*Tumor protein p53*) (Aguilo *et al.*, 2011; Corrigan *et al.*, 2018; Gudmundsson *et al.*, 2020). Ademais, o gene está incluso dentro da “assinatura de repovoamento” de linhagens de CTHs, principalmente em alças de autorrenovação (Che *et al.*, 2022).

1.6.2 Apresentação de PRDM16 no câncer

Vários estudos já observaram efeitos paradoxais de PRDM16 em diferentes tipos de câncer e ainda existem diversas lacunas no entendimento da dinâmica biológica envolvendo o gene e suas isoformas. Segundo análises pan-câncer de Sorrentino *et al.* (2018), *PRDM16* foi um dos genes mais mutados dentro da família, contando com 514 mutações totais, sendo 257 com efeito deletério, sugerindo-se ser este o motivo do gene ter sido encontrado regulado negativamente na maioria dos 21 tipos tumorais estudados.

No câncer de próstata, *PRDM16* foi encontrado hipoexpresso por regulação de miR-372-3p, aumentando a proliferação, migração e invasão (Yin *et al.*, 2022). O mesmo padrão de expressão foi visto em câncer de mama, onde foi feita associação com modulações de expressão de *IGSF9* (*Immunoglobulin superfamily member 9*) e *ALDH2* (*Aldehyde dehydrogenase 2 family member*), que estão ligadas à baixa sobrevida e com metástases linfonodais (Shi *et al.*, 2022a); e em câncer de pulmão, que se associou com recrutamento de células imunes, metástase nodal e mutação de *TP53* (Li *et al.*, 2022a). Nos tumores de tireoide

(Liu *et al.*, 2021), rins (Kundu *et al.*, 2020) e pâncreas (Hurwitz *et al.*, 2023), foi observado que o restabelecimento de expressão do gene inibiu o fenótipo proliferativo das células cancerígenas, reforçando a importância de *PRDM16* como supressor tumoral.

1.6.3 Papel de *PRDM16* nas malignidades hematológicas

Por conta de seu papel na modulação dos estágios iniciais de diferenciação hematopoética, o comportamento de *PRDM16* é uma questão investigada no estudo de malignidades hematológicas. Nesse sentido, sua expressão alterada é relatada principalmente em neoplasias como LMA, Síndrome Mielodisplásica (SMD) e LLA-T de adultos.

O primeiro relato do gene *PRDM16* descreveu a descoberta de sua participação na translocação (1;3)(p36;q21) em LMA/SMD (Mochizuki *et al.*, 2000). Alguns anos depois, descobriu-se que a isoforma *PRDM16S* era a responsável dessa alteração, a qual foi relatada como supressora da diferenciação granulocítica induzida pelo fator estimulador de colônia G-CSF (Nishikata *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2006). Um estudo posterior conduzido por Nishikata *et al.* (2011) demonstrou que além da isoforma *PRDM16S*, mutações na sequência CtBP também têm a capacidade de bloquear o processo de diferenciação mediado por G-CSF.

Apesar de estar presente em leucemias de cariótipo normal, estudos apontam a correlação de alterações em *PRDM16* com outras anormalidades genéticas e citogenéticas características da leucemogênese. Na LMA de adultos, o aumento de expressão de *PRDM16* já foi relacionado com a ocorrência de mutações em *DNMT3A* (*DNA methyltransferase 3 alpha*), *NPM1* (*Nucleophosmin 1*), *KMT2A*, *FLT3* (*Fms related receptor tyrosine kinase 3*), *CEBPA* (*CCAAT enhancer binding protein alpha*), *HOXB4* (*Homeobox B4*) e à hiperexpressão concomitante de *PRDM3* (Yamato *et al.*, 2017; Dao *et al.*, 2021; El-Meligui *et al.*, 2022; Xiang *et al.*, 2022). A superexpressão de *PRDM16*, em conjunto com a perda de *TP53*, induziu o crescimento anormal e imortalização de CTHs em modelo de LMA em camundongos, bloqueando a diferenciação mieloide (Shing *et al.*, 2007). Ademais, casos de *PRDM16* translocado levam à superexpressão do gene, independentemente da proteína quimérica resultante, além de ter sido encontrado translocado com genes como *ETV6* e *IKZF1* (*IKAROS family zinc finger 1*) em LMA, SMD e em raros casos linfoides (Duhoux *et al.*, 2012). Tais pesquisas reforçam que todas essas cooperações fazem com que anormalidades relacionadas a *PRDM16* tenham predição de mau prognóstico, conferindo baixa sobrevida e altas taxas de remissão incompleta em LMA de adultos.

Na LMA pediátrica, a superexpressão de *PRDM16* se correlacionou com a falha de indução primária (Miyamura *et al.*, 2019) e com mutações em *UBTF* (*Upstream binding transcription factor*), também conferindo mau prognóstico por eventos precoces, como recidiva ou remissão incompleta (Kaburagi *et al.*, 2023). Além disso, já foi observada superexpressão de *PRDM16S* por hipometilação de promotor em LLA-T de adultos, influenciando a sinalização TGF- β (Yoshida *et al.*, 2004), e na LMA secundária (Matsuo *et al.*, 2015). Para mais, um estudo pioneiro identificou importantes alterações no número de cópias (CNAs) do gene *PRDM16* de pacientes pediátricos com LLA, sugerindo sua propriedade oncogênica na leucemogênese linfóide, entretanto, ainda existem lacunas no entendimento do papel de *PRDM16* nas leucemias linfóides (Batista-Gomes *et al.*, 2020).

Considerando todos os fatos até então relatados e dada a importância da avaliação de biomarcadores do processo carcinogênico, o presente estudo teve como proposta avaliar o perfil de expressão gênica de *PRDM16* em amostras de pacientes pediátricos recém diagnosticados com LLA atendidos em um hospital de referência da cidade de Belém-PA, através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcriptase Reversa (RT-qPCR), correlacionando tal expressão com dados clínico, laboratoriais e moleculares, a fim de avaliar sua participação no processo leucemogênico e sua viabilidade como possível biomarcador de LLA.

2. JUSTIFICATIVA

As leucemias, em especial as infantis, apresentam a característica inicial do rápido acúmulo de alterações genéticas nas células-tronco hematopoiéticas, que dão origem ao processo de leucemogênese, por meio do desencadeamento da desregulação das diversas vias moleculares (Juliussen; Hough, 2016; Liu *et al.*, 2018b).

Nesse sentido, anormalidades citogenéticas e moleculares foram identificadas desempenhando um papel chave na patogênese da LLA, visando componentes moleculares vitais do processo de hematopoese, do ciclo celular, da supressão tumoral e da autorrenovação das células-tronco. Os recentes avanços tecnológicos permitiram a caracterização do cenário genômico da LLA infantil, incluindo anormalidades na sequência de DNA, como variações de nucleotídeo único, pequenas inserções ou deleções e CNAs (Liu *et al.*, 2016). A partir disso, as entidades internacionais atualmente estimulam a avaliação de painéis de biomarcadores genéticos que possam prever o prognóstico e auxiliar o manejo do paciente com LLA, influenciando, inclusive, no tempo e qualidade do tratamento oncológico (Duffield; Mullighan; Borowitz, 2023).

Alguns dos candidatos a biomarcadores de diversos tipos de câncer são os genes da família *PRDM*, incluindo o *PRDM16*, que estão envolvidos na regulação da expressão gênica com suas atividades intrínsecas de metiltransferases de histonas, por conta de seu domínio PR, ou por meio de interações com outras enzimas que modificam a cromatina, além de terem a capacidade de interação direta com o DNA por conta de seus ZNFs (Casamassimi *et al.*, 2020). Sendo assim, esses genes impactam uma ampla gama de processos biológicos, incluindo o controle da proliferação e diferenciação celular, progressão do ciclo celular e manutenção da homeostase das células imunológicas (Mcglynn *et al.*, 2020).

No câncer, os genes e proteínas PRDMs são relatados como alterados, por diferentes formas e mecanismos (Cassandri *et al.*, 2017). Sabe-se que a isoforma PR-minus do gene *PRDM16*, *PRDM16S/MEL1S*, associa-se com assinaturas inflamatórias de mau prognóstico, relacionadas com o desencadeamento de malignidades hematológicas, como LMA e SMD, visto que a proteína *PRDM16* fisiologicamente está envolvida com a manutenção das células-tronco hematopoiéticas (Corrigan *et al.*, 2018).

Um estudo pioneiro conduzido com pacientes pediátricos com LLA em uma coorte da Amazônia Brasileira, utilizando principalmente a técnica de Matriz de Hibridização Genômica Comparativa (aCGH) validada via Reação Em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) para CNA, demonstrou que a deleção de cópias do gene *PRDM16* foi associada à ausência de translocações cromossômicas, alto risco segundo o *National Institute of Cancer* (NCI), além da tendência à significância com alterações no leucograma. Enquanto isso, a amplificação de *PRDM16* foi relacionada à presença de translocações, sugerindo que o gene possa atuar como um oncogene na LLA (Batista-Gomes *et al.*, 2020).

Com base nos fatos supracitados, a continuação desta investigação é de suma importância para contribuir com a caracterização molecular da LLA pediátrica e fomentar as pesquisas envolvendo a família *PRDM*, especialmente nas malignidades hematológicas. Portanto, a pesquisa do perfil de expressão gênica de *PRDM16* por meio da técnica de RT-qPCR em pacientes pediátricos com LLA pode auxiliar na compreensão do envolvimento do gene com a biologia desse tipo de câncer e seu valor prognóstico, analisando se a expressão desse gene pode prever a progressão tumoral.

Desse modo, conhecer os padrões de alteração do *PRDM16* pode ser uma boa alternativa para a terapêutica da LLA, fazendo com que esse alvo possa ser uma ferramenta diagnóstica ou prognóstica para o manejo da doença no futuro, além de chamar a atenção para o desenvolvimento de esquemas terapêuticos que possam modular tais alterações no gene, de forma a complementar os protocolos bem estabelecidos para LLA.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o perfil de expressão do gene *PRDM16* em amostras de pacientes pediátricos com LLA, a fim de caracterizar o seu impacto no processo leucemogênico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar molecularmente o nível de expressão do gene *PRDM16* em pacientes pediátricos com LLA;
- b) Investigar se a modulação da expressão do gene *PRDM16* na LLA está associada a dados clínicos e laboratoriais;
- c) Analisar se a modulação da expressão do gene *PRDM16* na LLA está associada a subtipos moleculares específicos dos pacientes;
- d) Admitir ou refutar *PRDM16* como potencial biomarcador diagnóstico, prognóstico e/ou terapêutico na LLA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

O projeto consistiu em uma pesquisa experimental retrospectiva e prospectiva, descritiva e transversal, que avaliou a expressão do gene que codifica o fator de transcrição PRDM16 em amostras de sangue periférico e/ou medula óssea de 80 pacientes oncológicos pediátricos diagnosticados com LLA, atendidos no Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo (HOIOL) em Belém do Pará, entre os anos de 2019 e 2024. Optou-se por um estudo transversal por ser uma pesquisa exploratória, com tempo limitado para seu término e a boa relação custo-benefício deste tipo de estudo. Ainda, o controle negativo foi composto por 8 amostras de 1 mL de sangue total de pessoas saudáveis entre 10 a 16 anos, isto é, sem doenças agudas ou crônicas identificadas até o momento da coleta, e que aceitaram participar da pesquisa através da assinatura dos termos.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

Todos os dados que estão sendo apresentados neste estudo são respaldados pelas Resoluções nº 466/2012 (BRASIL, 2012) e nº 510/16 (BRASIL, 2016) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), a primeira que discursa, em seu artigo terceiro, acerca dos aspectos éticos da pesquisa com seres humanos. Para tal fim, o estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Pesquisa em Oncologia (CEP/NPO) da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob o Certificado de Apresentação de Apreciação Ética (CAAE) nº 30307820.7.0000.5634 (Anexo I), indicando que respeitou todas as diretrizes para pesquisa envolvendo seres humanos e seus materiais biológicos.

4.3 LOCAL DE ESTUDO

O presente estudo envolveu pacientes pediátricos atendidos no Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo, localizado no bairro de São Brás na cidade de Belém. HOIOL é uma Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON), o qual presta serviços relacionados à oncologia pediátrica. Contando, atualmente, com 89 leitos, sendo 79 leitos de enfermaria e 10 leitos de UTI pediátrica, o objetivo do hospital é atender a demanda de 144 municípios paraenses no que diz respeito ao manejo dos principais tipos de câncer que acometem a faixa etária de 0 a 19 anos. Portanto, configura um dos maiores serviços de oncologia pediátrica da região norte e nordeste do País a qual assiste por ano

aproximadamente 805 crianças e adolescentes portadores de câncer infantil (SESPA, 2021; SECOM, 2022).

Já as análises moleculares foram conduzidas no Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO), uma unidade acadêmica instalada nas dependências do Hospital Universitário João de Barros Barreto, localizado no bairro do Guamá, na cidade de Belém. Esse centro de pesquisa científica e extensão da UFPA investe na pesquisa oncológica, abrangendo um grande espectro de linhas de pesquisa, tais como biologia molecular, imunologia, biologia celular, bioinformática, dentre outras (UFPA, 2024; NPO, 2024).

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram adotados como critérios de inclusão os dados e amostras de pacientes na faixa etária de 0 a 17 anos, atendidos nos serviços de oncologia do HOIOL, de ambos os sexos, os quais tenham sido recém diagnosticados com LLA no período de janeiro de 2019 a agosto de 2024 e que tenham concedido permissão para a participação do estudo e para coleta da amostra de sangue periférico e/ou medula óssea, através da assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE), termo assinado pelos responsáveis (Anexo II).

Dentro desse seletor grupo, foram excluídos aqueles que já tenham feito uso de fármacos quimioterápicos; estejam acometidos por outras neoplasias concomitantemente à LLA; abandonaram o tratamento ou foram transferidos para outra unidade oncológica; paciente cujo prontuário não foi encontrado ou cuja amostra seja inviável para as análises, e aqueles os quais os responsáveis não aceitaram, por qualquer motivação, preencher e assinar o TALE, em concordância com a Resolução 466/12.

4.5 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

4.5.1 Coleta de dados

Para investigar os parâmetros clínico-laboratoriais e suas possíveis relações com a expressão do gene *PRDM16*, foi feita a coleta dos seguintes dados, a partir da revisão dos prontuários médicos dos pacientes, armazenados no setor de faturamento do HOIOL:

- Idade ao diagnóstico;
- Sexo;

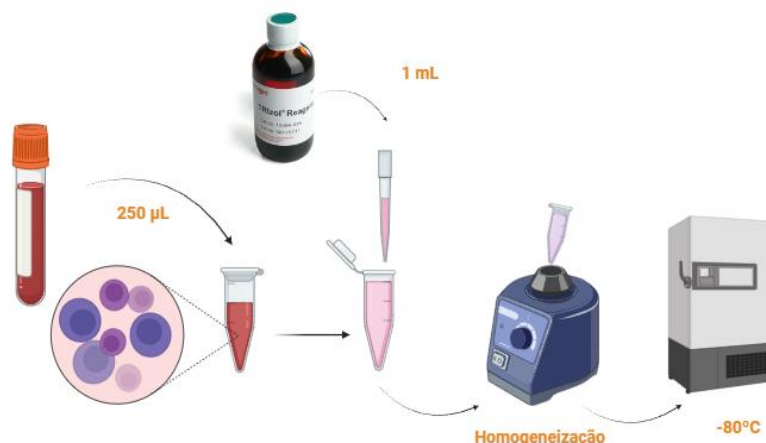
- Avaliação do primeiro hemograma ao diagnóstico realizado, com contagem inicial de leucócitos, hemoglobina e plaquetas, com valores de referência adaptados de Mallick *et al.*, (2015), Jaime-Pérez *et al.* (2019), Khalid *et al.*, (2023);
- Diagnóstico imunofenotípico da LLA;
- Grupo de risco segundo o NCI (Smith *et al.*, 1996), considerando: a) alto risco: contagem de leucócitos maior que 50×10^9 células / μL , idade de 1 ano ou menos, ou idade igual ou superior a 10 anos; e b) risco padrão: contagem de leucócitos de 50×10^9 células/ μL ou menos, ou entre 1 e 10 anos de idade. Os pacientes com *BCR::ABL1* ou *KMT2A::AFF1* também foram atribuídos ao grupo de alto risco.

Todas as informações foram compiladas em um banco de dados, o qual foi um dos objetos deste estudo.

4.5.2 Coleta de amostras biológicas

Para avaliar a presença de fusões gênicas e proceder com a análise da expressão gênica de *PRDM16*, o sangue periférico e/ou medula óssea dos pacientes foi coletado através de punção venosa e/ou aspirado medular, no HOIOL. Imediatamente após a chegada do material biológico no NPO, foi feito o processamento inicial das amostras, o qual consiste na homogeneização de 250 μL de sangue total e/ou medula óssea para 1 mL de *TRIzol Reagent*®, alocados em microtubo estéril de 1,5 mL e armazenados à temperatura de -80°C (Figura 14), para posterior processamento.

Figura 14: Esquema do processamento inicial da amostra.

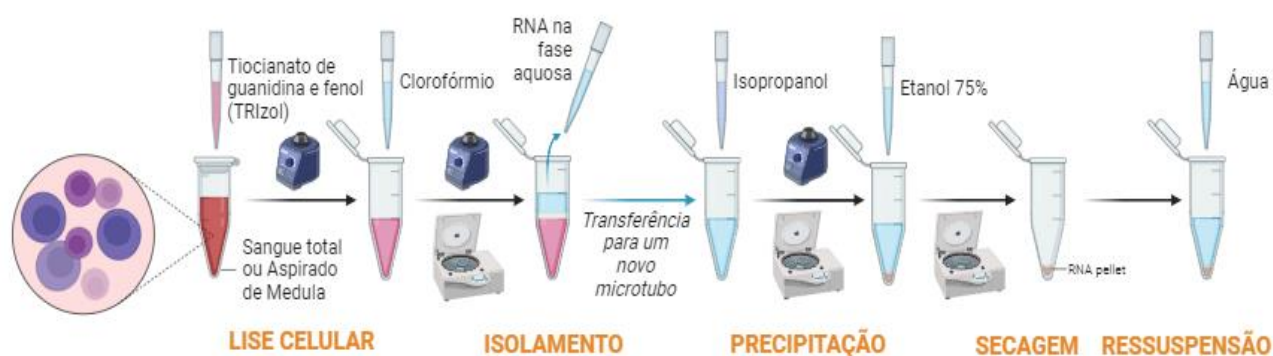


Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

4.6 EXTRAÇÃO DE RNA

O primeiro procedimento empregado nas amostras foi a extração de RNA pelo *TRIzol Reagent® Solution* da marca *Applied Biosystems™* – reagente usualmente empregado para o isolamento de RNA, DNA e proteínas de amostras biológicas –, aplicando um protocolo *in house* (Figura 15) estabelecido pelo laboratório de biologia molecular do Hospital Ophir Loyola, composto por 5 fases: lise celular, isolamento, precipitação, secagem e ressuspensão. Após a finalização da extração, as amostras foram armazenadas à temperatura de -80°C.

Figura 15: Esquema da extração de RNA.



Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

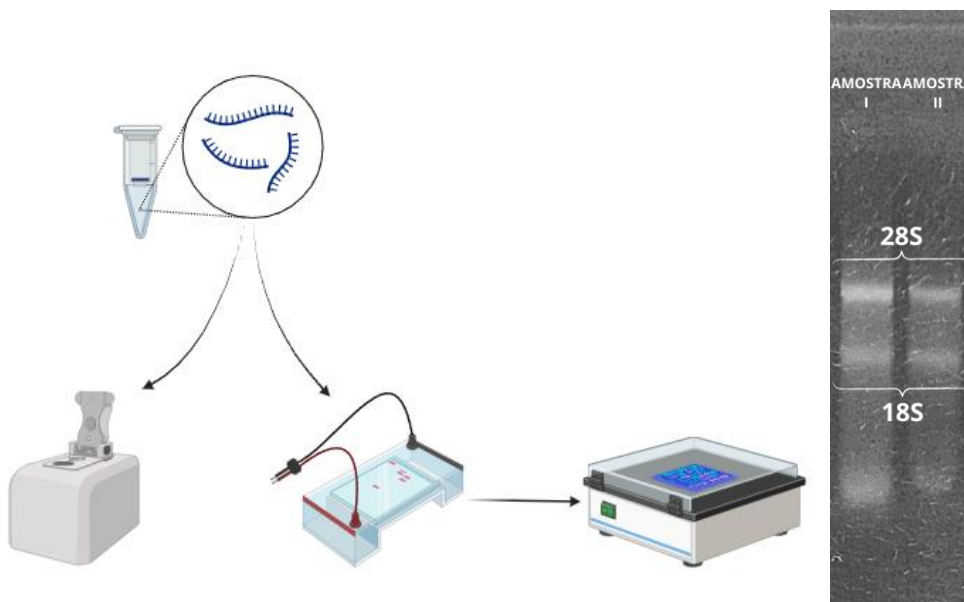
4.7 ANÁLISE DE QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DE RNA

A quantificação de RNA das amostras foi o próximo passo, sendo essencial para verificar se há uma concentração adequada do material a ser usado nas análises do projeto. A análise se deu por meio da metodologia de espectrofotometria, sendo realizada no equipamento *Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer*. Adicionalmente, foi feita a avaliação das relações de pureza, tais como a taxa de fração 260/280, indicativa da concentração de proteínas, e a taxa de fração 260/230, referente a contaminantes químicos (Figura 16).

Além disso, foi feita a análise de integridade das amostras de RNA, a fim de assegurar a qualidade do material e evitar resultados equivocados devido à degradação da amostra, através do método de eletroforese em gel de agarose (1%), corado com *Sybr safe DNA Gel Stain* da marca *Life Technologies*. Duas bandas correspondentes ao RNAs ribossomais, 18S e 28S, foram visualizadas no *Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator* da marca *Invitrogen/Life Technologies* (Figura 16).

Durante todo o manuseio do material genético, foi reforçada sua manipulação em baixa temperatura e seu posterior armazenamento a -80°C . Quando necessário, as amostras foram diluídas com água *nuclease free* (H_2O NF) na concentração padronizada de $20\text{ ng}/\mu\text{L}$.

Figura 16: Esquema de análise de qualidade do RNA extraído.



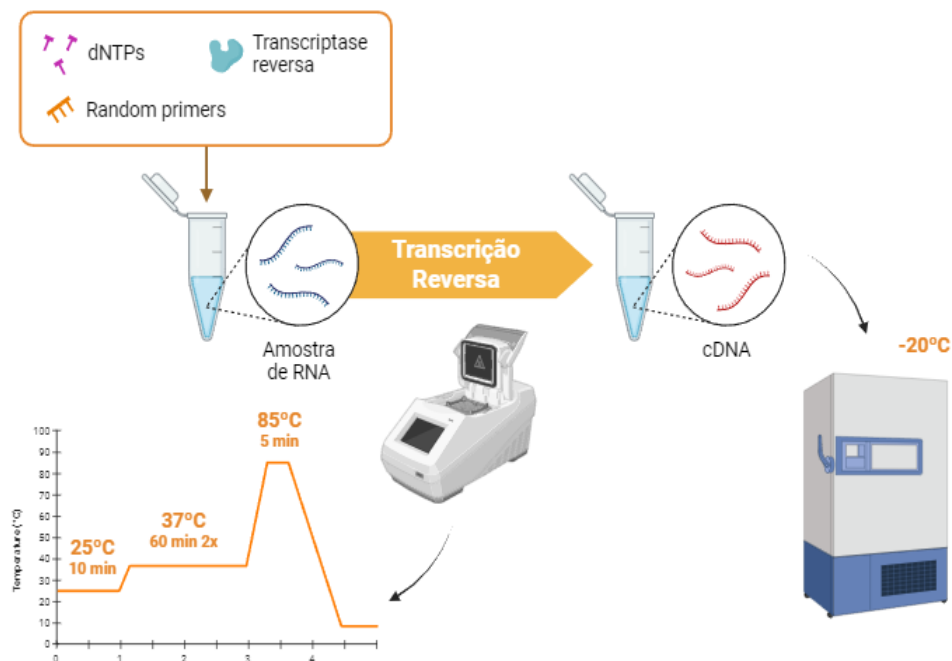
Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

4.8 TRANSCRIÇÃO REVERSA DO RNA EM cDNA

O RNA com qualidade confirmada foi, então, convertido a DNA complementar (cDNA) pelo uso do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription®* da marca *Applied Biosystems™* de acordo com o manual do fabricante. O kit se vale do método contendo a enzima transcriptase reversa e iniciadores aleatórios para a síntese da fita simples de DNA, a partir das moléculas de RNA presentes na amostra. O cDNA convertido foi armazenado a temperatura de -20°C até o momento de uso para as análises posteriores (Figura 17).

A ciclagem foi realizada no termociclador *2720 Thermal Cycler* da marca *Applied Biosystems™*, de acordo com os seguintes parâmetros: 25°C por 10 minutos, 37°C por 60 minutos, 37°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos.

Figura 17: Esquema de conversão de RNA em cDNA.



Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

4.9 ANÁLISE DE FUSÕES GÊNICAS PARA LLA

Para a análise de fusões gênicas, o cDNA que foi obtido pela reação de transcrição reversa foi utilizado para amplificação em duas ciclagens independentes e consecutivas de alvos moleculares através da técnica de Nested RT-PCR (Figura 18), com o kit *GoTaq® Colorless Master Mix* da marca *Promega™*, conforme instruções do protocolo. A metodologia da Nested RT-PCR é uma variação que visa aumentar a especificidade de amplificação utilizando dois conjuntos de *primers* diferentes em cada reação (Goode *et al.*, 2002). Para essa técnica foram utilizados conjuntos de *primers* desenhados para as fusões *BCR::AL1*, *TCF3::PBX1*, *KMT2A::AFF1*, *ETV6::RUNX1* e *STIL::TAL1*, de acordo com as sequências fornecidas por Van Dongen *et al.* (1999), considerando adaptações de protocolo com intuito de, possivelmente, otimizar os ensaios. É importante salientar que tais adaptações foram feitas como resultado de análises de qualidade dos pares de *primers*, tais como *hairpin*, *primer dimer*, utilizando a plataforma online *Oligo Analyzer*; além das análises de BLAT e BLAST. Os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 2. Para controle de reação, todos os pacientes terão, concomitantemente, a realização de RT-PCR de dois genes referência: *GAPDH* (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*).

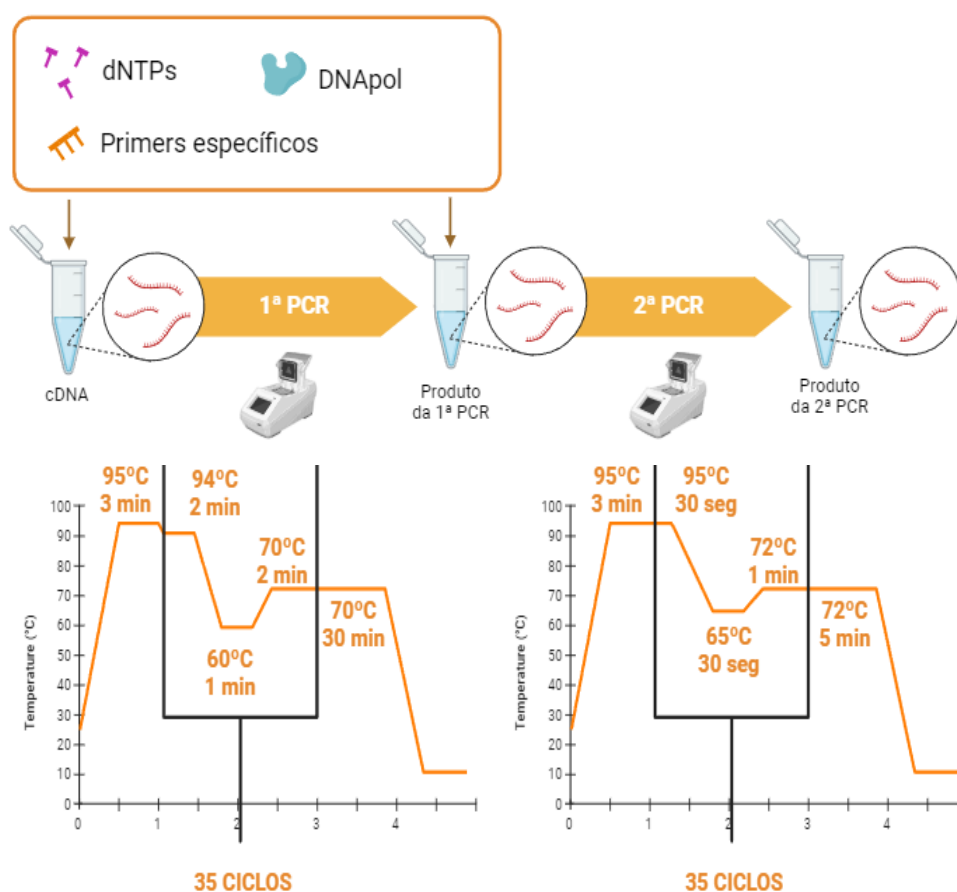
Tabela 2: Sequência de *primers* das 5 principais fusões gênicas documentadas em LLA. Desenhos fornecidos por Van Dongen *et al.* (1999).

Gene	Primers 1ª etapa (5'-3')	Amplificado (bp)*	Primers 2ª etapa (5'-3')	Amplificado (bp)*
<i>BCR</i>	GACTGCAGCTCC AATGAGAAC	347-521	CAGAACTCGCAA CAGTCCTTC	381-207
<i>ABL1</i>	GTTTGGGCTTCA CACCATTCC		TTCCCCATTGTGA TTATAGCCTA	
<i>TCF3</i>	CACCAGCCTCAT GCACAAC	373-400	CACCCTCCCTGA CCTGTCT	289-316
<i>PBX1</i>	TCGCAGGAGATT CATCACG		GGCCTGCTCGTA TTTCTCC	
<i>KMT2A</i>	CCGCCTCAGCCA CCTAC	184-673	AGGACCGCCAAG AAAAGA	127-616
<i>AFF1</i>	TGTCACTGAGCT GAAGGTCG		CGTTCCTTGCTGA GAATTG	
<i>ETV6</i>	TGCACCCTCTGA TCCTGAAC	259-298	AAGCCCATCAAC CTCTCTCATC	181-142
<i>RUNX1</i>	AACGCCTCGCTC ATCTTGC		TGGAAGGCGGCG TGAAGC	
<i>STIL</i>	TCCCGCTCCTACC CTGCAA	215-455	NA*	111-351
<i>TAL1</i>	CGCGCCCAGTTC GATGAC		CCGCGTCCCGTC CCTCTA	
<i>GAPDH**</i>	TCAGTGGTGGAC CTGACCTG	88		
<i>GAPDH***</i>	TGCTGTAGCCAA ATTCGTTG			
<i>HPRT**</i>	GTTGGATATAAG CCAGACTTTGTT	164	NA	NA
<i>HPRT***</i>	ACTCAACTTGAA CTCTCATCTTAGG C			

* Tamanho (bp - pares de bases) considerando as possíveis isoformas abrangidas pelos *primers*. ** *Primer* forward. *** *Primer* reverse. NA: não se aplica. NA** A fusão *STIL-TAL1* não apresenta *primer* específico para *STIL* na 2ª etapa da Nested RT-PCR, logo, a testagem é feita utilizando o mesmo *primer* da 1ª etapa. **Fonte:** Própria autora.

A ciclagem foi realizada no termociclador 2720 *Thermal Cycler* da marca *Applied Biosystems*TM, de acordo com os seguintes parâmetros: para os genes referência a amplificação iniciou-se com desnaturação a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 2 minutos, 60°C por 1 minuto e 70°C por 2 minutos, com a etapa final a 70°C por 30 minutos; já para as fusões gênicas, a desnaturação iniciou-se a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, com a etapa final a 72°C por 5 minutos (Figura 18).

Figura 18: Esquema da testagem de fusões gênicas por Nested PCR.



Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

Após as reações, os amplificados foram confrontados com um marcador de peso molecular por eletroforese em gel de agarose (1,5%), corado com *Sybr safe DNA Gel Stain* da marca *Life Technologies* e visualizados em *Safe Imager*TM 2.0 *Blue Light Transilluminator* da marca *Invitrogen / Life Technologies*.

4.10 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *PRDM16*

A RT-qPCR foi o método escolhido para a avaliação de *PRDM16*, pois permite a visualização, análise e quantificação da expressão gênica, a partir do cDNA convertido, usando um *software*, os quais configuram os parâmetros de interesse deste estudo. Foram aplicadas sondas *TaqMan*®, projetadas para aumentar a especificidade da PCR quantitativa, e o kit *TaqMan*® *Gene Expression Master Mix*, ambos da marca *Applied Biosystems*®/*Life Technologies* (Figura 20).

O princípio *TaqMan*® utiliza uma sonda de hidrólise fluorescente para possibilitar a detecção de um produto específico da PCR conforme esse se acumula durante os ciclos da reação. Para tanto, foi utilizado o equipamento *7500 Real-Time PCR System*, da marca *Applied Biosystems*®. Com a finalidade de padronizar e normalizar os dados do ensaio, foram utilizados dois genes de referência, *ACTB* (*Actin beta*) e *ABL1*, os quais foram anteriormente elencados como bons genes normalizadores para análise via RT-qPCR de LLA pediátrica (Pessoa *et al.*, 2024). A normalização dos dados é uma ferramenta imprescindível na análise de expressão gênica, uma vez que os níveis de mRNA dos genes de interesse precisam ser confrontados com uma fonte estável, abundante e tecido-específica, tal qual os genes de referência, possibilitando, enfim, a identificação de alterações de expressão (Bustin *et al.*, 2009). A referência dos ensaios *TaqMan*® para *PRDM16*, *ACTB* e *ABL1* estão listados na Tabela 3. Ademais, todas as amostras foram avaliadas em triplicata, contando também com controles negativos (NTC), a fim de assegurar a esterilidade da reação.

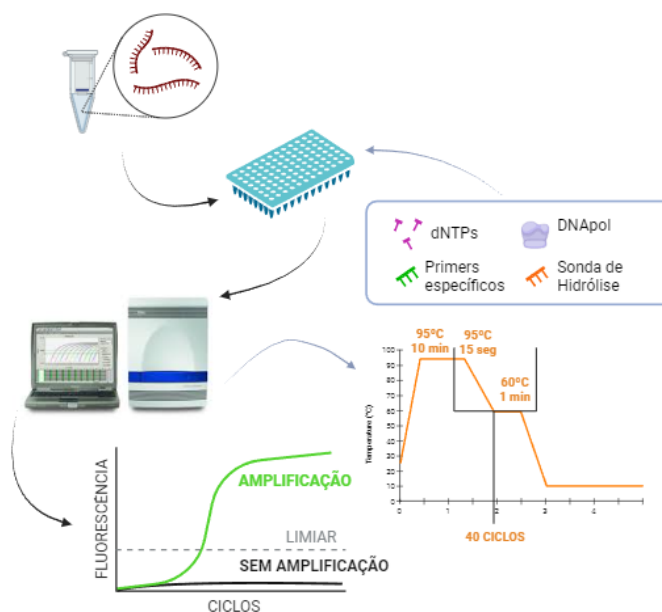
Tabela 3: Informações das sondas *TaqMan*® para *PRDM16*, *ACTB* e *ABL1*.

Gene	Sequência nucleotídica (5'-3')	Tamanho (bp)	Posição	Éxon	Referência do ensaio
<i>PRDM16</i>	GAACAGAGAAACGGGC GGACATGCA	25	3329- 3353*	14	Hs00223161_m1
<i>ACTB</i>	CCCAGGCACCGGGCGT GATGGTGG	25	196- 220**	3	Hs01060665_g1
<i>ABL1</i>	GCGAGCATGTTGGCAGT GGAATCCC	25	1609- 1633***	9	Hs01104728_m1

*Baseado na sequência [NM_022114.4](#) do GenBank. **Baseado na sequência [NM_001101.5](#) do GenBank. ***Baseado na sequência [NM_005157.6](#) do GenBank. **Fonte:** Própria autora.

O protocolo de amplificação seguiu o seguinte padrão: a desnaturação a 95°C por 10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 min (Figura 19).

Figura 19: Esquema da testagem de expressão do gene *PRDM16*.



Fonte: Própria autora. Criado no BioRender.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram organizados em planilhas no programa *Microsoft Excel*. Os dados clínico-laboratoriais e moleculares qualitativos passaram por cálculo de porcentagem, a partir de categorias. Já os dados quantitativos passaram por estatística descritiva, utilizando medidas de tendência central (média, mediana, máximo e mínimo) e de variabilidade (desvio padrão).

Para os dados de expressão gênica, foi utilizado o método de Ct (*cycle threshold*) comparativo para calcular a quantificação relativa. Em síntese, o Ct de cada amostra foi determinado, e posteriormente foi obtida uma média entre as triplicatas. Em seguida, foi calculado o ΔCt , que representa a diferença limiar no número de ciclos entre o gene alvo e a média do número de ciclos entre os genes referência ($\Delta Ct = \text{Média do Ct das triplicatas da amostra} - \text{Média de Ct dos endógenos}$); e, posteriormente, o $\Delta\Delta Ct$, que representa a diferença entre o ΔCt de cada amostra do grupo de pacientes e a média de ΔCt do grupo controle ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ da amostra} - \text{Média de } \Delta Ct \text{ do grupo controle}$). Em seguida, foi calculado o $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, correspondente ao respectivo *fold change* (FC) entre amostras com diferentes características

clínicas, laboratoriais e moleculares, o qual representa uma medida de mudança relativa na expressão de um gene entre condições diferentes (Livak; Schmittgen, 2001).

Os dados do gene *PRDM16* em conjunto com os genes de referência selecionados, por tratarem-se de variáveis contínuas, foram avaliados primeiramente pelos testes estatísticos de normalidade Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson. Assumindo a normalidade da distribuição e de acordo com as diferenças de variâncias para cada agrupamento de dados, foram utilizados os testes T de Student ou T de Welch, para analisar a diferença entre os níveis de expressão global de pacientes e controles saudáveis.

Foram feitas comparações entre as amostras, de acordo com as curvas da RT-qPCR e as características clínicas, laboratoriais e moleculares dos pacientes, de modo a checar as diferenças evidenciadas nas análises com o gene de interesse em detrimento dos genes de referência. Para comparar os valores de FC entre as variáveis categóricas, foram aplicados os testes de Shapiro-Wilk e D'Agostino-Pearson, concluindo que a distribuição era não-paramétrica. Por conta disso, nesse tipo de análise foram aplicados os testes de U de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, quando necessário. O mesmo procedimento foi feito ao comparar os níveis de expressão com variáveis contínuas, onde foi possível perceber alguns agrupamentos amostrais paramétricos e outros não-paramétricos, portanto, foram utilizados os testes T de Student e U de Mann-Whitney, quando aplicável. Além disso, o teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher foram empregados para análise de associações somente entre as variáveis categóricas, sendo as significativas mensuradas por *Odds Ratio* (OR), com correção de Haldane-Anscombe quando necessário. Foi feito, também, um teste de correlação de Spearman, entre FC e as demais variáveis.

Ademais, foi realizada a análise da curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC), a fim de avaliar a capacidade discriminativa de *PRDM16* para ser utilizado como um biomarcador. A curva ROC foi gerada a partir dos dados coletados, e a área sob a curva (AUC) foi calculada para quantificar o desempenho como um biomarcador.

A significância estatística adotada foi de $p \leq 0,05$, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Os testes estatísticos bem como os gráficos foram realizados na plataforma *Endogene Analyzer* (Teixeira *et al.*, 2024) e nos *softwares* PSPP versão 1.2, Jamovi 2.3 e Bioestat 5.3.

4.12 ANÁLISE DE RISCOS E BENEFÍCIOS

Por se tratar de uma pesquisa experimental conduzida em seres humanos, é inevitável elencar riscos. Sabendo disso, a pesquisa foi conduzida obedecendo aos preceitos éticos que objetivam prevenir tais acontecimentos, tais como: coleta de dados somente após aprovação do estudo pelo CEP/NPO e assinatura do TALE; não identificação dos pacientes e seus responsáveis durante todo o período da pesquisa, a fim de evitar a quebra de sigilo; e o controle dos dados da pesquisa através da checagem periódica das planilhas, assim como o tratamento deles em *software* de referência, com a finalidade de evitar a exposição de resultados inconsistentes.

Ademais, projeta-se que o presente estudo contribuirá de maneira efetiva para a população estudada, uma vez que consiste em um importante passo no auxílio da intervenção médica para os casos de LLA pediátrica com alterações moleculares ainda não estabelecidas. Além disso, a equipe de pesquisa foi beneficiada com um novo acervo de conhecimento acerca de novos candidatos a biomarcadores genéticos para LLA, contribuindo para a atualização da comunidade científica interessada no tema. Tais resultados poderão esclarecer a hipótese levantada de que existe relação entre modulações do gene *PRDM16* com a clínica dos pacientes pediátricos com LLA.

5. RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E MOLECULARES

O grupo amostral composto por 80 pacientes recém-diagnosticados com LLA apresentou predominância do subtipo B (86,25%), em detrimento do subtipo de células T (13,75%). Das amostras investigadas, 62,5% eram de sangue periférico e 37,5% de medula óssea. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (62,5%), enquanto que a faixa etária prevalente foi a de 2 a 9 anos (66,25%), com média de $6,85 \pm 4,34$ e mediana de 6 anos (Tabela 4).

Tabela 4: Dados clínicos dos pacientes com LLA.

Dados clínicos (n = 80)	N	%
Tipo de LLA		
LLA-B	69	86,25
LLA-T	11	13,75
Tipo de amostra		
Sangue Periférico	50	62,5
Medula Óssea	30	37,5
Sexo		
Masculino	50	62,5
Feminino	30	37,5
Idade (anos)		
0 A 1	5	6,25
2 A 9	53	66,25
≥ 10	22	27,5
Média $\pm$ Desvio Padrão	$6,85 \pm 4,34$	
Mediana	6	
Mínimo	0	
Máximo	17	

Fonte: Própria autora.

Em relação aos aspectos laboratoriais, foi possível observar que a maioria dos pacientes apresentavam alterações no primeiro hemograma (Tabela 5). Quadros de leucopenia (42,5%) foram os mais frequente, seguidos de quadros de leucocitose (35%) e, por fim, contagem dentro da faixa regular de leucócitos (22,5%), com média de 38.317 ± 87.796 e mediana de 7.290 leucócitos. Houve predominância de quadros de anemia (66,25%), em relação a quadros de dosagem normal de hemoglobina (33,75%), com média de $9,18 \pm 1,81$ e mediana de 9. A maioria dos pacientes enfrentava quadros de plaquetopenia (66,25%),

enquanto que 25% obtiveram uma contagem normalizada de plaquetas e 8,75% apresentavam quadros de trombocitose, com média de 183.262 ± 380.810 e mediana de 75.000. No que concerne ao grupo de risco segundo o NCI, houve prevalência de casos de risco padrão (65%).

Tabela 5: Dados laboratoriais dos pacientes com LLA.

Dados laboratoriais (n = 80)	N	%
Leucócitos		
<5.000 (Leucopenia)	34	42,5
5.000 A 15.000	18	22,5
>15.000 (Leucocitose)	28	35
Média $\pm$ Desvio Padrão	38.317 $\pm$ 87.796	
Mediana	7.290	
Mínimo	750	
Máximo	531.300	
Hemoglobina		
≥ 10	27	33,75
<10 (Anemia)	53	66,25
Média $\pm$ Desvio Padrão	9,18 $\pm$ 1,81	
Mediana	9	
Mínimo	5,2	
Máximo	12,8	
Plaquetas		
<150.000 (Plaquetopenia)	53	66,25
150.000 A 400.000	20	25
>400.000 (Trombocitose)	7	8,75
Média $\pm$ Desvio Padrão	183.262 $\pm$ 380.810	
Mediana	75.000	
Mínimo	7.000	
Máximo	3.190.000	
Grupo de risco		
Risco padrão	52	65
Alto risco	28	35

Fonte: Própria autora.

No que diz respeito aos dados moleculares, constatou-se a presença de fusão gênica em 46,25% dos pacientes (Tabela 6). Desse total, houve a prevalência da fusão *ETV6::RUNX1*, a qual correspondeu a 26,25% dos casos, seguida de 13,75% de casos de *TCF3::PBX1*, 3,75% de *BCR::ABL1*, 1,25% de *KMT2A::AFF1* e 1,25% de *STIL::TAL1*.

Tabela 6: Dados moleculares dos pacientes com LLA.

Dados moleculares (n = 80)	N	%
Fusões gênicas		
Ausência	43	53,75
Presença	37	46,25
Tipo de fusão gênica		
<i>BCR::ABL1</i>	3	3,75
<i>TCF3::PBX1</i>	11	13,75
<i>KMT2A::AFF1</i>	1	1,25
<i>ETV6::RUNX1</i>	21	26,25
<i>STIL::TAL1</i>	1	1,25

Fonte: Própria autora.

5.2 EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE *PRDM16*

Acerca das análises da expressão do gene *PRDM16*, dos 80 casos estudados, 71 apresentaram níveis de expressão detectáveis (88,75%), ao passo que 9 casos não apontaram nenhum tipo de expressão do gene em questão (11,25%), portanto, foram considerados como eventos de silenciamento gênico. Dos 71 casos onde o *PRDM16* foi expresso, 62 eram de LLA-B e 9 de LLA-T. Já dos 9 casos de *PRDM16* silenciado, 7 eram do tipo B e 2 do tipo T (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil de expressão do gene *PRDM16* nos pacientes com LLA.

Perfil de expressão de <i>PRDM16</i> (n = 80)	N		%
	LLA-B	LLA-T	
<i>PRDM16</i> expresso	62	9	88,75
<i>PRDM16</i> silenciado	7	2	11,25

Fonte: Própria autora.

Os dados dos 71 pacientes com expressão de *PRDM16*, juntamente com os dados de expressão dos 8 voluntários saudáveis que atuaram como o grupo controle no estudo, passaram pela análise de genes referência da ferramenta online *Endogene Analyzer*, onde foi possível perceber que *ACTB* se comportou como um bom gene referência ($p=0,121$), ao passo que *ABL1* variou de forma significativa entre as amostras ($p=0,012$). Apesar disso, os dois genes continuaram sendo utilizados em conjunto na normalização de dados, uma vez que as diretrizes de “Informações Mínimas para Publicação de Experimentos Quantitativos de PCR em Tempo Real” (MIQE) (Bustin *et al.*, 2009) definem o número mínimo de genes referência como dois.

No que diz respeito à análise comparativa de Ct, observou-se que a média do ΔCt do grupo controle foi de $13,43 \pm 0,75$ ciclos, maior do que a dos pacientes com LLA, que foi de $12,02 \pm 2,54$ ciclos (Tabela 8). Ao analisar mais a fundo os subtipos de LLA, percebeu-se que a média do ΔCt dos casos de LLA-T ($\Delta Ct = 8,83 \pm 1,03$) foi menor que a média de LLA-B ($\Delta Ct = 12,48 \pm 2,36$). Tais variações tornaram-se ainda mais perceptíveis ao analisar a média de *fold change* (FC) entre os grupos, em que o grupo de casos LLA-T obteve a maior média (FC = $36,01 \pm 26,15$), seguida do grupo LLA geral (FC = $10,21 \pm 16,6$) e, por fim, o grupo de LLA-B (FC = $6,46 \pm 10,74$).

Tabela 8: Análise de Ct comparativo e *fold change* da expressão de *PRDM16* nos pacientes com LLA.

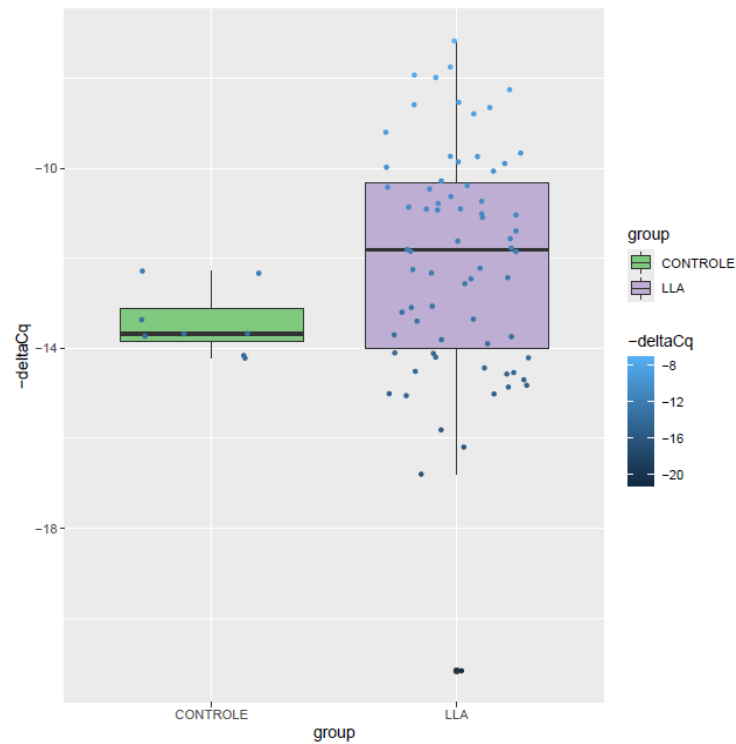
Grupos	ΔCt		<i>p</i>
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mediana	
Controle (n = 8)	$13,43 \pm 0,75$	13,67	
LLA (n = 71)	$12,02 \pm 2,54$	11,80	0,001 ^a
LLA-B (n = 62)	$12,48 \pm 2,36$	12,28	0,024 ^a
LLA-T (n = 9)	$8,83 \pm 1,03$	8,58	0,000 ^b
Grupos	Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)		
	Média $\pm$ Desvio Padrão	Mediana	
LLA	$10,21 \pm 16,6$	3,66	
LLA-B	$6,46 \pm 10,74$	2,62	
LLA-T	$36,01 \pm 26,15$	34,06	

^a*p* valor significativo, teste T de Welch; ^b*p* valor significativo, teste T de Student. **Fonte:** Própria autora.

Ao avaliar a expressão diferencial global de *PRDM16* entre o grupo LLA e o grupo controle, percebeu-se um aumento de expressão do gene de forma estatisticamente significativa ($p = 0,001$) no grupo LLA (Figura 20).

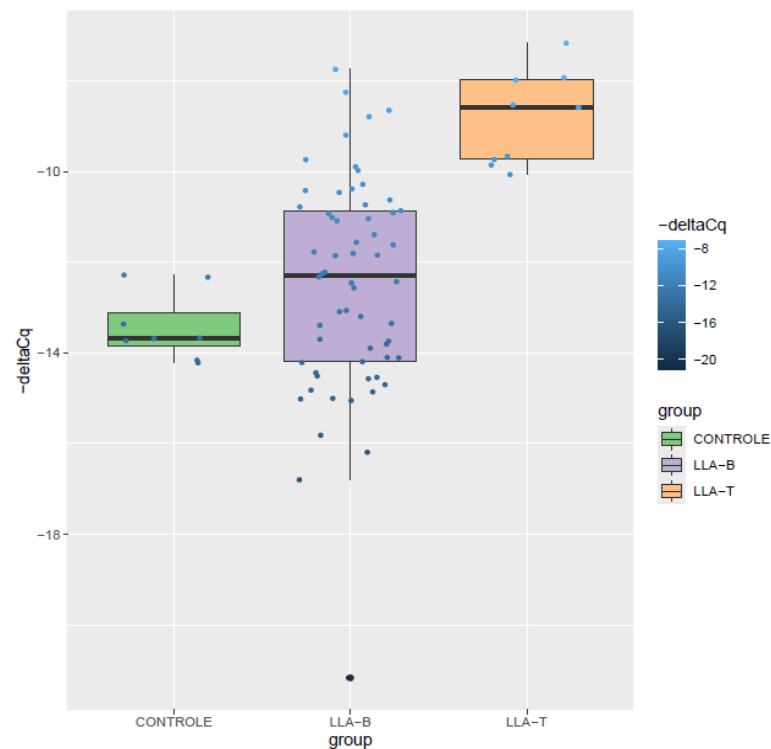
Assim como demonstrado nas análises descritivas anteriores, também foi encontrada diferença significativa quando comparadas as expressões entre o grupo controle e os subtipos LLA-B ($p = 0,024$) e LLA-T ($p = 0,000$), sugerindo a superexpressão de *PRDM16* nos casos de leucemia, principalmente na LLA-T, como demonstra a figura 21.

Figura 20: Expressão diferencial de *PRDM16* entre grupo LLA e grupo controle.



Teste T de Welch. LLA n = 71. Controle n = 8. **Fonte:** Própria autora. Gerado no *Endogene Analyzer*.

Figura 21: Expressão diferencial de *PRDM16* entre grupo controle e casos de LLA-B e LLA-T.



Testes T de Welch (Controle x LLA-B) e T de Student (Controle x LLA-T). LLA-B n = 62. LLA-T n = 9. Controle n = 8). **Fonte:** Própria autora. Gerado no *Endogene Analyzer*.

5.3 EXPRESSÃO DE *PRDM16* vs. DADOS CLÍNICOS, LABORATORIAIS E MOLECULARES

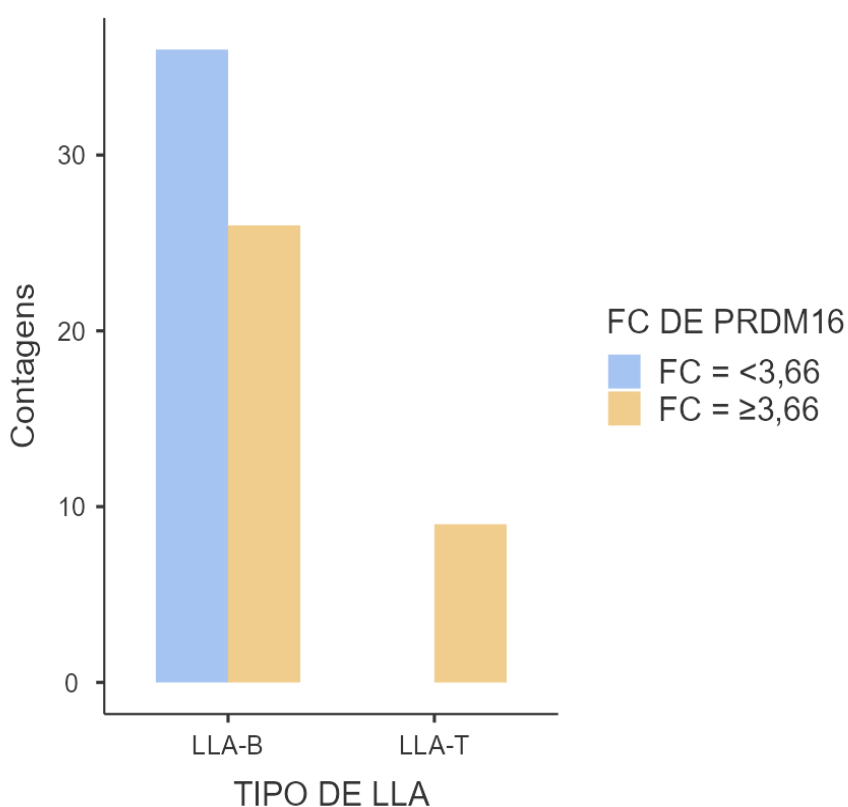
Ao investigar a comparação de médias de FC de *PRDM16* entre os dados clínicos, laboratoriais e moleculares, foi observado mais uma vez que o aumento significativo de expressão de *PRDM16* ocorreu em maior proporção em casos de LLA-T ($p < 0,001$), o qual também demonstrou ter correlação moderadamente positiva com o FC ($p < 0,001$; Rho de Spearman = 0,514). Além desse achado, houve diferença significativa entre as médias de FCs das categorias de contagem plaquetária ($p = 0,025$), em que a menor média foi associada aos casos de trombocitose ($p = 0,05$), quando comparado com a taxa normal, demonstrando correlação moderadamente negativa ($p = 0,027$; Rho de Spearman = -0,461). Ademais, é interessante notar que, apesar da não significância estatística, algumas categorias apresentaram certa tendência à significância, como maior média de FC em sangue periférico ($p = 0,053$) e menor média na presença da fusão *ETV6::RUNX1* ($p = 0,051$) (Tabela 9).

Além da análise entre médias de FC, o estudo promoveu também a avaliação de associação entre variáveis categóricas (Tabela 9). Nesse sentido, para confrontar os dados de expressão de *PRDM16* com as variáveis categóricas presentes no estudo, optou-se por categorizar os casos de LLA em dois grupos: amostras com FC inferior à mediana global (3,66) e amostras com valor igual ou superior ao da mediana. Dessa forma, foi possível avaliar se o grau de hiperexpressão de *PRDM16* poderia se associar a algum aspecto estudado. Nessa análise, a maioria das associações não apresentou significância. Entretanto, novamente foi encontrada diferença estatística entre os tipos de LLA, com predominância de alto grau de hiperexpressão do gene em casos de LLA-T ($p = 0,002$; OR = 26,2; IC = 1,46 - 470) (Figura 22). Além disso, foi possível notar certa tendência à significância na associação com a contagem de plaquetas ($p = 0,059$).

Ausência	9,65	0,943	0,937	28	32	0,301
Presença	13,30			7	4	
KMT2A::AFF1						
Ausência	10,3	0,294	0,286	34	36	0,307
Presença	0,59			1	0	
ETV6::RUNX1						
Ausência	12,3	0,052	0,051	24	27	0,547
Presença	4,83			11	9	
STIL::TAL1						
Ausência	9,62	0,124	0,119	35	35	0,321
Presença	51,8			0	1	

^a*p* valor significativo, teste U de Mann-Whitney. ^b*p* valor significativo, teste Kruskal-Wallis. ^c*p* valor não significativo, pós-teste de Dunn (Plaquetopenia x Normal); ^d*p* valor não significativo, pós-teste de Dunn (Plaquetopenia x Trombocitose); ^e*p* valor significativo, pós-teste de Dunn (Normal vs Trombocitose). ^f*p* valor significativo, teste de Spearman. ^g*p* valor significativo, teste Exato de Fisher. **Fonte:** Própria autora.

Figura 22: Comparação de grau de hiperexpressão de *PRDM16* entre LLA-B e LLA-T.



Fonte: Própria autora. Gerado no Jamovi.

Adotando o mesmo parâmetro de agrupamento para a expressão de *PRDM16*, foi possível confrontar os dados com os dados de idade e contagens totais do hemograma. Nessa

investigação não foram observadas diferenças significativas entre as comparações de média (Tabela 10).

Tabela 10: Comparação entre médias de parâmetros com a expressão de *PRDM16*.

Expressão de <i>PRDM16</i>	Idade	Leucócitos	Hemoglobina	Plaquetas
	Média			
<3,66	6,77	40.263	9,29	215.278
≥3,66	7,11	44.003	9,07	134.457
<i>p</i>	0,740	0,940	0,624	0,986

Testes T de Student ou U de Mann-Whitney. **Fonte:** Própria autora.

5.4 EXPRESSÃO vs. SILENCIAMENTO DE *PRDM16*

Outra análise feita no estudo foi a comparação entre o grupo com algum nível de expressão de *PRDM16* e o grupo onde *PRDM16* apresentou um comportamento de silenciamento. Ao investigar as médias de idade e contagens totais do hemograma em relação aos dois grupos, não foram encontradas diferenças significativas (Tabela 11).

Tabela 11: Comparação entre médias de parâmetros entre amostras com e sem a expressão de *PRDM16*.

Status de <i>PRDM16</i> (n = 80)	Idade	Leucócitos	Hemoglobina	Plaquetas
	Média			
Expresso	6,94	42.106	9,18	175.436
Silenciado	6,11	8.424	9,23	245.000
<i>p</i>	0,591	0,281	0,935	0,609

Testes T de Student ou T de Welch. **Fonte:** Própria autora.

No que diz respeito às análises de associação entre o status de *PRDM16* e os agrupamentos de dados clínicos, laboratoriais e moleculares, a maior parte dos cruzamentos não evidenciou diferença estatística (Tabela 12). Porém, foi encontrada associação entre o silenciamento de *PRDM16* e a ausência de fusões gênicas ($p = 0,033$; OR = 0,12; IC = 0,01 - 1,02) (Figura 23), sendo observado somente um caso de fusão (*ETV6::RUNX1*) neste grupo.

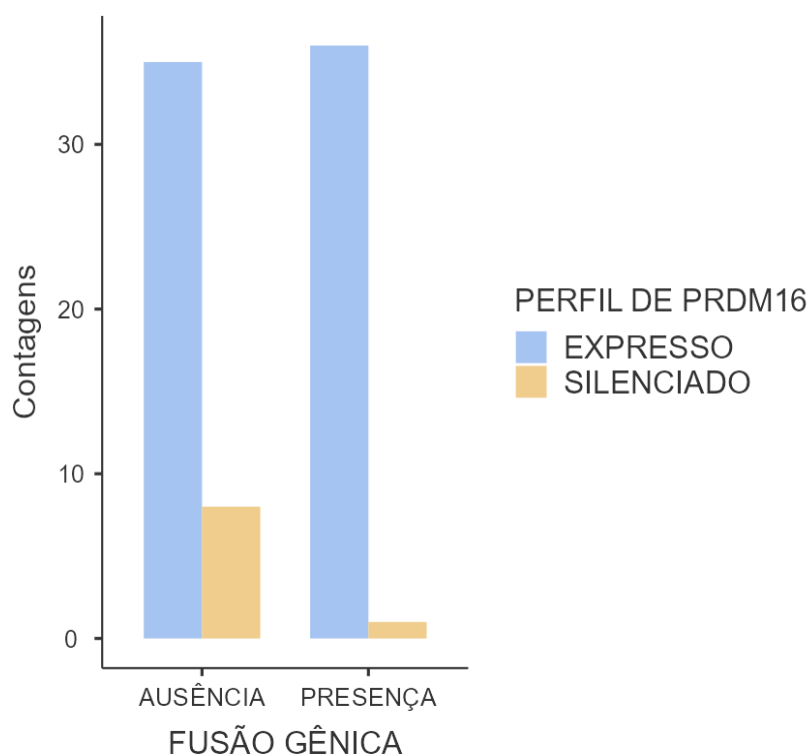
Tabela 12: Comparação entre dados clínicos, laboratoriais e moleculares e expressão ou silenciamento de *PRDM16*.

Dados clínicos, laboratoriais e moleculares (n = 80)	Status de <i>PRDM16</i>		<i>p</i>
	Expresso	Silenciado	
Tipo de LLA			

LLA-B	62	7	0,433
LLA-T	9	2	
Tipo de amostra			
Sangue Periférico	43	7	0,315
Medula Óssea	28	2	
Sexo			
Masculino	45	5	0,648
Feminino	26	4	
Idade (anos)			
0 A 1	5	0	0,625
2 A 9	46	7	
≥10	20	2	
Leucócitos			
<5.000 (Leucopenia)	30	4	0,603
5.000 A 15.000	15	3	
>15.000 (Leucocitose)	26	2	
Hemoglobina			
≥10	23	4	0,471
<10 (Anemia)	48	5	
Plaquetas			
<150.000 (Plaquetopenia)	48	5	0,315
150.000 A 400.000	18	2	
>400.000 (Trombocitose)	5	2	
Grupo de risco			
Risco padrão	39	7	0,191
Alto risco	32	2	
Fusões gênicas			
Ausência	35	8	0,033*
Presença	36	1	
BCR::ABL1			
Ausência	68	9	1
Presença	3	0	
TCF3::PBX1			
Ausência	60	9	0,347
Presença	11	0	
KMT2A::AFF1			
Ausência	70	9	1
Presença	1	0	
ETV6::RUNX1			
Ausência	51	8	0,433
Presença	20	1	
STIL::TAL1			
Ausência	70	9	1
Presença	1	0	

*p valor significativo, teste Exato de Fisher. **Fonte:** Própria autora.

Figura 23: Comparação de ocorrência de fusões gênicas entre casos de expressão ou silenciamento de *PRDM16*.



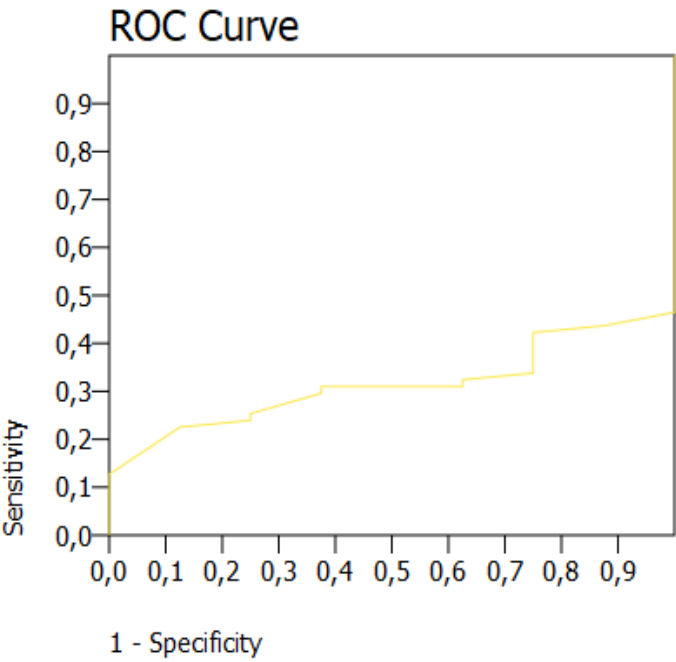
Fonte: Própria autora. Gerado no Jamovi.

5.5 ANÁLISE DE CURVA ROC DE *PRDM16*

Por fim, a análise da curva ROC foi realizada para avaliar a capacidade discriminativa de *PRDM16* como biomarcador. Ao comparar o grupo LLA e o controle, a curva ROC resultante apresentou uma AUC de 0,32 (IC = 0,22 - 0,41). Esse valor sugere que o nível de expressão do gene *PRDM16* não é um bom preditor para diferenciar entre LLA e controles saudáveis (Figura 24).

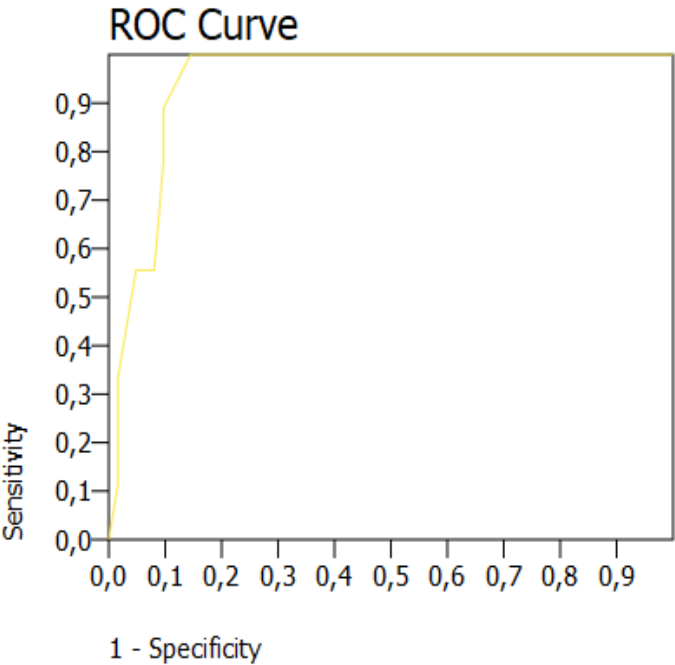
Entretanto, ao comparar os casos de diferentes subtipos de LLA, a análise mostrou uma AUC de 0,95 (IC = 0,90 - 0,99), indicando que o nível de expressão do gene *PRDM16* é altamente eficaz para distinguir entre os subtipos LLA-T e LLA-B (Figura 25).

Figura 24: Curva ROC comparando grupo LLA vs. grupo controle.



Fonte: Própria autora. Gerado no PSPP.

Figura 25: Curva ROC comparando grupo LLA-B vs. grupo LLA-T.



Fonte: Própria autora. Gerado no PSPP.

6. DISCUSSÃO

PRDM16 tem um papel multifacetado em diferentes tecidos. Dessa forma, quaisquer alterações na dinâmica de funcionamento de sua proteína podem levar a sérios danos em tecidos como o cardíaco, ósseo, adiposo, neuronal, endotelial, pancreático; assim como podem auxiliar o desenvolvimento de tumores hematológicos e sólidos (Shi *et al.*, 2024). Sendo assim, o presente estudo avaliou o perfil de expressão do gene em pacientes pediátricos com LLA, visando investigar seu potencial como biomarcador diagnóstico ou prognóstico para a doença.

No grupo estudado, foi possível perceber prevalências de casos de LLA-B, indivíduos do sexo masculino e faixa etária de 2 a 9 anos, demonstrando concordância com as estatísticas epidemiológicas globais (Lejman *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2023; Miranda-Filho *et al.*, 2018). Ao analisar o hemograma inicial dos pacientes, quadros de leucopenia, anemia e plaquetopenia foram os mais frequentes nesta pesquisa. Esses achados corroboram em partes com as comparações feitas por Khalid *et al.* (2023), onde foi encontrado o perfil de leucocitose, anemia e plaquetopenia dentre pacientes com LLA-B, sendo o padrão mais comum na LLA. Porém, em um estudo envolvendo crianças hispânicas, os parâmetros expostos foram semelhantes aos do presente estudo, indicando que mesmo fora do tradicionalmente esperado, existem padrões variados na apresentação inicial da LLA entre as diferentes populações mundiais (Jaime-Pérez *et al.*, 2019). Casos de risco padrão tiveram predominância em relação aos casos de alto risco, indicando que a maioria dos pacientes apresentavam maiores chances de ter um desfecho favorável (Smith *et al.*, 1996).

As fusões gênicas estavam presentes em 46,25% dos pacientes, sendo os subtipos mais incidentes *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1* e *BCR::ABL1*. Mata-Rocha *et al.* (2022) também identificaram a fusão *ETV6::RUNX1* como a mais prevalente em sua coorte mexicana, a qual correspondeu a 10,5% dos casos, seguida da fusão *TCF3::PBX1*, com 7,7% dos casos. Ainda assim, os autores refletiram sobre a baixa prevalência de *ETV6::RUNX1* em populações com altas contribuições de ancestralidade nativa americana quando comparadas às populações de países desenvolvidos, as quais apresentam maior ancestralidade europeia, trazendo à tona a necessidade desse tipo de comparação entre populações com as mesmas colaborações ancestrais.

Por conta disso, procurou-se observar as documentações de testagens moleculares dos mesmos alvos do presente estudo em pacientes da Amazônia Brasileira. No estado do Pará, estudos anteriores demonstraram a prevalência das mesmas fusões encontradas nesta pesquisa, entretanto, com frequências distintas. Nos 104 pacientes pediátricos com LLA analisados por Moreira-Nunes *et al.*, (2020), as fusões gênicas mais frequente foram *TCF3::PBX1* (20,19%), *BCR::ABL1* (14,42%) e *ETV6::RUNX1* (8,65%). A mesma tendência foi observada na pesquisa de Souza *et al.* (2020), em que dos 84 pacientes pediátricos avaliados, 21,42% apresentavam a fusão *TCF3::PBX1*, 14,30% a fusão *BCR::ABL1*; e 7,14% a fusão *ETV6::RUNX1*. O estudo de Carvalho *et al.* (2020) também identificou maior frequência de *TCF3::PBX1* (23,2%), *BCR::ABL1* (16,2) e *ETV6::RUNX1* (12,1%) nos 121 pacientes investigados.

Já no estudo conduzido por Souza *et al.* (2023) com pacientes diagnosticados com LLA de um hospital de referência do Amazonas e utilizando os mesmos conjuntos de *primers* que a presente pesquisa, os autores identificaram a prevalência das fusões *ETV6::RUNX1* e *BCR::ABL1* (33% cada). Os resultados obtidos na presente pesquisa estão em consonância com as tendências mundiais (Inaba; Pui, 2021); entretanto, as discrepâncias encontradas na comparação com estudos da mesma região revelam a necessidade de aplicação das testagens moleculares para o entendimento da estratificação presente em coortes individualizadas.

A maior parte dos pacientes pediátricos com LLA (88,75%) analisados neste estudo apresentou superexpressão de *PRDM16*. Em uma análise global, *PRDM16* foi 10,21 vezes mais expresso nos pacientes com LLA, quando comparado com os controles saudáveis, mostrando que esse gene parece ter uma importância proeminente neste modelo de doença. Ao aprofundar ainda mais a análise, foi possível perceber que os casos de LLA-T demonstraram uma expressão aumentada em 36,01 vezes de *PRDM16*, enquanto que os casos de LLA-B apresentaram uma superexpressão mais atenuada, de 6,46 vezes. Dada tal discrepância, os outros testes estatísticos confirmaram essa diferença, correlacionando a LLA-T com maior chance de hiperexpressão de *PRDM16*.

Um estudo sistemático recente apontou que *PRDM16* é frequentemente alvo de translocações, alterações de metilação e mutações em seus domínios PR e CtBP em malignidades hematológicas, e em decorrência desses eventos existe um padrão bem conhecido de superexpressão da isoforma oncogênica *PRDM16S* (Shi *et al.*, 2024). Diversos

estudos descrevem essa tendência principalmente na LMA pediátrica (Shiba *et al.*, 2019; Miyamura *et al.*, 2019; Yamato *et al.* 2022; Kaburagi *et al.*, 2023).

Ao avaliar o transcriptoma de 139 pacientes pediátricos japoneses com LMA, *PRDM16* foi superexpresso em 46,76% dos indivíduos, além de ter sido encontrado em associação com a duplicação interna em tandem de *FLT3* (*FLT3-ITD*), em rearranjado raro com *RUNX1* e outras alterações citogenéticas e moleculares que conferiam baixas taxas de sobrevida e fatores de risco adversos (Shiba *et al.*, 2019). De forma complementar, em uma análise de metiloma conduzida com 64 pacientes pediátricos com LMA, Yamato *et al.* (2022) apontaram a presença de drásticas mudanças de metilação entre pacientes com alta e baixa expressão de *PRDM16*, sendo sua hipometilação associada à maior acessibilidade da cromatina em diversas regiões genômicas. Além disso, os autores constataram que os casos concomitantes de superexpressão de *PRDM16* e *FLT3-ITD* provocaram alterações de metilação em locais de ligação de STAT5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) e AP-1 (*AP-1 transcription factor subunit*), facilitando o acesso dessas proteínas ao DNA, o que pode colaborar para a proliferação e sobrevivência das células leucêmicas.

Já nas malignidades envolvendo a linhagem linfoide, os relatos são menos comuns, entretanto, envolvem também a isoforma *PRDM16S* (Yoshida *et al.*, 2004; Shing *et al.*, 2007; Roche-Lestienne *et al.*, 2008; Duhoux *et al.* 2011). Estudos demonstram que, enquanto a isoforma *PRDM16F* é necessária exclusivamente para a funcionalidade de CTHs, *PRDM16S* transpassa tal barreira, envolvendo-se, também, em estágios da linfopoiese, especialmente no desenvolvimento de células progenitoras linfoides LSK (*Lineage-Stage Sca-1+ c-Kit+*), as quais são responsáveis pelo repovoamento da medula óssea (Corrigan *et al.*, 2018). Adicionalmente, descobriu-se que *PRDM16S* regula genes mitocondriais como *MFN2* (*Mitofusin 2*), o qual codifica uma proteína capaz de promover a manutenção de CTHs com extenso potencial linfoide (Luchsinger *et al.*, 2016). Estes dados sugerem que apesar de *PRDM16* ser conhecido principalmente por suas atividades na linhagem mieloide, existem indícios de seu envolvimento na diferenciação linfoide.

Na LLA-T de adulto, foi observado níveis de metilação diferenciados entre as duas isoformas codificadas por *PRDM16*. Enquanto *PRDM16S* foi hipometilado, *PRDM16F* foi alvo de hipermetilação. Isso implicou em um predomínio exclusivo de expressão aberrante de *PRDM16S*, a qual influenciou diferencialmente a sinalização TGF- β , de modo a inibir a ação

das proteínas dessa via, que normalmente promove uma regulação negativa no crescimento de células hematopoiéticas (Yoshida *et al.*, 2004).

No estudo de Shing *et al.*, (2007), um caso de Linfoma não-hodgkin de células B em fase leucêmica apresentou a fusão de *PRDM16* com o gene atuante na diferenciação de células B e T *BACH2* (*BTB domain and CNC homolog 2*), t(1;6)(p36;q15), a qual produziu exclusivamente a isoforma *PRDM16S* de forma hiperexpressa, fato que diferiu dos outros quatro casos estudados de malignidades mieloides, os quais codificam as duas isoformas principais do gene: *PRDM16F* e *PRDM16S*. Outra fusão gênica, relatada em um caso de LLA-B Ph⁺ de adulto, envolveu *PRDM16* e *RUNX1*, que foi associado à curta sobrevida e à cooperação com a proteína BCR::ABL1 na agressividade e indiferenciação das células leucêmicas (Roche-Lestienne *et al.*, 2008).

Outra descoberta importante foi a de Duhoux *et al.* (2011), que além de terem identificado translocações envolvendo *PRDM16* na LMA e SMD, também expuseram a participação do gene em translocações presentes em dois casos de malignidades linfoides: a translocação t(1;2)(p36;p21), envolvendo o gene *THADA* (*THADA armadillo repeat containing*), em LLA-T; e a translocação t(1;22)(p36;q11), envolvendo o gene atuante na produção de imunoglobulinas *IGL@* (*Immunoglobulin lambda locus*), em um linfoma de zona marginal esplênico de células B. Nos dois casos, assim como na maior parte dos outros envolvidos no estudo, as translocações produziram a isoforma *PRDM16S*, a qual apresentou comportamento de superexpressão. Nos casos de LMA e SMD, *PRDM16* promoveu translocações com genes como *ETV6*, *RUNX1* e *IKZF1*, os quais também são fatores de transcrição muito influentes na linfopoiese. Além disso, a pesquisa contou com a avaliação de três casos de LLA sem alteração estrutural de *PRDM16*, os quais apresentaram baixos níveis de expressão do gene.

Durante a análise dos níveis de expressão de *PRDM16* em pacientes pediátricos com LLA, identificamos um perfil de superexpressão significativo que ainda não havia sido descrito em estudos anteriores, mesmo nos realizados com tecnologias avançadas e grandes recursos (Li *et al.*, 2018; Schwab *et al.*, 2022; Ryan *et al.*, 2023; Ren *et al.*, 2024). Este achado destaca a singularidade da presente abordagem e a potencial relevância clínica do *PRDM16* na LLA, em especial a LLA-T. Ademais, é válido sugerir que, assim como em outros tumores hematológicos, a superexpressão de *PRDM16* na LLA pediátrica pode estar

condicionada às alterações como translocações e metilação diferencial, aspectos que devem ser investigados no futuro.

Outra descoberta interessante foi a constatação de que os níveis de expressão de *PRDM16* variaram entre os grupos de contagem plaquetária, onde foi possível perceber que a menor média de FC associou-se com casos de trombocitose, apontando uma correlação negativa. Ainda assim, tais casos apresentaram uma expressão de *PRDM16* aumentada em 3,21 vezes. Esse achado pode estar relacionado com as propriedades funcionais da proteína *PRDM16* em contextos de diferenciação de megacariócitos, estresse oxidativo e atividade inflamatória.

Dentro desse contexto, sabe-se que *PRDM16* regula a destinação celular em diversos tecidos humanos, sendo o melhor exemplo aplicável o da transformação de adipócitos, evento tão significativo que faz com que as vias em que a proteína *PRDM16* atua sejam alvo de tratamento para obesidade e diabetes (Jiang *et al.*, 2022). Adotando a mesma lógica, foi demonstrado que a hiperexpressão da oncoproteína *PRDM16S* tem a capacidade de converter o destino celular da linhagem mieloide, de forma a transformar progenitoras destinadas a se diferenciarem em plaquetas e eritrócitos (megacariócitos-eritroides, MEPs) em células tronco leucêmicas granulomonocíticas, induzindo a condições como anemia e plaquetopenia. Entretanto, esse evento pareceu ser condicionado pela interação forçada da proteína com intensificadores, o que promove a ativação de reguladores mestres mieloides, como os fatores de transcrição PU.1 (*Spi-1 proto-oncogene*), C/EBP α e RUNX1; enquanto reprime reguladores do destino megacariocítico, como *GATA1* (*GATA binding protein 1*). Sendo assim, modulações de expressão de *PRDM16* podem alterar vias megacariocíticas, apesar de não ser o suficiente para influenciar tais modificações de forma isolada, necessitando de uma situação favorável de interações gênicas e proteicas (HU *et al.*, 2019).

Em outro cenário, Chuikov *et al.* (2010), ao marcarem a proteína *PRDM16F* *in vivo*, para analisar sua participação da dinâmica celular no ambiente medular, perceberam sua expressão em CTHs fetais e adultas, mas não nas células mieloides e linfoides diferenciadas. Ademais, outras análises demonstraram que a deficiência do gene alterou os padrões de estresse oxidativo das células hematopoiéticas, sugerindo sua atuação na manutenção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Corrigan *et al.* (2018) também chegaram à mesma conclusão uma vez que foi observado o aumento do nível de atividade mitocondrial concomitante à produção de EROs nas CTHs adultas deficientes em *PRDM16F*, envolvendo a

sinalização Rho e Ras GTPase de respiração celular. Além desse achado, foi demonstrado que *PRDM16S* induz uma assinatura inflamatória pela ativação exacerbada de vias imunes que mobilizam mais de 400 genes codificadores de quimiocinas e citocinas, sendo associada à displasia das células hematopoiéticas.

Mesmo em leucemia linfóides, é comum encontrar alterações na linhagem mieloide, uma vez que todo o microambiente medular é afetado pela leucemogênese. Apesar de a plaquetopenia ser o evento mais comum na LLA, como foi observado no presente estudo, casos de trombocitose também são relatados (Blatt; Penchansky; Horn, 1989; Ma *et al.*, 2021; Tsuboi *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2023). A baixa expressão relativa de *PRDM16* nos casos de trombocitose pode apontar para um menor potencial inibitório da proteína na diferenciação de megacariócitos. Entretanto, mesmo em níveis relativamente mais baixos, alterações de expressão de *PRDM16* podem favorecer um panorama de estresse oxidativo e inflamação favorável à leucemia. Diante desse cenário, a produção anormal de plaquetas poderia ser justificada não somente pela própria desregulação da produção dos elementos hematopoiéticos, como também pela tentativa de restabelecimento da homeostase do organismo em resposta à agressividade do processo carcinogênico (Pietraforte *et al.*, 2014; Stockklauser *et al.*, 2021), podendo *PRDM16* contribuir para ambas as perspectivas pontuadas.

Alguns dados apresentaram certa tendência à significância no que diz respeito à comparação de média de FC. *PRDM16* apresentou expressão aumentada em 12,6 vezes em amostras de sangue periférico, enquanto que as amostras de medula óssea obtiveram um aumento de 6,57 vezes. Todavia, considerando que as atividades de *PRDM16* estão localizadas no início da cadeia hematopoiética, sua atuação fisiológica acaba concentrando-se na medula óssea (Aguilo *et al.*, 2011; McGlynn *et al.*, 2020; Gudmundsson *et al.*, 2020). Isso acaba levantando hipóteses sobre a possibilidade de *PRDM16* estar ativo em locais além da medula óssea, o que poderia ser elucidado futuramente através de ensaios comparativos entre amostras pareadas.

Já nos casos de presença de fusão gênica *ETV6::RUNX1* houve um aumento de 4,83 vezes na expressão de *PRDM16*, enquanto que nos casos sem fusão, foi de 12,3 vezes a expressão do gene. Sabe-se que a fusão *ETV6::RUNX1* associa-se e modula diversas modificações genéticas, as quais, ainda assim, conferem um risco padrão e bom prognóstico ao paciente (Barbosa *et al.*, 2015; Ostergaard *et al.*, 2023). Nesse contexto, sugere-se que a

presença dessa fusão pode associar-se à atenuação da alteração de vias que contem com a participação de *PRDM16*, como a TGF- β (Ford *et al.*, 2009). Acredita-se que o aumento do número amostral do presente estudo poderia proporcionar maior esclarecimento acerca dessas relações, confirmando ou refutando tais associações.

Foi importante notar que apesar da maioria dos pacientes apresentarem alta expressão de *PRDM16*, uma pequena parcela (11,25%) demonstrou um comportamento de silenciamento do gene. Apesar de o gene ser alvo de diversos tipos de modificações epigenéticas e pós-traducionais, tais como metilação, ubiquitinação e acetilação, a maioria dos relatos envolvendo tais alterações referem-se à predominância de hiperexpressão da isoforma oncogênica em malignidades hematológicas (Shi *et al.*, 2024). O silenciamento do gene advindo de tais modificações e ligado à contribuição para o processo cancerígeno somente foi apontado em alguns tipos de cânceres sólidos, onde houve regulação negativa da isoforma supressora tumoral PRDM16F (Tan *et al.*, 2014; Kundu *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021; Yin *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2022a; Li *et al.*, 2022a; Hurwitz *et al.*, 2023).

Outra alternativa possível para entender o silenciamento gênico apresentado nesta pesquisa é a deleção de *PRDM16*. O gene é relatado como deletado principalmente em doenças não neoplásicas. A proteína PRDM16 atua tanto no desenvolvimento quanto no funcionamento do tecido maduro cardíaco, principalmente nos cardiomiócitos. Logo, a deficiência dessa proteína pode levar a diversos distúrbios, principalmente à cardiomiopatia de início pediátrico, sendo associada, inclusive, a alterações da proteína SKI (*SKI proto-oncogene*), parceira da PRDM16 na sinalização de TGF- β (Jordan, Zaveri; Scott, 2015). Além disso, é associada também ao aumento de risco de morte, necessidade de transplante cardíaco, assistência ventricular e maior gravidade no sexo feminino (Kramer *et al.*, 2024). Outro tipo de alteração decorrente da deleção de *PRDM16* são as que afetam o sistema ósseo, em especial as que dão origem às fendas palatinas, também pelo impacto da deleção na sinalização TGF- β (Bjork *et al.*, 2010). Essa condição deletéria está dentro de um conjunto de outras deleções no cromossomo 1 chamado de “Síndrome de Deleção 1p36” (Jordan, Zaveri; Scott, 2015).

Na LLA pediátrica, deleções de *PRDM16* foram identificadas por Batista-Gomes *et al.* (2020), em testes de microarray e qPCR, pela primeira vez. Em seus achados, os autores indicaram que deleções do gene (50%) foram associadas com pacientes de alto risco e ausência de fusões gênicas, enquanto que as amplificações (46%) foram relacionadas aos

casos de fusões gênicas. Interessantemente, o presente estudo chegou às mesmas conclusões no que diz respeito aos subtipos moleculares avaliados, uma vez que o silenciamento gênico associou-se à ausência de fusões gênicas, sendo observado apenas um caso de *ETV6::RUNX1* dentre tais pacientes. Pode-se observar também, que a partir dessa associação, os casos de superexpressão de *PRDM16* associaram-se com a presença de fusões gênicas.

Considerando um exemplo prático nesse contexto, é possível perceber que a superexpressão de *PRDM16* é um fator prognóstico bem estabelecido na LMA *de novo* pediátrica, conferindo pior sobrevida global e livre de eventos de maneira independente, quando comparados com casos de baixa expressão ou silenciamento do gene. Além do mais, o aumento de expressão é associado a inúmeras alterações gênicas, principalmente em pacientes com citogenética de risco intermediário ou alto (Shiba *et al.*, 2016; Jo *et al.*, 2015). Dessa forma, as associações encontradas no presente estudo destacam a complexidade da regulação de *PRDM16* na LLA pediátrica e a importância de considerar tanto as expressões aumentadas quanto silenciadas, de forma a contribuir para um entendimento mais profundo da biologia da LLA, o que pode abrir novas vias para futuras pesquisas e desenvolvimento de terapias direcionadas.

Com exceção dos aspectos discutidos anteriormente, os demais agrupamentos de dados clínicos, laboratoriais e moleculares não apontaram diferença significativa entre as médias de FC de *PRDM16*, bem como na análise de expressão e silenciamento do gene. Isso indica que existiu uma expressão igualitária do gene entre as categorias sexo, idade, leucometria, dosagem de hemoglobina e demais fusões gênicas; enquanto que o silenciamento do gene não foi influenciado pela maioria das variáveis analisadas. Desse modo, é possível sugerir que a modulação da expressão de *PRDM16* independe dos aspectos supracitados.

Na análise de curva ROC, foi observado que *PRDM16* não é adequado para o diagnóstico geral de LLA, mas pode ser utilizado para auxiliar a diferenciação de linhagens, já que foi um ótimo discriminante entre os subtipos B e T. Atualmente, os estudos dos subtipos imunofenotípicos em associação aos subtipos moleculares de LLA configuram uma das grandes ferramentas para o manejo de casos de toxicidade, resistência ao tratamento, relapso ou refratariedade, principalmente para populações específicas, como a de LLA-T, a qual conhecidamente apresenta taxas altas de evoluções desfavoráveis (Gavralidis; Brunner, 2020; Carobolante *et al.*, 2020).

Em um recente relatório publicado por Polonen, Mullighan e Teachey (2024), é enfatizada a natureza historicamente escassa da estratificação molecular da LLA-T, que ainda hoje é considerado um desafio para a equipe multidisciplinar oncológica. São recentes as conclusões sobre biomarcadores prognósticos confiáveis que sejam independentes dos fatores de risco específicos desse subtipo, por isso os esforços para determinar as alterações mais relevantes ainda são grandes.

É interessante lembrar que os dois estudos envolvendo LLA-T citados nesta pesquisa (Yoshida *et al.*, 2004; Duhoux *et al.* 2011) encontraram associação da superexpressão de *PRDM16* com mau prognóstico e resultados clínicos ruins; tendência observada em diversos tumores humanos (Shi *et al.*, 2024). Levando em consideração todos os fatos supracitados, é válido elencar *PRDM16* como um candidato a biomarcador para LLA-T pediátrica, o qual pode ser utilizado para uma melhor estratificação e acompanhamento da evolução da doença dos pacientes que detém esse subtipo de leucemia.

Por fim, a maior limitação encontrada neste estudo foi o tamanho amostral, o qual abrangeu um número relativamente pequeno de pacientes com LLA e controles saudáveis. Tal fato pode limitar a generalização dos resultados, evidenciado na análise de curva ROC do presente estudo; e dificultar a detecção de diferenças mais sutis entre os agrupamentos de dados. Ademais, a escassez de estudos prévios que investigaram a relação entre *PRDM16* e LLA culminou na dificuldade de comparação dos presentes achados. Estudos futuros com amostras maiores e mais diversas serão essenciais para reafirmar as descobertas e ampliar o conhecimento sobre o tema.

7. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo ressaltam a importância do gene *PRDM16* na caracterização da LLA, oferecendo novas evidências acerca da heterogeneidade tumoral presente na leucemia pediátrica. *PRDM16* foi superexpresso pela maioria dos pacientes com LLA, apresentando diferentes graus de alteração de acordo com os subtipos e destacando-se como um bom candidato a biomarcador de identificação de linhagem, principalmente no que diz respeito à LLA-T. A expressão variável de *PRDM16* entre os diferentes grupos de contagem de plaquetas na LLA sugere que este gene pode contribuir para a desregulação megacariocítica mesmo em malignidades linfoides, o que pode ser confirmado com estudos posteriores conduzidos com um número maior de pacientes.

Além disso, uma pequena parcela do grupo investigado apresentou o comportamento de silenciamento do gene, o qual foi associado à ausência das alterações genéticas estudadas, levantando hipóteses sobre a complexidade do papel de *PRDM16* na patogênese da LLA, a qual parece abranger mais possibilidades do que previamente entendido. Notavelmente, as demais características clínicas, laboratoriais e moleculares apresentadas pelos pacientes não influenciaram diferencialmente a análise da expressão do gene, demonstrando que tais alterações acontecem de forma independente a esses aspectos.

A busca de biomarcadores para a LLA, assim como o entendimento de sua aplicabilidade clínica, avança concomitantemente com as melhorias de manejo do paciente oncológico pediátrico, contribuindo para o refinamento das alternativas terapêuticas já existentes e para a descoberta de novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, as novas informações acerca do perfil de expressão de *PRDM16* na LLA pediátrica detalhadas na presente pesquisa podem auxiliar tais esforços, com o intuito de popularizar ainda mais a possibilidade de remissão, com tratamentos mais precisos, baseados nas características de cada indivíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILO, F. *et al.* Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 117, n. 19, p. 5057–5066, 12 maio 2011.
- ALAGGIO, R. *et al.* Correction: “The 5th edition of The World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms” **Leukemia**. 2022 Jul;36(7):1720–1748. **Leukemia**, v. 37, n. 9, p. 1944–1951, set. 2023.
- ALBERT, M.; HELIN, K. Histone methyltransferases in cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, The Cellular and Developmental Program Connecting the Centrosome and Cilium and Epigenetics - mechanisms and disease. v. 21, n. 2, p. 209–220, 1 abr. 2010.
- ALEXANDER, T. B. *et al.* The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. **Nature**, v. 562, n. 7727, p. 373–379, out. 2018.
- ALLALI-HASSANI, A. *et al.* Discovery of a chemical probe for PRDM9. **Nature Communications**, v. 10, p. 5759, 17 dez. 2019.
- AMIN, H. M. *et al.* KMT2D preferentially binds mRNAs of the genes it regulates, suggesting a role in RNA processing. **Protein Science : A Publication of the Protein Society**, v. 33, n. 1, p. e4847, 1 jan. 2024.
- ANDERSON, C. A. *et al.* LIM domain proteins in cell mechanobiology. **Cytoskeleton**, v. 78, n. 6, p. 303–311, 2021.
- BARBOSA, T. C. *et al.* Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. **Cancer genetics**, v. 208, n. 10, p. 492-501, 2015.
- BARDELLI, V. *et al.* T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1118, ago. 2021.
- BATISTA-GOMES, J. A. *et al.* Identifying novel genetic alterations in pediatric acute lymphoblastic leukemia based on copy number analysis. **Molecular Cytogenetics**, v. 13, n. 1, p. 25, 26 jun. 2020.
- BENE, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1783–1786, 1 out. 1995.
- BENNETT, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 1976.

BISPO, J. A. B.; PINHEIRO, P. S.; KOBETZ, E. K. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 6, p. a034819, 6 jan. 2020.

BISWAS, Angana *et al.* ETV6 gene aberrations in non-haematological malignancies: A review highlighting ETV6 associated fusion genes in solid tumors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1874, n. 1, p. 188389, 2020.

BJORK, B. C. *et al.* Prdm16 is required for normal palatogenesis in mice. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 5, p. 774-789, 2010.

BLATT, Julie; PENCHANSKY, Lila; HORN, Marianna. Thrombocytosis as a presenting feature of acute lymphoblastic leukemia in childhood. **American journal of hematology**, v. 31, n. 1, p. 46-49, 1989.

BLAZER, L. L. *et al.* PR Domain-containing Protein 7 (PRDM7) Is a Histone 3 Lysine 4 Trimethyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 26, p. 13509–13519, 24 jun. 2016.

BRASIL. **Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012**. Art. III – Dos aspectos éticos da pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília, 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRASIL. **Resolução nº 510, de 07 de abril de 2016**. Conselho Nacional de Saúde - Página Inicial, 2016. Disponível em: <https://conselho.saude.gov.br/Resolucoes/2016/Reso510.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2023.

BRIX, D. M.; BUNDGAARD CLEMMENSEN, K. K.; KALLUNKI, T. Zinc Finger Transcription Factor MZF1—A Specific Regulator of Cancer Invasion. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 223, jan. 2020.

BU, S. *et al.* Zinc Finger Proteins in Neuro-Related Diseases Progression. **Frontiers in Neuroscience**, v. 15, 18 nov. 2021.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009.

BYLINO, O. V.; IBRAGIMOV, A. N.; SHIDLOVSKII, Y. V. Evolution of Regulated Transcription. **Cells**, v. 9, n. 7, p. 1675, 12 jul. 2020.

CABRAL, Y. DOS S. História do diagnóstico laboratorial e das classificações das leucemias agudas pediátricas. 29 set. 2023.

CAROBOLANTE, F. *et al.* Practical guidance for the management of acute lymphoblastic leukemia in the adolescent and young adult population. **Therapeutic Advances in Hematology**, v. 11, p. 2040620720903531, 2020.

CARVALHO, D. *et al.* Association between the TPMT* 3C (rs1142345) polymorphism and the risk of death in the treatment of acute lymphoblastic leukemia in children from the Brazilian Amazon Region. **Genes**, v. 11, n. 10, p. 1132, 2020.

CARROLL, D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. **Genetics**, v. 188, n. 4, p. 773–782, ago. 2011.

CASAMASSIMI, A. *et al.* Multifaceted Role of PRDM Proteins in Human Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2648, 10 abr. 2020.

CASSANDRI, M. *et al.* Zinc-finger proteins in health and disease. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, p. 1–12, 13 nov. 2017.

CHE, J. L. C. *et al.* Identification and characterization of in vitro expanded hematopoietic stem cells. **EMBO reports**, v. 23, n. 10, p. e55502, 6 out. 2022.

CHEN, M. *et al.* A20 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting NF- κ B activation and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. **Experimental Cell Research**, v. 390, n. 2, p. 111982, 15 maio 2020.

CHEN, Z. *et al.* PRDM8 exhibits antitumor activities toward hepatocellular carcinoma by targeting NAP1L1. **Hepatology**, v. 68, n. 3, p. 994–1009, 2018.

CHENG, H.-Y. *et al.* DNA methylation and carcinogenesis of PRDM5 in cervical cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 12, p. 1821–1825, dez. 2010.

CHIOU, S.-H. *et al.* BLIMP1 Induces Transient Metastatic Heterogeneity in Pancreatic Cancer. **Cancer Discovery**, v. 7, n. 10, p. 1184–1199, 2 out. 2017.

CHUIKOV, S. *et al.* Prdm16 promotes stem cell maintenance in multiple tissues, partly by regulating oxidative stress. **Nature cell biology**, v. 12, n. 10, p. 999–1006, 2010.

CLARKE, R. T. *et al.* Clinical presentation of childhood leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Archives of Disease in Childhood**, v. 101, n. 10, p. 894–901, 1 out. 2016.

CLIFTON, M. K. *et al.* The identification and structure of an N-terminal PR domain show that FOG1 is a member of the PRDM family of proteins. **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e106011, 2014.

CORRIGAN, D. J. *et al.* PRDM16 isoforms differentially regulate normal and leukemic hematopoiesis and inflammatory gene signature. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, p. 3250–3264, 1 ago. 2018.

COSTA, E. DE B. O.; PACHECO, C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 125–136, 24 dez. 2013.

CURRY, E. *et al.* Dual EZH2 and EHMT2 histone methyltransferase inhibition increases biological efficacy in breast cancer cells. **Clinical Epigenetics**, v. 7, n. 1, p. 84, 2015.

DAHER, M.-T. *et al.* Bcl11b/Ctip2 in Skin, Tooth, and Craniofacial System. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 581674, 10 dez. 2020.

DAO, F.-T. *et al.* High PRDM16 expression predicts poor outcomes in adult acute myeloid leukemia patients with intermediate cytogenetic risk: a comprehensive cohort study from a single Chinese center. **Leukemia & Lymphoma**, v. 62, n. 1, p. 185–193, 2 jan. 2021.

DATASUS. Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde. **Painel de monitoramento de tratamento oncológico: painel-oncologia**. Disponível em: http://tabnet.data.sus.gov.br>painel_oncologia. 2023. Acesso em: 13 jan. 2024.

DI DONATO, M. *et al.* RIZ2 at the crossroad of the EGF/EGFR signaling in colorectal cancer. **Journal of Translational Medicine**, v. 21, p. 736, 18 out. 2023.

DI TULLIO, F. *et al.* The duality of PRDM proteins: epigenetic and structural perspectives. **The FEBS Journal**, v. 289, n. 5, p. 1256–1275, 2022.

DI ZAZZO, E. *et al.* PRDM Proteins: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Transcriptional Regulation. **Biology**, v. 2, n. 1, p. 107–141, mar. 2013.

DI ZAZZO, E. *et al.* Critical Function of PRDM2 in the Neoplastic Growth of Testicular Germ Cell Tumors. **Biology**, v. 5, n. 4, p. 54, 14 dez. 2016.

DJEBALI, S. *et al.* Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101–108, 6 set. 2012.

DU, M. *et al.* The Global Burden of Leukemia and Its Attributable Factors in 204 Countries and Territories: Findings from the Global Burden of Disease 2019 Study and Projections to 2030. **Journal of Oncology**, v. 2022, p. e1612702, 25 abr. 2022.

DUFFIELD, A. S.; MULLIGHAN, C. G.; BOROWITZ, M. J. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. **Virchows Archiv**, v. 482, n. 1, p. 11–26, 1 jan. 2023.

DUHOUX, F. P. *et al.* PRDM16 (1p36) translocations define a distinct entity of myeloid malignancies with poor prognosis but may also occur in lymphoid malignancies. **British Journal of Haematology**, v. 156, n. 1, p. 76–88, 2012.

DUNCAVAGE, E. J. *et al.* Genomic profiling for clinical decision making in myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 140, n. 21, p. 2228–2247, 24 nov. 2022.

EL-MELIGUI, Y. M. *et al.* Impact of HOXB4 and PRDM16 Gene Expressions on Prognosis and Treatment Response in Acute Myeloid Leukemia Patients. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 15, p. 663–674, 2022.

ERAM, M. S. *et al.* Trimethylation of histone H3 lysine 36 by human methyltransferase PRDM9 protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 12177–12188, 25 abr. 2014.

FEDOTOVA, A. A. *et al.* C2H2 Zinc Finger Proteins: The Largest but Poorly Explored Family of Higher Eukaryotic Transcription Factors. **Acta Naturae**, v. 9, n. 2, p. 47–58, 2017.

FERLAY J *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Today**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024. Available from: <https://gco.iarc.who.int/today> Acesso em: 13 jan. 2024.

FOG, C. K. *et al.* Loss of PRDM11 promotes MYC-driven lymphomagenesis. **Blood**, v. 125, n. 8, p. 1272–1281, 19 fev. 2015.

FOG, C. K.; GALLI, G. G.; LUND, A. H. PRDM proteins: important players in differentiation and disease. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 34, n. 1, p. 50–60, jan. 2012.

FORD, A. M. *et al.* The TEL-AML1 leukemia fusion gene dysregulates the TGF- β pathway in early B lineage progenitor cells. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 4, p. 826–836, 2009.

FUMASONI, I. *et al.* Family expansion and gene rearrangements contributed to the functional specialization of PRDM genes in vertebrates. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 187, 4 out. 2007.

FURNESS, C. L. *et al.* The subclonal complexity of STIL-TAL1+ T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia**, v. 32, n. 9, p. 1984–1993, set. 2018.

GALLI, G. G. *et al.* Prdm5 suppresses Apc(Min)-driven intestinal adenomas and regulates monoacylglycerol lipase expression. **Oncogene**, v. 33, n. 25, p. 3342–3350, 19 jun. 2014.

GAURAV, N.; KUTATELADZE, T. G. Non-histone binding functions of PHD fingers. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 48, n. 7, p. 610–617, 1 jul. 2023.

GAVRALIDIS, Alexander; BRUNNER, Andrew M. Novel therapies in the treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. **Current hematologic malignancy reports**, v. 15, p. 294–304, 2020.

GOODE, T. *et al.* Nested RT-PCR. Em: O'CONNELL, J. (Ed.). **RT-PCR Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. p. 65–79.

GRAY, K. A. *et al.* Genenames.org: the HGNC resources in 2015. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. Database issue, p. D1079–D1085, 28 jan. 2015.

GU, Z. *et al.* PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. **Nature Genetics**, v. 51, n. 2, p. 296–307, fev. 2019.

GUDMUNDSSON, Kristbjorn O. *et al.* Prdm16 is a critical regulator of adult long-term hematopoietic stem cell quiescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 50, p. 31945–31953, 2020.

GUO, Q. *et al.* Structural insights into SETD3-mediated histidine methylation on β -actin. **eLife**, v. 8, p. e43676, 20 fev. 2019.

HAN, B. Y. *et al.* Global translation during early development depends on the essential transcription factor PRDM10. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3603, 17 jul. 2020.

HAN, G. *et al.* RING Zinc Finger Proteins in Plant Abiotic Stress Tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, 14 abr. 2022.

HAN, Y.; LIN, Q. [Research Progress of PR Domain Zinc Finger Protein 14]. **Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer**, v. 19, n. 2, p. 93–97, fev. 2016.

HARRIS, M. H. *et al.* Genetic Testing in the Diagnosis and Biology of Acute Leukemia: 2017 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology Workshop Report. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 152, n. 3, p. 322–346, 1 ago. 2019.

HNISZ, Denes *et al.* Activation of proto-oncogenes by disruption of chromosome neighborhoods. **Science**, v. 351, n. 6280, p. 1454–1458, 2016.

HOHENAUER, T.; MOORE, A. W. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. **Development**, v. 139, n. 13, p. 2267–2282, 1 jul. 2012.

HOULE, A. A. *et al.* Aberrant PRDM9 expression impacts the pan-cancer genomic landscape. **Genome Research**, v. 28, n. 11, p. 1611–1620, nov. 2018.

HU, T. *et al.* PRDM16s transforms megakaryocyte-erythroid progenitors into myeloid leukemia-initiating cells. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 134, n. 7, p. 614-625, 2019.

HUANG, S.; SHAO, G.; LIU, L. The PR domain of the Rb-binding zinc finger protein RIZ1 is a protein binding interface and is related to the SET domain functioning in chromatin-mediated gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 26, p. 15933–15939, 26 jun. 1998.

HUNG, Y.-H. *et al.* Chromatin Remodeling-Related PRDM1 Increases Stomach Cancer Proliferation and Is Counteracted by Bromodomain Inhibitor. **Journal of Personalized Medicine**, v. 14, n. 3, p. 224, mar. 2024.

HURWITZ, E. *et al.* Antagonism between Prdm16 and Smad4 specifies the trajectory and progression of pancreatic cancer. **The Journal of Cell Biology**, v. 222, n. 4, p. e202203036, 3 abr. 2023.

HUSSIN, J. *et al.* Rare allelic forms of PRDM9 associated with childhood leukemogenesis. **Genome Research**, v. 23, n. 3, p. 419–430, mar. 2013.

INABA, H.; MULLIGHAN, C. G. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 105, n. 11, p. 2524–2539, 10 set. 2020.

INABA, H.; PUI, C.-H. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 9, p. 1926, jan. 2021.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2024.

IVANOV, A. V. *et al.* Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia Emerging Therapies—From Pathway to Target. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4661, jan. 2023.

IWANAGA, R. *et al.* Loss of prdm1a accelerates melanoma onset and progression. **Molecular Carcinogenesis**, v. 59, n. 9, p. 1052–1063, 2020.

JAIME-PÉREZ, J. C. *et al.* Revisiting the complete blood count and clinical findings at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukemia: 10-year experience at a single center. **Hematology, transfusion and cell therapy**, v. 41, n. 1, p. 57-61, 2019.

JANNA, A. *et al.* Structural Paradigms in the Recognition of the Nucleosome Core Particle by Histone Lysine Methyltransferases. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 600, 31 jul. 2020.

JANA, Swadhin Chandra. Centrosome structure and biogenesis: Variations on a theme?. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, p. 123-138, 2021.

JEN, J.; WANG, Y.-C. Zinc finger proteins in cancer progression. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 1, p. 53, 13 jul. 2016.

JIANG, N. *et al.* PRDM16 regulating adipocyte transformation and thermogenesis: a promising therapeutic target for obesity and diabetes. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 870250, 2022.

JO, A. *et al.* High expression of EVI1 and MEL1 is a compelling poor prognostic marker of pediatric AML. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 1076-1083, 2015.

JORDAN, Valerie K.; ZAVERI, Hitisha P.; SCOTT, Daryl A. 1p36 deletion syndrome: an update. **The application of clinical genetics**, p. 189-200, 2015.

JULIUSSON, G.; HOUGH, R. Leukemia. **Progress in Tumor Research**, v. 43, p. 87–100, 2016.

KABURAGI, T. *et al.* UBTF-internal tandem duplication as a novel poor prognostic factor in pediatric acute myeloid leukemia. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 62, n. 4, p. 202–209, 2023.

KHALID, A. *et al.* Biochemical and Hematologic profiles in B-Cell acute lymphoblastic leukemia children. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 45, n. 7, p. e867-e872, 2023.

KIM, E. *et al.* Zinc finger protein 251 deficiency impairs glucose metabolism by inducing adipocyte hypertrophy. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 562, p. 111838, 15 fev. 2023.

KIM, J.; MOON, Y. Mucosal ribosomal stress-induced PRDM1 promotes chemoresistance via stemness regulation. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–14, 10 maio 2021.

KIM, K.-C.; GENG, L.; HUANG, S. Inactivation of a histone methyltransferase by mutations in human cancers. **Cancer Research**, v. 63, n. 22, p. 7619–7623, 15 nov. 2003.

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

KOMOROWSKI, Lukasz *et al.* Philadelphia chromosome-positive leukemia in the lymphoid lineage—similarities and differences with the myeloid lineage and specific vulnerabilities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 16, p. 5776, 2020.

KOPP, F.; MENDELL, J. T. Functional classification and experimental dissection of long noncoding RNAs. **Cell**, v. 172, n. 3, p. 393–407, 25 jan. 2018.

KORYAKOV, D. E. Diversity and functional specialization of H3K9-specific histone methyltransferases. **BioEssays**, v. 46, n. 2, p. 2300163, 2024.

KRAMER, R. J. *et al.* PRDM16 deletion is associated with sex-dependent cardiomyopathy and cardiac mortality: a translational, multi-institutional cohort study. **Circulation: Genomic and Precision Medicine**, v. 16, n. 4, p. 390–400, 2023.

KÜHNISCH, J. *et al.* Prdm16 mutation determines sex-specific cardiac metabolism and identifies two novel cardiac metabolic regulators. **Cardiovascular Research**, v. 119, n. 18, p. 2902–2916, 16 out. 2023.

KUNDU, A. *et al.* PRDM16 suppresses HIF-targeted gene expression in kidney cancer. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 6, p. e20191005, 1 jun. 2020.

LEAHY, A. B. *et al.* Impact of high-risk cytogenetics on outcomes for children and young adults receiving CD19-directed CAR T-cell therapy. **Blood**, v. 139, n. 14, p. 2173–2185, 7 abr. 2022.

LEAK, Steven; HORNE, Gillian A.; COPLAND, Mhairi. Targeting BCR-ABL1-positive leukaemias: A review article. **Cambridge Prisms: Precision Medicine**, v. 1, p. e21, 2023.

LEE, Yu-Ling *et al.* Mediator subunit MED1 is required for E2A-PBX1-mediated oncogenic transcription and leukemic cell growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 6, p. e1922864118, 2021.

LEITE, M. L. *et al.* Epigenômica, epigenética e câncer. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 8, n. 4, p. 23–25, dez. 2017.

LEJMAN, M. *et al.* Genetic Biomarkers and Their Clinical Implications in B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 5, p. 2755, 2 mar. 2022.

LESZCZYŃSKI, P. *et al.* Emerging Roles of PRDM Factors in Stem Cells and Neuronal System: Cofactor Dependent Regulation of PRDM3/16 and FOG1/2 (Novel PRDM Factors). **Cells**, v. 9, n. 12, p. 2603, 4 dez. 2020.

LI, D. *et al.* Small molecules targeting selected histone methyltransferases (HMTs) for cancer treatment: Current progress and novel strategies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 264, p. 115982, 15 jan. 2024.

LI, F. *et al.* Epigenetic interaction between UTX and DNMT1 regulates diet-induced myogenic remodeling in brown fat. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6838, 25 nov. 2021.

LI, J. *et al.* Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 50, p. E11711-E11720, 2018.

LI, M. *et al.* MECOM/PRDM3 and PRDM16 Serve as Prognostic-Related Biomarkers and Are Correlated with Immune Cell Infiltration in Lung Adenocarcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 12, p. 772686, 2022a.

LI, X. *et al.* Structures and biological functions of zinc finger proteins and their roles in hepatocellular carcinoma. **Biomarker Research**, v. 10, n. 1, p. 2, 9 jan. 2022b.

LI, Y. *et al.* The engagement of histone lysine methyltransferases with nucleosomes: structural basis, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. **Protein & Cell**, v. 14, n. 3, p. 165–179, 27 jul. 2022c.

LIN, J. *et al.* Follicular dendritic cell-induced microRNA-mediated upregulation of PRDM1 and downregulation of BCL-6 in non-Hodgkin's B-cell lymphomas. **Leukemia**, v. 25, n. 1, p. 145–152, jan. 2011.

LIU, C. *et al.* PRDM1 silences stem cell-related genes and inhibits proliferation of human colon tumor organoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 22, p. E5066–E5075, 29 maio 2018a.

LIU, J. *et al.* JAK3/STAT3 oncogenic pathway and PRDM1 expression stratify clinicopathologic features of extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. **Oncology Reports**, v. 41, n. 6, p. 3219–3232, jun. 2019.

LIU, J.; ZHANG, H. Zinc Finger and BTB Domain-Containing 20: A Newly Emerging Player in Pathogenesis and Development of Human Cancers. **Biomolecules**, v. 14, n. 2, p. 192, fev. 2024.

LIU, L. *et al.* The chromatin remodeling subunit Baf200 promotes normal hematopoiesis and inhibits leukemogenesis. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 27, 26 fev. 2018b.

LIU, W.-L. *et al.* PRDM16 Inhibits Cell Proliferation and Migration via Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Directly Targeting Pyruvate Carboxylase in Papillary Thyroid Cancer. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 723777, 2021.

LIU, Y.-F. *et al.* Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **eBioMedicine**, v. 8, p. 173–183, 1 jun. 2016.

- LIU, Y.-Y. *et al.* Zinc finger and BTB domain-containing protein 46 is essential for survival and proliferation of acute myeloid leukemia cell line but dispensable for normal hematopoiesis. **Chinese Medical Journal**, v. 133, n. 14, p. 1688–1695, 20 jul. 2020.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Análise de dados relativos de expressão gênica usando PCR quantitativo em tempo real e o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- LUCHSINGER, L. L. *et al.* Mitofusin 2 maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential. **Nature**, v. 529, n. 7587, p. 528–531, 2016.
- MA, J. *et al.* Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in a case of MPL p.(W515L) variant essential thrombocythemia: case report and literature review. **Platelets**, v. 33, n. 6, p. 945–950, 2021.
- MA, Q.-X. *et al.* BCAA-BCKA axis regulates WAT browning through acetylation of PRDM16. **Nature Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 106–122, jan. 2022.
- MALARD, Florent; MOHTY, Mohamad. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v. 395, n. 10230, p. 1146–1162, 2020.
- MALLICK, Debjani *et al.* The Prognostic Significance of HbF in Childhood Haematological Malignancies. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 31, p. 116–120, 2015.
- MARCOTTE, E. L. *et al.* The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. **Frontiers in Pediatrics**, v. 9, 23 abr. 2021.
- MARTINS, K. A. M. *et al.* Epidemiologia da leucemia no estado de São Paulo: análises de internação e mortalidade nos anos de 2016 e 2022. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 45, p. S993–S994, 2023. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, HEMO 2023. v. 45, p. S993, 1 out. 2023.
- MATSUO, H. *et al.* The subtype-specific features of EVI1 and PRDM16 in acute myeloid leukemia. **Haematologica**, v. 100, n. 3, p. e116–e117, mar. 2015.
- MATA-ROCHA, M. *et al.* Low prevalence of ETV6:: RUNX1 fusion gene in a hispanic population. **Frontiers in Pediatrics**, v. 10, p. 837656, 2022.
- MCGLYNN, K. A. *et al.* *Prdm3* e *Prdm16* mantêm cooperativamente a hematopoiese e o potencial clonogênico. **Experimental Hematology**, v. 85, p. 20–32.e3, 1 maio 2020.
- MEVEL, Renaud *et al.* RUNX1 dosage in development and cancer. **Molecules and cells**, v. 43, n. 2, p. 126–138, 2020.

MEYER, C. *et al.* The KMT2A recombino^me of acute leukemias in 2023. **Leukemia**, v. 37, n. 5, p. 988–1005, 2023.

MIDDLETON, A. J. *et al.* Zinc finger 1 of the RING E3 ligase, RNF125, interacts with the E2 to enhance ubiquitylation. **Structure**, v. 31, n. 10, p. 1208- 1219.e5, 5 out. 2023.

MIRANDA-FILHO, A. *et al.* Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. **The Lancet Haematology**, v. 5, n. 1, p. e14–e24, 1 jan. 2018.

MIYAMURA, T. *et al.* Clinical and biological features of paediatric acute myeloid leukaemia (AML) with primary induction failure in the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML-05 study. **British Journal of Haematology**, v. 185, n. 2, p. 284–288, 2019.

MIYAZAKI, Kazuko *et al.* The transcription factor E2A activates multiple enhancers that drive Rag expression in developing T and B cells. **Science Immunology**, v. 5, n. 51, p. eabb1455, 2020.

MOCHIZUKI, N. *et al.* A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3209–3214, 1 nov. 2000.

MOISON, C. *et al.* Zinc finger protein E4F1 cooperates with PARP-1 and BRG1 to promote DNA double-strand break repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 11, p. e2019408118, 16 mar. 2021.

MOLINA, O. *et al.* Aneuploidy in Cancer: Lessons from Acute Lymphoblastic Leukemia. **Trends in Cancer**, v. 7, n. 1, p. 37–47, 1 jan. 2021.

MOORMAN, A. V. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. **Blood Reviews**, v. 26, n. 3, p. 123–135, 1 maio 2012.

MOORMAN, A. V. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**, v. 101, n. 4, p. 407–416, abr. 2016.

MOREIRA-NUNES, C. A. *et al.* Targeting aurora kinases as a potential prognostic and therapeutical biomarkers in pediatric acute lymphoblastic leukaemia. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 21272, 2020.

MZOUGH, S. *et al.* The role of PRDMs in cancer: one family, two sides. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 36, p. 83–91, fev. 2016.

MZOUGH, S. *et al.* PRDM15 is a key regulator of metabolism critical to sustain B-cell lymphomagenesis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 3520, 14 jul. 2020.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **PRDM16 PR/SET domain 16 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/63976> Acesso em: 13 jan. 2024.

NGWA, C. J.; FARRUKH, A.; PRADEL, G. Zinc finger proteins of *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology**, v. 23, n. 12, p. e13387, 2021.

NISHIKATA, I. et al. A novel EVI1 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3323–3332, 1 nov. 2003.

NISHIKATA, I. et al. Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. **Oncogene**, v. 30, n. 40, p. 4194–4207, 6 out. 2011.

NISHIKAWA, N. et al. Gene Amplification and Overexpression of PRDM14 in Breast Cancers. **Cancer Research**, v. 67, n. 20, p. 9649–9657, 17 out. 2007.

NPO - Núcleo de Pesquisas em Oncologia. **Apresentação NPO**. Disponível em: <https://www.npo.ufpa.br/index.php> Acesso em: 11 jan. 2024.

ONUFRIEV, A. V.; SCHIESSEL, H. The nucleosome: from structure to function through physics. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 56, p. 119–130, jun. 2019.

ØSTERGAARD, A. et al. The prognostic effect of IKZF1 deletions in ETV6::RUNX1 and high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. **Hemasphere**, v. 7, n. 5, p. e875, 2023.

OU, M.; LI, S.; TANG, L. PRDM14: A Potential Target for Cancer Therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 10, p. 945–956, 2018.

PACCA, R. et al. Avaliação de viabilidade de detecção de DRM em LLA-B por citometria de fluxo multiparamétrica independente de CD19. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, HEMO 2023. v. 45, p. S257–S258, 1 out. 2023.

PANUCIAK, K. et al. Overview on Aneuploidy in Childhood B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 10, p. 8764, jan. 2023.

PAUL, S.; KANTARJIAN, H.; JABBOUR, E. J. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 91, n. 11, p. 1645–1666, 1 nov. 2016.

PESSOA, F. M. C. DE P. et al. Validation of Endogenous Control Genes by Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction for Acute Leukemia Gene Expression Studies. **Genes**, v. 15, n. 2, p. 151, fev. 2024.

PIETERS, R.; MULLIGHAN, C. G.; HUNGER, S. P. Advancing Diagnostics and Therapy to Reach Universal Cure in Childhood ALL. **Journal of Clinical Oncology**, v. 41, n. 36, p. 5579–5591, 20 dez. 2023.

PIETRAFORTE, D. *et al.* Redox control of platelet functions in physiology and pathophysiology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 177-193, 2014.

PINHEIRO, I. *et al.* Prdm3 and Prdm16 are H3K9me1 Methyltransferases Required for Mammalian Heterochromatin Integrity. **Cell**, v. 150, n. 5, p. 948–960, 31 ago. 2012.

PISANO, M. PRDM16 in Development and Disease. **Human Genetics & Embryology**, v. 04, n. 01, 2014.

PÖLÖNEN, Petri; MULLIGHAN, Charles G.; TEACHEY, David Trent. Classification and risk stratification in T-lineage acute lymphoblastic leukemia. **Blood Journal**, p. blood. 2023022920, 2024.

RAKHRA, G.; RAKHRA, G. Zinc finger proteins: insights into the transcriptional and post transcriptional regulation of immune response. **Molecular Biology Reports**, v. 48, n. 7, p. 5735–5743, 1 jul. 2021.

REN, Y. *et al.* Key candidate genes and pathways in T lymphoblastic leukemia/lymphoma identified by bioinformatics and serological analyses. **Frontiers in Immunology**, v. 15, p. 1341255, 2024.

RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 12, p. a008250, 12 jan. 2012.

RIENZO, M. *et al.* PRDM12 in Health and Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 12030, 6 nov. 2021.

RIETHER, C.; SCHÜRCH, C. M.; OCHSENBEIN, A. F. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 187–198, fev. 2015.

ROCHA, M. M. *et al.* FLEXIBILITY OF FISH PROBES IN MONITORING IAMP21 ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA: STUDY OF FOUR BRAZILIAN CHILDREN. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 44, p. S343-S344, 2022.

ROCHE-LESTIENNE, C. *et al.* RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 7, p. 3735-3741, 2008.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G. *et al.* The Second Oncogenic Hit Determines the Cell Fate of ETV6-RUNX1 Positive Leukemia. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 15 jul. 2021.

RYAN, S. L. *et al.* Whole genome sequencing provides comprehensive genetic testing in childhood B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Leukemia**, v. 37, n. 3, p. 518-528, 2023.

SANDA, Takaomi *et al.* Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer cell**, v. 22, n. 2, p. 209-221, 2012.

SANTOS, M. DE O. *et al.* Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 69, n. 1, p. e-213700, 6 fev. 2023.

SAWESI, S. *et al.* Modulation of the activity of histone lysine methyltransferases and demethylases by curcumin analog in leukaemia cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 26, n. 22, p. 5624–5633, nov. 2022.

SCHMIDT, J.-A. *et al.* Risk Factors for Childhood Leukemia: Radiation and Beyond. **Frontiers in Public Health**, v. 9, 24 dez. 2021.

SCHUBERT, H. L.; BLUMENTHAL, R. M.; CHENG, X. Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. **Trends in biochemical sciences**, v. 28, n. 6, p. 329–335, jun. 2003.

SCHWAB, C. *et al.* Integrative genomic analysis of childhood acute lymphoblastic leukaemia lacking a genetic biomarker in the UKALL2003 clinical trial. **Leukemia**, v. 37, n. 3, p. 529-538, 2023.

SCIORTINO, M. *et al.* Dysregulation of Blimp1 transcriptional repressor unleashes p130Cas/ErbB2 breast cancer invasion. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1145, 25 abr. 2017.

SESPA - Secretaria de Saúde Pública. **Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo – SESPA**. 2021. Disponível em: <http://www.saude.pa.gov.br/a-secretaria/rede-de-atendimento-sob-gestao-das-oss/hospital-oncologico-infantil-octavio-lobo/> Acesso em: 10 nov. 2023.

SECOM - Secretaria de Comunicação. **Hospital Oncológico Infantil Octávio Lobo celebra sete anos de serviços de saúde**. 2022. Disponível em: <https://www.agenciapara.com.br/noticia/38651/hospital-oncologico-infantil-octavio-lobo-celebra-sete-anos-de-servicos-de-saude#:~:text=Com%2089%20leitos%2C%20a%20unidade> Acesso em: 10 nov. 2023.

SHI, Q. *et al.* Genomic alterations and evolution of cell clusters in metastatic invasive micropapillary carcinoma of the breast. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 111, 10 jan. 2022a.

SHI, Y. *et al.* Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 200, 25 jun. 2022b.

SHI, Q. *et al.* Unravelling the function of prdm16 in human tumours: A comparative analysis of haematologic and solid tumours. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 178, p. 117281, 2024.

SHIBA, N. *et al.* High PRDM 16 expression identifies a prognostic subgroup of pediatric acute myeloid leukaemia correlated to FLT 3- ITD, KMT 2A- PTD, and NUP 98- NSD 1: the results of the Japanese Paediatric Leukaemia/Lymphoma Study Group AML- 05 trial. **British journal of haematology**, v. 172, n. 4, p. 581-591, 2016.

SHIBA, N. *et al.* Transcriptome analysis offers a comprehensive illustration of the genetic background of pediatric acute myeloid leukemia. **Blood advances**, v. 3, n. 20, p. 3157-3169, 2019.

SHING, D. C. *et al.* Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 12, p. 3696–3707, dez. 2007.

SHU, X. *et al.* The epigenetic modifier PRDM5 functions as a tumor suppressor through modulating WNT/ β -catenin signaling and is frequently silenced in multiple tumors. **PloS One**, v. 6, n. 11, p. e27346, 2011.

SHULL, L. C. *et al.* The conserved and divergent roles of Prdm3 and Prdm16 in zebrafish and mouse craniofacial development. **Developmental Biology**, v. 461, n. 2, p. 132–144, 15 maio 2020.

SHULL, L. C. *et al.* PRDM paralogs antagonistically balance Wnt/ β -catenin activity during craniofacial chondrocyte differentiation. **Development (Cambridge, England)**, v. 149, n. 4, p. dev200082, 15 fev. 2022.

SINGH, A. *et al.* Clinical findings and hematological parameters in cases of acute lymphoblastic leukemia with thrombocytosis at initial diagnosis. **Journal of Medicine in Scientific Research**, v. 6, n. 1, p. 4, 2023.

SINGH, J. K.; VAN ATTIKUM, H. DNA double-strand break repair: Putting zinc fingers on the sore spot. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Genome stability. v. 113, p. 65–74, 1 maio 2021.

SMITH, M. *et al.* Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 18–24, jan. 1996.

SORRENTINO, A. *et al.* PR/SET Domain Family and Cancer: Novel Insights from the Cancer Genome Atlas. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 10, p. 3250, 19 out. 2018.

SOUZA, G. L. *et al.* FREQUÊNCIA DAS TRANSLOCAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOIDE E MIELOIDE AGUDA EM UM CENTRO DE REFERÊNCIA DA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 45, p. S248, 2023.

SOUZA, T. P. *et al.* Influence of variants of the drosha, mir499a, and mir938 genes on susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in an admixed population from the brazilian amazon. **American Journal of Translational Research**, v. 12, n. 12, p. 8216, 2020.

STOCKKLAUSNER, C. *et al.* Thrombocytosis in children and adolescents—classification, diagnostic approach, and clinical management. **Annals of hematology**, v. 100, p. 1647-1665, 2021.

SUN, Q.; HUANG, M.; WEI, Y. Diversity of the reaction mechanisms of SAM-dependent enzymes. **Acta Pharmaceutica Sinica. B**, v. 11, n. 3, p. 632–650, mar. 2021.

SUNDARESH, Aishwarya; WILLIAMS, Owen. Mechanism of ETV6-RUNX1 leukemia. **RUNX Proteins in Development and Cancer**, p. 201-216, 2017.

SWAMYNATHAN, S. K. Krüppel-like factors: Three fingers in control. **Human Genomics**, v. 4, n. 4, p. 263–270, 1 abr. 2010.

SYBIRNA, A.; WONG, F. C. K.; SURANI, M. A. Genetic basis for primordial germ cells specification in mouse and human: Conserved and divergent roles of PRDM and SOX transcription factors. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 135, p. 35–89, 2019.

TAKAHATA, M. *et al.* SKI and MEL1 Cooperate to Inhibit Transforming Growth Factor- β Signal in Gastric Cancer Cells *. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 5, p. 3334–3344, 30 jan. 2009.

TAMMEN, S. A.; FRISO, S.; CHOI, S.-W. Epigenetics: the link between nature and nurture. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 4, p. 753–764, 2013.

TAN, S.-X. *et al.* Methylation of PRDM2, PRDM5 and PRDM16 genes in lung cancer cells. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 7, n. 5, p. 2305–2311, 15 abr. 2014.

TAN, Z. *et al.* An update on allosteric modulators as a promising strategy targeting histone methyltransferase. **Pharmacological Research**, v. 172, p. 105865, 1 out. 2021.

TEBBI, C. K. Etiology of Acute Leukemia: A Review. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2256, jan. 2021.

TEIXEIRA, E. B. *et al.* EndoGeneAnalyzer: A tool for selection and validation of reference genes. **Plos one**, v. 19, n. 4, p. e0299993, 2024.

THOMPSON, M. *et al.* PRDM16 regulates arterial development and vascular integrity. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1165379, 2023.

TSUBOI, Y. *et al.* Triple-negative Thrombocythemia and Subsequent Acute Lymphoblastic Leukemia with Additional Somatic Mutations. **Internal Medicine**, v. 62, n. 10, p. 1527-1530, 2023.

UFPA - Universidade Federal do Pará. **Núcleo de Pesquisas em Oncologia**. Disponível em: <https://ufpa.br/orgaos/nucleo-de-pesquisas-em-oncologia/> Acesso em: 11 jan. 2024.

UniProt. **Q9HAZ2-PRD16_HUMAN**. Disponível em: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9HAZ2/feature-viewer> Acesso em: 13 jan. 2024.
VAN DONGEN, J. J. M. *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. **Leukemia**, v. 13, n. 12, p. 1901–1928, dez. 1999.

VERVOORT, M. *et al.* Evolution of Prdm Genes in Animals: Insights from Comparative Genomics. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 3, p. 679–696, mar. 2016.

VIEIRA, T. M. F. Anormalidades genéticas e de metilação de DNA em uma coorte de leucemia linfoblástica aguda pediátrica com alterações no cromossomo 21. 2017.

VIJAYAKRISHNAN, J. *et al.* Identification of four novel associations for B-cell acute lymphoblastic leukaemia risk. **Nature Communications**, v. 10, p. 5348, 25 nov. 2019.

WANG, H. *et al.* Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 92, 1 mar. 2023.

WANG, X. *et al.* PRDM1 is directly targeted by miR-30a-5p and modulates the Wnt/ β -catenin pathway in a Dkk1-dependent manner during glioma growth. **Cancer Letters**, v. 331, n. 2, p. 211–219, 1 maio 2013.

WATANABE, H. *et al.* Dereglulation of histone lysine methyltransferases contributes to oncogenic transformation of human bronchoepithelial cells. **Cancer Cell International**, v. 8, p. 15, 3 nov. 2008.

WATANABE, Y. *et al.* PRDM5 Identified as a Target of Epigenetic Silencing in Colorectal and Gastric Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4786–4794, 15 ago. 2007.

WEI, X.; ZHANG, H. Four and a half LIM domains protein 1 can be as a double-edged sword in cancer progression. **Cancer Biology & Medicine**, v. 17, n. 2, p. 270–281, 15 maio 2020.

WHITELEY, A. E. *et al.* Leukaemia: a model metastatic disease. **Nature reviews. Cancer**, v. 21, n. 7, p. 461–475, jul. 2021.

WINTERS, Amanda C.; BERNT, Kathrin M. MLL-rearranged leukemias—an update on science and clinical approaches. **Frontiers in pediatrics**, v. 5, p. 4, 2017.

WORDL HEALTH ORGANIZATION, W. H. **Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. IARC, 2001.

WU, G. *et al.* ZNF711 down-regulation promotes CISPLATIN resistance in epithelial ovarian cancer via interacting with JHDM2A and suppressing SLC31A1 expression. **eBioMedicine**, v. 71, 1 set. 2021.

XIANG, X. *et al.* Prognostic impact of PRDM16 expression in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Hematology**, v. 27, n. 1, p. 499–505, 31 dez. 2022.

XIAO, T.; LI, X.; FELSENFELD, G. The Myc-associated zinc finger protein (MAZ) works together with CTCF to control cohesin positioning and genome organization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 7, p. e2023127118, 16 fev. 2021.

XIAO, Z. *et al.* MEL1S, not MEL1, is overexpressed in myelodysplastic syndromes patients with t(1;3)(p36;q21). **Leukemia Research**, v. 30, n. 3, p. 332–334, mar. 2006.

YAMATO, G. *et al.* Clinical features and prognostic impact of PRDM16 expression in adult acute myeloid leukemia. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 56, n. 11, p. 800–809, nov. 2017.

YAMATO, G. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis in pediatric acute myeloid leukemia. **Blood Advances**, v. 6, n. 11, p. 3207–3219, 2022.

YI, M. *et al.* The global burden and attributable risk factor analysis of acute myeloid leukemia in 195 countries and territories from 1990 to 2017: estimates based on the global burden of disease study 2017. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 13, n. 1, p. 72, 8 jun. 2020.

YIN, G. *et al.* PRDM16, negatively regulated by miR-372-3p, suppresses cell proliferation and invasion in prostate cancer. **Andrologia**, p. e14529, 20 jul. 2022.

YOSHIDA, M. *et al.* Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2753–2760, 1 abr. 2004.

YUI, Mary A.; ROTHENBERG, Ellen V. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 8, p. 529–545, 2014.

ZHANG, L. *et al.* Overexpression of PRDM13 inhibits glioma cells via Rho and GTP enzyme activation protein. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 42, n. 2, p. 966–974, ago. 2018.

ZHANG, W. *et al.* Crystal structure of the Cys2His2-type zinc finger domain of human DPF2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 413, n. 1, p. 58–61, 16 set. 2011.

ZHANG, Y. *et al.* Integrated Analysis of Genetic Abnormalities of the Histone Lysine Methyltransferases in Prostate Cancer. **Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research**, v. 25, p. 193–239, 7 jan. 2019.

ZHAO, S.; ALLIS, C. D.; WANG, G. G. The language of chromatin modification in human cancers. **Nature reviews. Cancer**, v. 21, n. 7, p. 413–430, jul. 2021.

ZHAO, Y.; SKOVGAARD, Z.; WANG, Q. Regulation of adipogenesis by histone methyltransferases. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, v. 136, p. 100746, 2024.

ZHOU, B. *et al.* PRDM16 suppresses MLL leukemia via intrinsic histone methyltransferase activity. **Molecular cell**, v. 62, n. 2, p. 222–236, 21 abr. 2016.

ZHOU, P. *et al.* Overexpression of PRDM5 promotes acute myeloid leukemia cell proliferation and migration by activating the JNK pathway. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 8, p. 3905–3917, 2019.

ZHOU, W. *et al.* Pathological bile acid concentrations in chronic cholestasis cause adipose mitochondrial defects. **JHEP reports: innovation in hepatology**, v. 5, n. 5, p. 100714, maio 2023.

ZHU, Z. *et al.* Downregulation of PRDM1 promotes cellular invasion and lung cancer metastasis. **Tumor Biology**, v. 39, n. 4, p. 1010428317695929, 1 abr. 2017.

ZOU, Fei *et al.* Comprehensive overview of the role of PBX1 in mammalian kidneys. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, p. 1106370, 2023.

ANEXO I: PARECER DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA

UFPA - NÚCLEO DE PESQUISA
EM ONCOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO DE FUSÕES GÊNICAS EM LEUCEMIAS AGUDAS: UMA PERSPECTIVA PARA O SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.

Pesquisador: André Salim Khayat

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 30307820.7.0000.5634

Instituição Proponente: Núcleo de Pesquisa em Oncologia

Patrocinador Principal: Universidade Federal do Pará
Laboratórios Servier do Brasil Ltda.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.880.155

Apresentação do Projeto:

Câncer, um grave problema de saúde pública mundial, com registro de incidência em 14 milhões de novos casos e 8,2 milhões de mortes no mundo em 2012, representa um problema ainda maior em regiões menos desenvolvidas socioeconomicamente, onde embora 57% dos casos são registrados, representam 65% dos óbitos por esta doença nestas regiões, evidenciando uma maior taxa de óbito agregada (Globocan, 2018), muito disso por ineficiência diagnóstica ou terapêutica. Destes, foram estimados 352 mil casos novos de Leucemia (do grego leuko e hemia, sangue branco) no mundo em 2012. Em relação à mortalidade, 265 mil óbitos foram estimados, o que representa uma taxa de óbito aproximada de 75%, acima da média dos demais tipos de câncer (62,7%). A alta mortalidade associada a este tipo de neoplasia é também mais grave em populações com menor nível socioeconômico, logo com menor acesso a uma abordagem médica mais eficaz (Globocan, 2018). Em termos nacionais, para o biênio de 2018/2019, estimam-se 5.940 casos novos de leucemia em

Endereço: Rua dos Mundurucus, 4487, Hospital Universitário João de Barros Barreto, 2º piso da UNACON
Bairro: GUAMA **CEP:** 66.073-005
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)98107-0858 **E-mail:** cep.npo@gmail.com

ANEXO II - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
-

II-DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:
**ENSAIO PARA DIAGNÓSTICO DE FUSÕES GÊNICAS EM LEUCEMIAS AGUDAS:
UMA PERSPECTIVA PARA O SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE.**
2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:
André Salim Khayat
3. DURAÇÃO DA PESQUISA:
36 meses
-

III -INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a), a participar do projeto de pesquisa (“**Ensaio para diagnóstico de fusões gênicas em leucemias agudas: uma perspectiva para o Sistema Único de Saúde**”), que será realizada no Núcleo de Pesquisa em Oncologia-UFPA.

Leia atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento. No caso de não entender bem, peça mais esclarecimento e só assine após ter certeza de ter esclarecido todas as suas dúvidas.

Rúbrica do pesquisador:

Rúbrica do participante:



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

Desenvolvimento de método de diagnóstico molecular múltiplo para Leucemias Agudas em pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde.

V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

O principal produto desta pesquisa será um método promissor em termos de acessibilidade, custo reduzido e baixa complexidade laboratorial para realização do diagnóstico de Leucemias Agudas, por meio da detecção de um painel múltiplo de marcadores genéticos avaliados por ensaio laboratorial simples, mas com plena capacidade (já validado para isso por meio de duas abordagens adicionais, no sentido de aumentar a sua confiabilidade do estudo), de fornecer informações relevantes auxiliares ao diagnóstico e à conduta terapêutica dos pacientes do SUS acometidos por essas neoplasias.

Cabe ressaltar que este projeto visa auxiliar no diagnóstico das leucemias utilizando-se da classificação mais recentemente descrita para tumores hematopoiéticos, sendo a partir de 2017 considerada como padrão para uso mundial, desta forma, se aplicada pelo SUS, colocará os pacientes nacionais em semelhança aos países mais desenvolvidos socioeconomicamente, colaborando assim na redução das diferenças de taxas de mortalidade entre o Brasil e os demais países.

Além disso, os resultados desta pesquisa permitirão mapear o panorama epidemiológico molecular na população envolvida neste estudo. Ademais, fornecerá um conjunto de ferramentas necessárias para o estudo de leucemias agudas a outros centros de diagnóstico ou pesquisa, que visem auxiliar pacientes acometidos por estas doenças, isso se dará por meio de métodos de divulgação, como publicações em revistas indexadas, além de palestras e reuniões em eventos científicos.

Notoriamente, todos estes aspectos contribuirão potencialmente para a redução das taxas de morbidade e mortalidade dos acometidos por estas doenças, o que é de imensurável relevância.

VI – DE QUE FORMA POSSO AUXILIAR NESTE ESTUDO?

Você pode auxiliar autorizando que o material já colhido para o monitoramento/diagnóstico da doença possa ser utilizado nesta pesquisa, além dos resultados dos exames e dados clínicos (idade, gênero do paciente, outras informações laboratoriais e qual medicamento está em uso) que serão também utilizados na pesquisa.

VII- QUAIS OS RISCOS E LIMITES QUE PODEM SER ENCONTRADOS NOS EXAMES?

O paciente não terá nenhum risco a mais, pois todo o procedimento é de rotina padrão do monitoramento médico das LLA e LMA. Qualquer risco relativo à confidencialidade é tornado praticamente inexistente, pois os dados pessoais dos pacientes são substituídos por codificações de conhecimento somente dos pesquisadores responsáveis pelo estudo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



Os resultados obtidos para essa pesquisa são absolutamente confidenciais, portanto, serão comunicados somente à pessoa (ou responsável) e ao profissional médico que acompanha o paciente. A comunicação dos resultados a terceiros só poderá ser realizada mediante autorização formal destes autorizados.

VIII- COMO SERÁ FEITA ESTA PESQUISA?

As pessoas serão convidadas a participar da pesquisa. Receberão uma cópia deste documento que deverá ser lido, entendido e assinado. Toda a atenção e exames realizados no paciente são aqueles mesmos de rotina para os pacientes direcionados a avaliação genética das LLA e LMA (não havendo qualquer tipo de ganho ou perda neste sentido). A detecção de possíveis mecanismos de resistência à abordagem terapêutica em uso (dados que será considerado na pesquisa) será realizada por critérios clínicos, de acordo com a avaliação do médico responsável. As investigações moleculares ocorrerão no Núcleo de Pesquisa em Oncologia/UFPA.

IX- QUAIS OS BENEFÍCIOS E MALEFÍCIOS DESTE ESTUDO?

A realização deste estudo permitirá a elaboração de testes para a detecção de alterações genéticas informativas e de grande importância clínica, a serem utilizadas pelo corpo médico, que beneficiarão pacientes com leucemia e até mesmo o sistema de saúde pública. Algo que atualmente não é possível em grande parte do país, considerando a falta de acesso a estes tipos de testes por motivos econômicos ou logísticos.

Não haverá nenhuma vantagem direta, tal como remuneração de qualquer ordem, com a participação neste estudo. Qualquer informação gerada que venha a beneficiar clinicamente o paciente será prontamente repassada ao corpo clínico responsável pela condução do mesmo.

X- O QUE VAI SER FEITO COM O MATERIAL E OS DADOS COLETADOS DE CADA PACIENTE?

O material e a ficha-protocolo com resultados dos exames dos pacientes serão armazenados e processados no Núcleo de Pesquisas Oncologia/NPO da UFPA.

Os pacientes que não concordarem em participar desta pesquisa não terá nenhum tipo prejuízo, em qualquer prazo, sobre seu tratamento ou atenção dispensada.

XI. QUEM DEVE CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Qualquer dúvida ou esclarecimento adicional poderá ser resolvida por contato com o pesquisador responsável: **Dr. André Salim Khayat (Biomédico, Coordenador do estudo) pelo telefone (091) 981070858.**

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



Eu,

_____ declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

____/____/_____
Data

Assinatura do responsável pela pesquisa

____/____/_____
Data