



# Análise diferencial de genes em linhagens de células de leucemia

Differential analysis of genes in leukemia cell line lines

A. R. da Silva; A. S. Fernandes; V. P. Fiorin; T. Zeppenfeld; G. B. França; J. S. Tatsch; M. R. Sagrillo; E. M. Simão\*

*Curso de Biomedicina, Ciências da Saúde, Universidade Franciscana, 97010-032, Santa Maria – RS, Brasil*

*\*edersimão@gmail.com*

*(Recebido em 23 de julho de 2019; aceito em 19 de junho de 2020)*

O câncer manifesta-se a partir de uma transmutação genética, ou seja, uma modificação no DNA que passa a transmitir informações erradas para o desenvolvimento de suas atividades, ocorrendo assim em genes especiais nomeados como proto-oncogenes. A leucemia é um dos cânceres mais conhecidos e acometem os glóbulos brancos que perdem suas funções e passam a se multiplicar descontroladamente. No entanto a terapia gênica, ainda experimental, busca substituir o gene defeituoso, pelo gene normal. O uso terapêutico de inibidores da tirosino quinase (mesilato de imatinibe), reduz significativamente a progressão da doença e elimina os principais sintomas da fase crônica da leucemia, aumentando assim a expectativa de vida. Os objetivos deste trabalho são analisar a expressão diferencial que estão relacionadas ao desenvolvimento da leucemia mediante a sua evolução ou tratamento usando Imatinibe. Os estudos foram realizados em linhagens celulares submetidos por análises de microarranjos de amostras de Leucemia Mielóide Aguda Bialélica e Leucemia Mielóide Crônica. Foram utilizadas microarranjos da Affymetrix Gene Chip HU133 de células de Leucemia Mielóide extraídos do banco de dados Gene Expression Omnibus. Dentre os resultados obtidos o gene FCAR atua no sistema imune de pacientes com Leucemia, ele é um receptor da glicoproteína transmembrana presente, genes dessa família são usados em imunoterapia usando células T, diferencialmente expresso e está atuando na ativação do sistema imunológico no tratamento da Leucemia Mielóide Aguda. Com isso é possível utilizar as ferramentas de análise de expressão gênica como meio para localizar genes diferencialmente expressos e assim determinar novas terapias gênicas.

Palavras-chave: Microarranjo, Expressão Gênica, Carcinomas.

The cancer manifests itself from a genetic transmutation, that is, a modification in the DNA that passes erroneous information for the development of its activities, occurring thus in special genes named as proto-oncogenes. Leukemia is one of the most known cancers and affects the white blood cells that lose their functions and start to multiply wildly. However, gene therapy, still experimental, seeks to replace the defective gene, by the normal gene. The therapeutic use of tyrosine kinase inhibitors (imatinib mesylate) significantly reduces the progression of the disease and eliminates the main symptoms of the chronic phase of leukemia, thus increasing life expectancy. The objective of this study was to analyze the differential expression of microarray samples published in the Gene Expression Omnibus database of cell cultures with acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia through their differential expression in cell lines. Myeloid leukemia cells obtained by the Affymetrix Gene Chip HU133 microarray method. Microarray myeloid leukemia cells were used using the Gene Expression Omnibus database, where data obtained by the Affymetrix Gene Chip HU133 microarray method are used to compare gene expression profiles. Among the results obtained the FCAR gene acts in the immune system of patients with Leukemia, it is a transmembrane glycoprotein receptor present, genes of this family are used in immunotherapy using T cells, differentially expressed and is acting in the activation of the immune system in the treatment of Leukemia Acute myeloid. With this it is possible to use the tools of gene expression analysis as a means to locate differentially expressed genes and thus to determine new gene therapies.

Keywords: Microarray, Gene Expression, Carcinomas.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo científico utilizado para mais de 100 doenças que tem por base o crescimento descontrolado de células que possuem a capacidade de se infiltrar em tecidos e órgãos. Estas células possuem a capacidade de evoluir e serem agressivas e muitas vezes incontroláveis, determinando a formação de tumores, que podem se espalhar para outras regiões do corpo. Os

diferentes tipos de câncer quando iniciam em tecidos epiteliais, como pele ou mucosas, são chamados de carcinomas. Se o *start* for os tecidos conjuntivos, como ossos, músculos e cartilagens, são chamados de sarcomas. Distintas características que diferenciam as numerosas classes de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a sua capacidade de penetrar tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, intitulada como metástase [1].

O câncer manifesta-se a partir de uma transmutação genética, ou seja, uma modificação no DNA da célula, que passa a receber orientações erradas para desenvolver suas atividades. As alterações podem ocorrer em genes especiais, nomeados proto-oncogenes, que são inativos em células normais, e quando ativados, os proto-oncogenes convertem-se em oncogenes, encarregados por mutar células normais em células cancerosas [2].

Os principais tratamentos convencionais são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Os tratamentos do câncer geralmente apresentam efeitos agressivos para o paciente, aumentando o comprometimento nutricional e prejudicando a resposta terapêutica [3].

No entanto na terapia gênica, ainda experimental, ocorre um procedimento médico que visa a modificação genética de células como forma de tratar doenças, já que os genes influenciam praticamente todas as doenças humanas. A terapia gênica busca substituir um gene defeituoso por um gene normal, entretanto, a remoção desse gene do organismo é algo muito complexo. O conhecimento dos genes responsáveis pelas características normais ou patológicas permitirá a plena aplicação dos princípios da medicina genômica, o que modificará os procedimentos médicos no que diz respeito ao diagnóstico e o tratamento de várias doenças. Os princípios desta metodologia envolvem a introdução de genes responsáveis por proteínas que poderão ser benéficas, um gene normal introduzido poderá reverter um quadro clínico, células geneticamente modificadas poderão ativar mecanismos do sistema imune ou ainda produzir moléculas de interesse terapêutico. Assim, os procedimentos envolvem, em geral, a introdução desse gene de interesse, que deve ser conhecido por completo [4].

A leucemia é um dos cânceres mais conhecidos, ocorre quando os glóbulos brancos perdem sua função e passam a se multiplicar de maneira descontrolada. A perda da funcionalidade correta e multiplicação dos glóbulos provoca a falta de ar, dores de cabeça, dentre outros [2]. São conhecidos mais de 12 tipos de leucemias, onde as quatro prevalentes são a Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) e Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) [3].

O tratamento das leucemias agudas consiste em duas fases, a primeira é chamada de fase de indução, e tem como finalidade produzir remissão completa, definida como a presença de menos de 5% de blastos na medula óssea, e referência de contagem de neutrófilos maior do que 1 para cada 109 e número de plaquetas maior que 100 para cada 109. A fase de indução destrói a maioria das células normais da medula óssea, bem como as células leucêmicas, o que leva a uma diminuição ainda maior das células sanguíneas normais. A maioria dos pacientes necessita de antibióticos, medicamentos para aumentar os glóbulos brancos ou transfusão sanguínea [5].

A segunda fase é relacionada a quimioterapia, especificamente prolonga o período de remissão completa [5]. A terapia de indução padrão consiste em uma combinação de Daunorrubicina (um antraciclina) por três dias e Citarabina em infusão contínua pelo período de sete dias. Esse método terapêutico, utiliza uma combinação de 3 para 7 (3 dias de Daunorrubicina para 7 dias de Citarabina), que resulta em percentagens de resposta citogenética (RC) de 65% a 75% em pacientes com faixa etária de 18 anos aos 60 anos. Após atingir a RC, os pacientes são resignados a uma intensificação da dose da quimioterapia [6].

O uso do Imatinibe resultou numa melhora expressiva do prognóstico, entretanto surgiram mecanismos de resistência ou intolerância. Inibidores de tirosina quinase de segunda geração mostram eficácia na maioria dos pacientes, exceto em pacientes com mutações em genes específicos. Em 1960, a descoberta descrita por Nowell do cromossomo Philadelphia e que este era devido a uma translocação entre cromossomos t (9;22) e em 1984, do oncogene *BCR-ABL*, permitiram o desenvolvimento de terapia-alvo, revolucionando o tratamento da leucemia [7].

O desenvolvimento de uma terapia-alvo alterou drasticamente a expectativa de vida do paciente com leucemia. A terapia é direcionada com Inibidores da Tirosina Quinase (*ITQ*), especialmente o Mesilato de Imatinibe, com a inibição da quinase reduziu significativamente a frequência de progressão da doença e eliminou os principais sintomas da fase crônica [8].

Os objetivos deste trabalho são analisar a expressão diferencial que estão relacionadas ao desenvolvimento da leucemia mediante a sua evolução ou tratamento usando Imatinibe. Os estudos foram realizados em linhagens celulares submetidos por análises de microarranjos de amostras de Leucemia Mielóide Aguda Bialélica e Leucemia Mielóide Crônica.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os dados de transcriptoma da Leucemia Mielóide (LM) foram selecionados usando o banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO). As amostras foram obtidas pela técnica de microarranjo da *Affymetrix Gene Chip HU133*, contendo aproximadamente 26.000 genes:

1. GSE33223: perfis de expressão gênica de 30 amostras. Foram utilizadas 10 amostras do sangue periférico, 9 displasia de multilinhagem leucemia mieloide aguda (LMA) bialélica e 11 amostras sem displasia de multilinhagem de leucemia mieloide aguda bialélica (sem mutações do CEBPA) [9].

2. GSE33075: terapia com o fármaco Imatinibe para Leucemia Mielóide Crônica (LMC) usado para reparar os níveis de expressão de genes chave para danos no DNA e progressão do ciclo celular. Foram tratados 9 pacientes com diagnóstico de LMC positiva e nesses pacientes a aspiração da medula óssea foi coletada antes da administração do Imatinibe e 4 semanas após o tratamento, totalizando 18 amostras (9 diagnosticadas e 9 tratadas), sendo 9 amostras de doadores normais (controle) [10].

Para estabelecer um padrão de análise biológica entre as séries de dados e amostras de dados, todas as amostras foram normalizadas e comparadas pela média robusta de múltiplos chips (RNA). As análises comparativas realizadas após a normalização foram realizadas pelo script de análise diferencial LIMMA, do inglês modelo linear para microarranjos e RNA-SEQ [11]. Outras informações sobre as análises, podem ser encontradas no capítulo análises estatísticas.

A média aritmética foi usada para agrupar as amostras e os grupos foram gerados para realizar a análise, conforme mostrado na Tabela 1. As comparações foram realizadas conforme amostras de LMA versus as amostras normais para cada caso, em seguida as comparações foram submetidas a análise estatística da mudança de expressão seguida pelo teste de significância estatística conforme descrito abaixo.

Tabela 1: Comparação entre os grupos de LMA e LMC e os dois grupos experimento versus controle.

Comparação: mudança de expressão (experimento versus controle)			
Estudos	Total de Amostras	Amostras Experimentais	Amostras Controle
GSE33223	19	9 amostras de displasia de multilinhagem, LMA, bialélica	10 amostras do sangue periférico
	21	11 amostras sem displasia de multilinhagem, (sem mutações do CEBPA)	10 amostras do sangue periférico
GSE33075	18	9 pacientes com diagnóstico de LMC positiva (antes da administração do Imatinibe)	9 amostras de doadores normais
	18	9 pacientes com diagnóstico de LMC positiva (4 semanas após a administração do medicamento Imatinib)	9 amostras de doadores normais

Considerando a média das amostras (Tabela 1), foi utilizada a mudança de expressão (ME) descrita pelo log na base 2 (LogME) entre o experimento versus o controle (para cada caso isolado) para localizar os genes diferencialmente expressos em cada combinação. Com a utilização do software R foram utilizados pacotes de análises de diferenciação de expressão para esses genes ME através de métodos *Baysiano* e *Tstudent*. Diferenças entre dados experimentais e controle foram consideradas estatisticamente significantes para valores  $< 5\%$  e  $\text{LogME} > 3$  (considerando a base

2, ou seja, com diferença de expressão oito vezes mais alterado em experimento *versus* o controle) [12, 13].

Sobre cada conjunto de genes encontrados foram construídas as redes de interações entre as proteínas. Os conjuntos de proteínas apresentados nos resultados foram inseridos no banco de dados String-DB, um repositório público que mostra informações sobre proteínas e suas interações. Os padrões de interação foram estabelecidos com confiabilidade de 0,7 e as interações foram escolhidas por mineração de texto, co-expressão e experimentos [15]. Com esses resultados, foram localizadas as interações entre os genes diferencialmente expressos, entre as amostras do tratamento e controle da Tabela 1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para mostrar os genes diferencialmente expressos, através da mudança de expressão (ME), foram selecionados os genes com  $ME > 3$ , indicando que esses genes, estão com expressão oito vezes mais alteradas no experimento do que em seu controle. Para garantir a significância da ME, foram selecionados também genes com valor de P, menor que 5% (para os casos em que houveram mudança de expressão maior que 3).

#### 3.1. Displasia de multilinhagem, leucemia mieloide aguda (LMA), bialélica

Na Tabela 2 estão apresentados os genes ME, com seus respectivos valores de mudança de expressão entre a displasia de multilinhagem, leucemia mieloide aguda (LMA), bialélica *versus* as amostras do sangue periférico [ME (D)] e sem a displasia de multilinhagem (sem mutações do CEBPA) *versus* as amostras do sangue periférico [ME (T)]. Na tabela observa-se também que os resultados foram ordenados em ordem decrescente para o ME (T), mostrando assim a diferenciação da expressão entre os dois grupos estudados. Observa-se que os valores significativos de ME (D) para ME (T) mudaram significativamente (P-value T = 0,00).

Tabela 2: Resultados da Mudança de Expressão (ME) para as amostras das displasias de multilinhagem, LMA, bialélica *versus* as amostras do sangue periférico (D) e sem displasia de multilinhagem (sem mutações do CEBPA) *versus* as amostras do sangue periférico.

Gene	ME (D)	ME (T)	P-valor (D)	P-valor (T)
<i>FCAR</i>	0,40	4,45	0,18	0,00
<i>MCL1</i>	0,08	4,24	0,81	0,00
<i>RIT1</i>	0,60	4,20	0,14	0,00
<i>CLINT1</i>	-0,14	4,03	0,63	0,00
<i>DNAJC3</i>	0,03	3,93	0,94	0,00
<i>TOB1</i>	0,93	3,81	0,06	0,00
<i>MARCKS</i>	0,18	3,79	0,62	0,00
<i>FPRI</i>	-0,08	3,49	0,89	0,00
<i>QKI</i>	1,17	3,44	0,03	0,00
<i>TRIB1</i>	0,73	3,43	0,19	0,00
<i>ARHGDI1</i>	0,47	3,31	0,24	0,00
<i>ZFP36L2</i>	0,62	3,30	0,26	0,00
<i>RICTOR</i>	0,58	3,29	0,11	0,00
<i>FNDC3B</i>	0,98	3,24	0,01	0,00
<i>PRPF38B</i>	0,54	3,22	0,33	0,00
<i>PLEKHB2</i>	-0,18	3,16	0,53	0,00
<i>BLOC1S6</i>	-0,31	3,09	0,33	0,00
<i>PPP1R12A</i>	0,37	3,06	0,17	0,00
<i>AKIRIN2</i>	-0,11	3,02	0,76	0,00
<i>SUCNR1</i>	1,85	3,01	0,00	0,00

Observando os resultados obtidos entre as comparações da ME (D) e ME (T), onde ME (T) corresponde a combinação sem a displasia de multilinhagem (sem mutações do CEBPA) *versus* as amostras do sangue periférico, verificou-se um aumento da mudança de expressão oito vezes maior entre esses dois casos. Dentre esses resultados, o gene *FCAR* foi encontrado com expressão

dezesseis vezes mais alterado no processo sem displasia de multilinhagem, (sem mutações do CEBPA) *versus* as amostras do sangue periférico (T). Esse gene atua no sistema imune, ele é um receptor da glicoproteína transmembrana presente. Genes dessa família são usados em imunoterapia usando células T. Isso foi constatado em Leucemia Linfocítica Aguda [16]. O gene *MCL1*, também significativamente alterado, é uma proteína da família Bcl-2 que pode atuar como uma molécula apical no controle da apoptose, promovendo a sobrevivência celular por interferência precoce em uma cascata de eventos que levam à liberação do citocromo C da mitocôndria. A expressão de *MCL1* pode ser útil para informar a tomada de decisão no tratamento de vários tipos de câncer [17].

O *FPR1* é originalmente identificado em leucócitos fagocíticos, mas posteriormente também encontrado em outros tipos de células. A ativação do *FPR* nos leucócitos pelo *FMLF* resulta no aumento da quimiotaxia, fagocitose e produção de oxigênio reativo e intermediários inflamatórios [18]. O gene *Quaking (QKI)* é uma proteína ligadora de RNA do tipo KH, codificada pelo *locus quaking (qk)*. Esta faz a repressão pós-transcricional da proteína FOXO1 pela expressão do gene *QKI* o que resulta em baixos níveis de expressão de FOXO1 em células de câncer de mama [19]. O gene *ZFP36L2* atua na regulação da resposta a fatores de crescimento e está associado a Leucemia Aguda de células T [20]. O gene *FNDC3B* é um regulador positivo da adipogênese e está associado ao adenocarcinoma de uretra e adenocarcinoma de células claras de uretra [21].

O transdutor de ERBB2.1 (*TOBI*) é uma proteína supressora de tumor, que funciona como um regulador negativo do receptor tirosina-quinase ERBB2. Como a maioria das outras proteínas supressoras de tumor, o gene *TOBI* é inativado em muitos cânceres humanos. A deleção homocigótica do *TOBI* em camundongos é relatada como responsável pelo desenvolvimento de câncer no pulmão, fígado e linfonodo, enquanto a super expressão ectópica de *TOBI* mostra antiproliferação e uma diminuição nas habilidades de migração e invasão em células cancerígenas [22]. O gene *ARHGDI1* é expressado aberrantemente em diversos tipos de tumores e desempenha papéis diferentes no processo do tumor. O carcinoma hepatocelular (HCC) é um dos cânceres humanos mais comuns do mundo, com isso *ARHGDI1* é freqüentemente desregulado em HCC e associado com a invasão do tumor e de metástases [23].

Na Figura 1 são mostradas as redes de interação entre os genes diferencialmente expressos dos perfis de expressão gênica nas comparações do controle com a multilinhagem da leucemia mieloide aguda bialélica e da displasia sem mutações do gene CEBPA. A Figura 1a mostra as interações entre os genes *MCL1*, *TOBI* e *QKI* que atuam como supressores de tumor, conforme descrito acima, o que garante a desativação da LMA. Observando a ligação é importante salientar ainda que o seu desligamento na via de ativação de oncogenes poderá provocar a quebra de ligação da rede, ficando conectado ainda genes que não tem relação com a supressão tumoral, ou da leucemia mieloide aguda.

As Figuras 1b e 1c complementam o resultado da Tabela 2. Observa-se que os genes *MCL1*, *RIT1* e *CLINT1* ganharam expressão no tratamento da leucemia mieloide aguda. De acordo com os resultados, isso sugere que o tratamento é eficaz perante a super expressão dessas proteínas e que esse tratamento poderá ativar proteínas importantes que estão atuando como supressoras de tumor. A proteína *SUCNR1* não foi identificada como relacionada com a expressão em sem displasia de multilinhagem (sem mutações do CEBPA) *versus* as amostras do sangue periférico; porém há uma alteração significativa de expressão dessa proteína entre as combinações ME(D) e ME(T). Nota-se ainda que de acordo com os resultados observados na Figura 1c, as mutações provocadas pelo avanço da LMA ocasionaram aumentos na expressão dos genes. Isso ocorre devido ao acúmulo de mutações nos genes ME que poderia desfavorecer o tratamento usando terapia gênica, uma vez que o nível de mutações é elevado em relação ao caso anterior (Figura 1b).

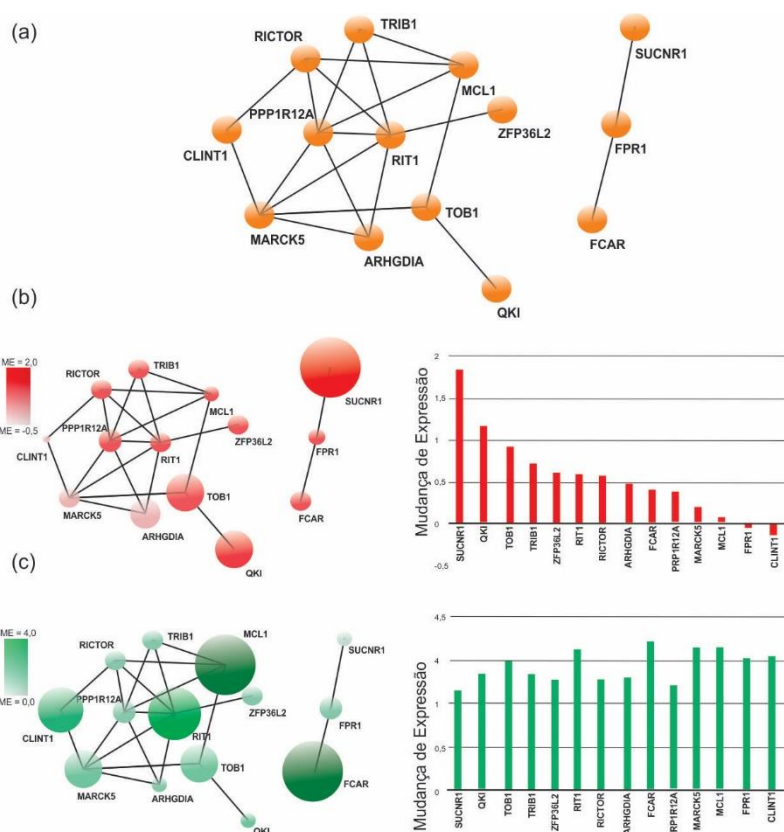


Figura 1: Redes de interação (a) gerada para a diferenciação da expressão das amostras de multilinhagem da leucemia mieloide aguda bialélica, com (b) e sem (c) a presença do gene mutado CEBPA.

### 3.2. Terapia usando Imatinibe para Leucemia Mieloide Crônica

Na Tabela 3 estão apresentados os quatro genes diferencialmente expressos (ME) entre as amostras de 9 pacientes com diagnóstico de LMC positiva (4 semanas após a administração do medicamento Imatinibe) *versus* 9 amostras de doadores normais. Os resultados do ME ( $T_i$ ) foram organizados em ordem decrescente, mostrando assim a diferenciação da expressão para os casos tratados com Imatinibe. Observou-se também que os resultados mudaram significativamente, sendo o maior valor significativo de 0,02 para o gene *CD96*.

O hormônio liberador de tirotropina (TRH) é um gene de codificação de proteínas *trh*. Doenças associadas com TRH incluem deficiência de hormônio liberador de tirotropina e hiperprolactinemia. Entre as suas vias relacionadas estão os receptores de ligação ao ligando peptídico e a Sinalização pelo *GPCR* e como componente do eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoidiano, controla a secreção do hormônio estimulante da tireoide (TSH) e está envolvido na regulação da síntese de hormônios tireoidianos. Também funciona como modulador do crescimento do cabelo e promove o alongamento do pelo do cabelo, prolongando a fase de crescimento do ciclo capilar (anágena) e antagonizando sua terminação (catágena) pelo *TGFB2* [24]. A proteína ativadora *DLC1* Rho GTPase é um membro da família rhoGAP de proteínas que desempenham um papel na regulação de pequenas proteínas de ligação ao gene *GTP*. As proteínas da família GAP participam de vias de sinalização que regulam os processos celulares envolvidos nas alterações do citoesqueleto. Este gene funciona como um gene supressor de tumor em vários tipos de câncer comuns, incluindo câncer de próstata, pulmão, colo-retal e de mama. Algumas variantes de transcritos, devido a promotores alternativos e *splicing* alternativo, foram encontradas para este gene [25].

O Prostaglandina D Sintase Hematopoiética (*HPGDS*) é um dos genes encontrados com expressão diferencial de 3,01 e é um membro da família da classe Sigma-glutationa-S-transferase. A enzima catalisa a conversão do *PGH2* em *PGD2* e desempenha um papel na produção de prostanoides no sistema imunológico e nos mastócitos. A presença desta enzima pode ser usada

para identificar o estágio de diferenciação de megacariócitos humanos [26]. O gene *CD96* humano (*hCD96*) foi descoberto em 1992 e denominado originalmente para ativação de células T, com aumento da expressão tardia. Representa uma glicoproteína transmembranar do tipo I pertencente à superfamília das imunoglobulinas, expressa principalmente por células de origem hematopoiética, em particular em células T e NK (*natural killer*). Com a evolução da doença essa proteína atua como moduladora de respostas imunes [27].

*Tabela 3: Resultados da Mudança de Expressão (ME) para as amostras da terapia usando Imatinibe para Leucemia Mieloide Crônica (LMC). Com LMC positiva (antes da administração do Imatinibe) versus doadores normais (D<sub>i</sub>) e LMC positiva (4 semanas após a administração do medicamento Imatinibe) versus amostras de doadores normais (T<sub>i</sub>).*

Gene	ME (D <sub>i</sub> )	ME (T <sub>i</sub> )	P-value (D <sub>i</sub> )	P-Value (T <sub>i</sub> )
<i>TRH</i>	2,18	3,35	0,00	0,00
<i>DLC1</i>	1,73	3,34	0,00	0,00
<i>HPGDS</i>	3,27	3,19	0,00	0,00
<i>CD96</i>	2,22	3,01	0,02	0,00

Na Figura 2 são mostradas as redes de interação entre os genes diferencialmente expressos dos perfis de expressão gênica das comparações LMC positiva e LMC positiva 4 semanas após a administração do medicamento Imatinibe. A Figura 2a mostra a interação e clusterização de 4 genes importantes na expressão gênica durante a administração do fármaco Imatinibe. Como descrito anteriormente, esses genes desempenham papel importante e possuem funções específicas como deficiência na liberação de hormônios. Outros genes que surgiram neste contexto são ligantes que atuam como pontes de ativação destes 4 genes, como é o caso da proteína OXT. Essa proteína é expressa no hipotálamo juntamente com a neurofisiina e é responsável pela contração muscular durante o parto e lactação. Na Figura 2b observa-se o resultado da diferenciação da expressão para a LMC positiva (antes da administração do Imatinibe) *versus* amostras de doadores normais.

São apresentados três genes diferencialmente expressos (*DLC1*, *CD96* e *HPGDS*) que não aparecem conectados por que desempenham funções diferentes. Ainda na Figura 2b observa-se que ocorreu uma troca na expressão destes genes em relação ao caso posterior (Figura 2c), logo depois da aplicação do fármaco Imatinibe. Pode-se concluir que ocorreram alterações na expressão fazendo com que a proteína *CD96*, que está envolvida no sistema imunológico, diminuía sua expressão. Ocorreu também um aumento considerado na expressão da proteína *DLC1* de 1,73 para 3,34 (aumento de quase 16 vezes a sua expressão em relação ao caso LMC positiva (antes da administração do Imatinibe) *versus* amostras de doadores normais). Alguns estudos indicam que esse gene (*DLC1*) é um supressor de tumor e poderá atuar em câncer de fígado, pulmão, próstata, mama, entre outros [28].

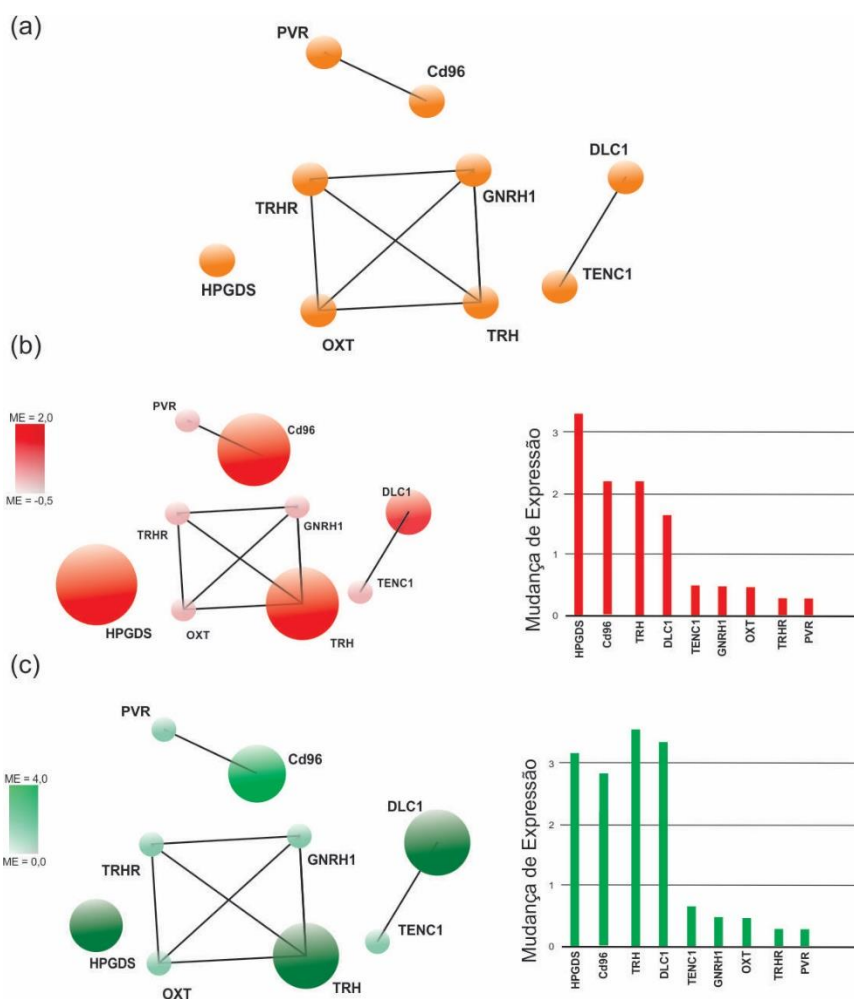


Figura 2: Redes de interação (a) para as amostras da terapia usando Imatinibe para Leucemia Mieloide Crônica (LMC), comparações de expressão entre LMC positiva (antes da administração do Imatinibe) versus amostras de doadores normais (b) e diagnóstico de LMC positiva (4 semanas após a administração do medicamento Imatinibe) versus amostras de doadores normais (c).

#### 4. CONCLUSÃO

Os principais genes citados neste trabalho estão relacionados a alguns processos bem específicos e característicos da Leucemia. Uma análise isolada de cada série estudada foi publicada anteriormente, envolvendo as análises de diferenciação de expressão em cada estudo de Leucemia.

No desenvolvimento desse trabalho, pode-se dar uma atenção especial aos genes que foram correlacionados com a LMA. O gene *F-CAR* é diferencialmente expresso e está atuando na ativação do sistema imunológico e no tratamento da LMA, e o gene *MCL-1* atua na ativação da apoptose e na tomada de decisão no tratamento de vários tipos de câncer. A proteína ativadora *DLC1 Rho GTPase* funciona como um gene supressor de tumor em vários tipos de câncer.

Observando as alterações destes genes específicos em vias, notou-se que para leucemia mieloide aguda (LMA), bialélica os genes estão expressos em vias relacionadas ao sistema imunológico. Para os estudos envolvendo a terapia com o fármaco Imatinibe para Leucemia Mieloide Crônica (LMC), notou-se que há ativação de genes que atuam em vias de ciclo celular.

Estudos como esses elucidam os principais caminhos de ativação da Leucemia incluindo ainda os caminhos de ativação do fármaco Imatinibe.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reis RP, Apratto MA, Santos C, Teodózio ASO, Bezerra DG. Assistência de enfermagem às mulheres com câncer de mama: um enfoque nos cuidados físicos e psicológicos. Rev hórur. 2018;13(1):43-58.



2. Oliveira MM, Malta DC, Guauche H, Moura L, Silva GA. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da pesquisa nacional de saúde. *Rev Bras Epidemiol.* 2013;2:146-157. doi: 10.1590/1980-5497201500060013.
3. Elman I, Pinto-e-silva MEM. Crianças portadoras de leucemia linfóide aguda: análise dos limiares de detecção dos gostos básicos. *Rev Bras Cancerol.* 2006;53:297-303.
4. Nardi NB, Teixeira LA, Silva EFD. Terapia gênica. *Ciênc. Saúde coletiva,* 2002;7(1):109-116, doi: 10.1590/S1413-81232002000100010.
5. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, Schiffer CA, Doehner H, Tallman MS, Lister TA, Lo-Coco F, Willemze R, Biondi A, Hiddemann W, Larson RA, Löwenberg B, Sanz MA, Head DR, Ohno R, Bloomfield CD. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *Rev clin oncol.* 2003;21:4642-9.
6. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood.* 2005;106:1154-63.
7. Bollmann PW, Giglio, A. Leucemia mieloide crônica: passado, presente, futuro. *Einstein.* 2011;9(2):236-243.
8. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, Gambacorti-Passerini C, Saglio G, Cortes J, Daley GQ. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica.* 2016;101(5):541-558, doi: 10.3324/haematol.2015.139337.
9. GSE33223: Multilineage dysplasia does not influence prognosis in patients with CEBPA mutated AML supporting the WHO proposal to classify these patients as a unique entity [Internet] GEO, MI, USA, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse33223>.
10. GSE33075: Imatinib therapy of chronic myeloid leukemia restores the expression levels of key genes for DNA damage and cell cycle progression [Internet] GEO, MI, USA, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=gse33075>.
11. Castro MAA, Filho JL, Dalmolin RJ, Sinigaglia M, Moreira JC, Mombach JCM, Almeida RM. ViaComplex: Software for Landscape Analysis of Gene Expression Networks in Genomic Context. *Bioinformatics.* 2009;25(11):1468-69.
12. Simão EM, Bugs CA, Castro MAA, Sinigaglia M, Librelotto GR, Mombach JCM. Induced Genome Maintenance Pathways in Pre-cancer Tissues Describe an Anti-cancer Barrier in Tumor Development. *Molecular BioSyst.* 2012;8(11):3003-9, doi: 10.1039/c2mb25242b.
13. Simão EM, Cabral HC, Castro MAA, Sinigaglia M, Mombach JCM, Librelotto GR. Modeling the Human Genome Maintenance Network. *Physica A.* 2010;389:4188-94, doi: 10.1016/j.physa.2010.05.051.
14. Fabregat, A, Sidiropoulos, K, Garapati, P, Gillespie, M, Hausmann, K, Haw, R, Jassal, B, Jupe, S, Korninger, F, McKay, S, Matthews, L, May, B, Milacic, M, Rothfels, K, Shamovsky, V, Webber, M, Weiser, J, Williams, M, Wu, G, Stein, L, Hermjakob, H, D'Eustachio P. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research.* 2013; 42(1): 472-477, doi: 10.1093/nar/gkx1132.
15. String-db: functional protein association networks [Internet] STRING, Consortium 2019, atualizado em jun 2019. Disponível em: <https://string-db.org/>.
16. Singh N, Frey NV, Grupp SA, Maude SL. Car t cell therapy in acute lymphoblastic leukemia and potential for chronic lymphocytic leukemia. *Curr Treat Option On.* 2016;17:327-345.
17. Michels J, Johnson PWM, Packham G. Molecules in focus mcl-1. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2005;37(2):267-271.
18. Zhu J, Wang O, Ruan L, Hou X, Cui Y, Wang JM, Le Y. The green tea polyphenol o-epigallocatechin-3-gallate inhibits leukocyte activation by bacterial formylpeptide through the receptor fpr. *Int Immunopharmacol.* 2009;9(9):1126-1130, doi: 10.1016/j.intimp.2009.05.002.
19. Yu F, Jin L, Yang G, Ji L, Wang F, Lu Z. Post-transcriptional repression of foxo1 by qki results in low levels of foxo1 expression in breast cancer cells. *Oncol rep.* 2013; 31(3):1459-1465.
20. Liu J, Lu W, Liu S, Wang Y, Li S, Xu Y, Xing H, Tang K, Tian Z, Rao Q, Wang M, Wang J. ZFP36L2, a novel AML1 target gene, induces AML cells apoptosis and inhibits cell proliferation. *Leuk Res.* 2018;68:15-21.
21. Feng S, Han M, Zhou L, Wang Q, Li Z, Li Y, Lu H, Liu T, Ma Y, Liu S, Cheng J. NS5ABP37 inhibits liver cancer by impeding lipogenesis and cholesterogenesis. *Cancer Sci.* 2017;108(1):12-22, doi: 10.1111/cas.13117.
22. Lee HS, Kundu J, Kim RN, Shin YK. Transducer of ERBB2.1 (TOB1) as a tumor suppressor: a mechanistic perspective. *Int J Mol Sci.* 2015;16(12):29815-29828.
23. Liang L, Li Q, Huang LY, Li DW, Wang YW, Li XX, Cai SJ. Loss of arhgdia expression is associated with poor prognosis in HCC and promotes invasion and metastasis of HCC cells. *Int J Oncol.* 2014;45(2):659-666, doi: 10.3892/ijo.2014.2451.

24. Brejchová J, Sýkora J, Ostašov P, Merta L, Roubalová L, Janáček J, Hof M, Svoboda P. TRH-receptor mobility and function in intact and cholesterol-depleted plasma membrane of HEK293 cells stably expressing TRH-R-EGFP. *Biochimica et biophysica ACTA (BBA) – biomembranes*. 2015;1848(3):781-796.
25. Xie CR, Sun HG, Sun Y, Zhao WX, Zhang S, Wang XM, Yin ZY. Significance of genetic variants in DLC1 and their association with hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4203-4209, doi: 10.3892/mmr.2015.3970.
26. Meleza C, Thomasson B, Ramachandran C, O'Neill JW, Michelsen K, Lo MC. Development of a scintillation proximity binding assay for high-throughput screening of hematopoietic prostaglandin D2 synthase. *Anal biochem*. 2016;511:17-23, doi: 10.1016/j.ab.2016.07.028.
27. Georgiev H, Ravens I, Papadogianni G, Halle S, Malissen B, Loots GG, Förster R, Bernhardt G. Shared and unique features distinguishing follicular t helper and regulatory cells of peripheral lymph node and peyer's patches. *Front Immunol*. 2018;9:1-15, doi: 10.3389/fimmu.2018.00714.
28. Gökmen-Polar Y, True JD, Vieth E, Gu Y, Gu X, Qi GD, Mosley AL, Badve SS. Quantitative phosphoproteomic analysis identifies novel functional pathways of tumor suppressor DLC1 in estrogen receptor positive breast cancer. *PLoS One*. 2018;13(10):1-21, doi: 10.1371/journal.pone.0204658.