

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Renata Suellen da Silva Alves

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED
LEUCINE ZIPPER*) E BCL-2 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÔNICA**

Belo Horizonte

2025

Renata Suellen da Silva Alves

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE GILZ (*GLUCOCORTICOID-INDUCED
LEUCINE ZIPPER*) E BCL-2 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA
CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino.

Coorientadora: Prof. Dra. Lirlândia Pires de Souza

Belo Horizonte

2025

A474e Alves, Renata Suellen da Silva.
Estudo da expressão gênica de GILZ (*Glucocorticoid-induced leucine zipper*) e BCL-2 em pacientes com leucemia linfocítica crônica [recurso eletrônico] / Renata Suellen da Silva Alves. – 2025.
1 recurso eletrônico (52 f. : il.) : pdf

Orientador: Adriano de Paula Sabino.
Coorientadora: Lirlândia Pires de Souza.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Leucemia – Teses. 2. Glicocorticoides – Teses. 3. Pacientes – Teses. I. Sabino, Adriano de Paula. II. Souza, Lirlândia Pires de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.99419

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"ESTUDO DA EXPRESSÃO GENICA DE GILZ (GLUCOCORTICOID-INDUCED LEUCINE ZIPPER) E BCL-2 EM PACIENTES COM LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA"

RENATA SUELLEN DA SILVA ALVES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dezessete de janeiro de dois mil e vinte e cinco, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

Tulio Resende Freitas
UFMG

Ana Paula Lucas Mota
UFMG

Lirlândia Pires de Sousa - Coorientadora
UFMG

Adriano de Paula Sabino - Orientador
UFMG

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Professora do Magistério Superior**, em 17/01/2025, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano de Paula Sabino, Professor do Magistério Superior**, em 17/01/2025, às 10:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tulio Resende Freitas, Usuário Externo**, em 20/01/2025, às 10:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3845164** e o código CRC **8DF56546**.

DEDICATÓRIA

À Luísa... Que eu aprenda a enxergar o
mundo através dos seus olhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e à espiritualidade boa, por me guiarem e proporcionarem crescimento, ajudando-me a superar limites e obstáculos que antes pareciam intransponíveis. Obrigada, Mãezinha Maria, por passar sempre à frente e iluminar meu caminho.

Aos meus pais, Lecília e Antônio, que são a base sólida que me sustenta, e à minha irmã, Bruna, minha companheira de caminhada na vida e, muitas vezes, na academia. Somos muito mais fortes do que imaginamos.

Ao meu companheiro de vida e muitas vezes mentor, Leo, obrigada por me escolher para compartilhar esta encarnação. Por cada incentivo, por ouvir-me, ensinar-me e, acima de tudo, depositar em mim um amor e uma confiança incomparáveis. Todas as conquistas são com e por você. Amo-te profundamente.

À minha filha, Luísa, minha pequena, você nem imagina como me salvou de mim mesma e me deu um novo sentido de força e esperança. Que todos possamos aprender com a pureza que você traz ao mundo. Saiba que você é minha maior motivação.

Aos amigos Tadeu e Luanda, por cuidarem da minha pequena Luísa com tanto amor e atenção nos momentos em que não pude estar presente. A casa do “dindinho Tadeu e Tia Lu” será sempre um porto seguro. Luanda, obrigada por compartilhar a loucura e a beleza da maternidade e por estar sempre disposta a ouvir e compreender.

Aos meus sogros, Aparecida e Antônio, pela presença constante e pelo apoio incondicional em todas as etapas dessa jornada.

Aos voluntários deste estudo, cuja confiança na ciência como caminho para a transformação e melhoria da vida das futuras gerações inspira e fortalece nossa jornada.

Aos meus amigos da Oncohemato, que tanto me ensinaram, socorreram e ouviram ao longo dessa caminhada, deixo minha mais profunda gratidão. Em especial à Simone, a quem devo tudo que aprendi em biologia molecular, à Fernanda por abrir as portas para o fascinante

mundo da citometria e Camila por todo cuidado com o laboratório de hematologia e disponibilidade. Agradeço também ao Tulio, por toda paciência e seriedade que me apresentou a cultura celular e as conversas que me auxiliaram no direcionamento dos meus trabalhos. À Laura, por todo carinho, atenção e aprendizado, agradeço do fundo do coração, e à Larissa, por sempre ser tão positiva e me auxiliar nos momentos em que tanto precisei. Que vocês duas continuem a ser luz por onde passam.

À Dra. Marcela Helena, que foi uma luz quando acreditei que não conseguiria. Obrigada pelas horas de auxílios, inclusive durante a noite, deixando o cansaço e todos os compromissos para acolher aqueles que tanto precisaram de você. Você é um ser humano maravilhoso e que sua paixão em ensinar continue sempre assim.

Ao meu orientador, professor Adriano, obrigada por confiar em meu trabalho e me apresentar o universo fascinante da pesquisa.

À minha coorientadora, Lirlândia Pires, agradeço pela paciência, pelas palavras sempre ternas e pelo aprendizado constante sobre ciência e pesquisa.

Agradeço aos colegas da equipe do Laboratório de Sinalização da Inflamação, por todo o auxílio e proatividade em ajudar.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, agradeço a oportunidade de crescimento acadêmico, e ao Departamento de Microbiologia, por me permitir conciliar a pesquisa com a jornada de trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta trajetória, minha eterna gratidão.

RESUMO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença maligna caracterizada pelo acúmulo progressivo de células B CD5+, evoluindo com linfocitose absoluta e presença de $\geq 5 \times 10^9/L$ de linfócitos B no sangue periférico por um período mínimo de 3 meses. Evidências indicam que os glicocorticoides (GCs) induzem apoptose em células hematológicas, apoiando seu uso como agentes quimioterápicos para leucemias, linfomas e mieloma, ao passo que mecanismos de resistência a estes fármacos foram descritos em pacientes com essas malignidades hematológicas. GILZ (*glucocorticoid-induced leucine zipper*) é uma proteína imunomoduladora pertencente à família *TSC22D* expressa e induzida por GCs em células do sistema imune, desempenhando um papel fundamental no controle da sobrevivência celular e da apoptose. Dados da literatura mostram que níveis reduzidos de GILZ estão relacionados com aumento de BCL2 (uma proteína pró-sobrevida) e consequente diminuição da apoptose de células B em modelo pré-clínico de senescência murina. O presente estudo focou na avaliação da expressão gênica de GILZ e BCL-2 em pacientes com LLC (N=22) comparando-os aos controles saudáveis (N=21). Foram avaliados hemograma, fenotipagem por citometria de fluxo, e análises de expressão gênica de GILZ e BCL-2 por qPCR. A correlação entre dados clínicos, laboratoriais e expressão gênica foi investigada por regressões lineares e testes estatísticos. Foram observados níveis reduzidos de GILZ em pacientes com LLC em comparação aos controles, que, contudo, não atingiram significância estatística. Em relação à expressão de BCL-2, nossos dados corroboram com dados da literatura, com a expressão aumentada desse gene em pacientes com LLC ($p=0.008$). Ainda, foi observada correlação entre GILZ e BCL2 ($R^2 0,3090$ e $p=0.04$), sem correlação significativa entre GILZ e os dados do hemograma. Em suma, nosso trabalho demonstra que a expressão de GILZ parece estar diminuída em pacientes com LLC enquanto a expressão de BCL-2 está aumentada no mesmo grupo. Ainda, foi observada correlação significativa entre esses genes. Dado o conhecido papel de BCL-2 no aumento da sobrevivência de linfócitos, e o de GILZ na indução da apoptose dessas células, esses achados nos apontam para uma possível implicação de GILZ para a sobrevivência de linfócitos de pacientes com LLC, o que precisa ser melhor explorado utilizando outras coortes.

Palavras chave: GILZ; glicocorticoides; LLC; BCL-2.

ABSTRACT

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is a malignant disease characterized by the progressive accumulation of CD5+ B cells, evolving with absolute lymphocytosis and the presence of $\geq 5 \times 10^9/L$ B lymphocytes in peripheral blood for a minimum period of 3 months. Evidence indicates that glucocorticoids (GCs) induce apoptosis in hematological cells, supporting their use as chemotherapeutic agents for leukemias, lymphomas, and myeloma. However, resistance mechanisms to these drugs have been described in patients with such hematological malignancies. GILZ (glucocorticoid-induced leucine zipper) is an immunomodulatory protein from the TSC22D family, expressed and induced by glucocorticoids in immune cells, playing a key role in regulating cell survival and apoptosis. It has been shown that reduced GILZ expression is associated with increased BCL2 expression and consequent decreased apoptosis of B cells in a preclinical murine model of senescence. The present study focused on evaluating the gene expression of GILZ and BCL-2 in patients with CLL (N=22) compared to healthy controls (N=21). Complete blood count, immunophenotyping by flow cytometry, and gene expression analyses of GILZ and BCL-2 by qPCR were performed. Correlation between clinical, laboratory, and gene expression data was investigated using linear regression and statistical tests. Reduced GILZ levels were observed in CLL patients compared to controls, but did not reach statistical significance. Regarding BCL-2 expression, our findings are consistent with previous studies, showing increased expression of this gene in CLL patients ($p = 0.008$). Moreover, it was found a correlation between GILZ and BCL2 ($R^2 = 0.3090$, $p = 0.04$), with no significant correlation between GILZ and hematological parameters. In summary, our study demonstrates that GILZ expression appears to be decreased in CLL patients, while BCL-2 expression is increased in the same group. Additionally, a significant correlation between these genes was observed. Given the known role of BCL-2 in promoting lymphocyte survival and that of GILZ in inducing apoptosis of these cells, these findings suggest a potential involvement of GILZ in lymphocyte survival from CLL patients, which warrants further investigation in different cohorts.

Keywords: GILZ; glucocorticoids; CLL; BCL-2.

LISTA DE ABREVIATURAS

API- Proteína ativadora -1 (*Activator protein -1*)

AVP- arginina vasopressina

BAD- Promotor de morte associado à BCL-2 (*BCL-2-associated death promoter*)

BAK- Antagonista/assassino homólogo a BCL-2 (*BCL-2 homologous antagonist/killer*)

BAX- Proteína X associada à BCL-2 (*BCL-2-associated X protein*)

BCL-2- Proteína associada ao linfoma de células B- 2 (*B cell lymphoma protein-2*)

BCL-W- Proteína associada ao Linfoma de células B-w (*B cell lymphoma-w*)

BCL-xl- Proteína associada ao Linfoma de células B-extragrande (*B-cell lymphoma-extra large*)

BCR- Região de ponto de quebra (*breakpoint cluster region*)

BCR-ABL- Região de ponto de quebra-gene de leucemia Abelson (*breakpoint cluster region-Abelson Leukemia Gene*), em homenagem a Herbert Abelson, que descobriu o gene

BFL-1/A1- Proteína A1 relacionada à BCL-2 (*The BCL-2-related protein A1*)

BH3- Domínio de homologia a BCL-2 (*BCL-2 homology domain 3*)

BID- Agonista de morte com domínio de interação BH3 (*BH3 interacting domain death agonist*)

BIK - Proteína pró-apoptótica que interage com BCL-2 (*BCL-2 interacting killer*)

BIM- Proteína mediadora da morte celular que interage com BCL-2 (*BCL-2 interacting mediator of cell death*)

BMF- Fator mortificador de BCL-2 BMF (*Bcl-2 Modifying Factor*)

BTK- Tirosina quinase de Bruton (*Bruton's tyrosine kinase*)

CD- Agrupamento de diferenciação (*Cluster of differentiation*)

CRH- hormônio liberador de corticotropina (*corticotropin releasing hormone*)

cDNA- DNA complementar (*complementary DNA*)

DNA- Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic acid*)

DUSP1- Fosfatase 1 de Especificidade Dupla (*Dual Specific Phosphatase*)

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*)

EROs- Espécies reativas do oxigênio (*Reactive oxygen species*)

FCR- Fludarabina, Ciclofosfamida e Rituximabe

GC's- Glicocorticoides (*Glucocorticoid*)

GILZ- Zíper de leucina induzido por glicocorticoide (*Glucocorticoid-induced Leucine Zipper*)

GREs- Elementos de resposta aos glicocorticoides (*Glucocorticoid response element*)

GR- Receptores de glicocorticoides (*Glucocorticoid receptor*)

HPA-Eixo Hipotálamo-Pituitária- Adrenal (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis*)

HRK- Ativador da Apoptose Harakiri (*Activator of apoptosis harakiri*), proteína interativa

BCL-2- Linfoma de células B-2 (*B Cell Lymphoma 2*)

IL-2- Interleucina- 2 (*Interleukin-2*)

INCA- Instituto Nacional de Câncer (*National Cancer Institute*)

L-GILZ- GILZ longo

LLC- Leucemia Linfocítica Crônica (*Chronic Lymphocytic Leukemia*)

LMC- Leucemia Mielóide Crônica (*Chronic Mmyeloid Leukemia*)

MAPK- Proteína cinase ativada por mitógeno (*Mitogen-activated protein kinase*)

MCL-1- Proteína de diferenciação de células leucêmicas mielóides induzida -1 (*Induced myeloid leukemia cell differentiation protein-1*)

miRNA -MicroRNAs

NF-κB- Fator Nuclear kappa B (*Nuclear Factor-kappa B*)

NOXA- Membro somente BH3 da família BCL-2 (*BH3-Only Member of the Bcl-2 Family*)

PUMA- Modulador da apoptose regulado por p53 (*p53- upregulated modulator of apoptosis*)

qPCR- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo

RAF- Membro da Família do Fibrossarcoma Rapidamente Acelerado (*Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*)

RAS- proteínas da família do vírus do sarcoma de rato (*The Rat Sarcoma vírus*)

ERK- Cinase regulada por sinal extracelular (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

RNA- Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic Acid*)

SPMs- Segundas malignidades primárias (*Second primary malignancy*)

TSC22D- Gene codificador de um membro da família de domínio TSC22 de fatores de transcrição de zíper de leucina (GILZ)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem ilustrativa de esfregaço sanguíneo de um paciente LLC

Figura 2- Fisiopatologia da LLC

Figura 3- Efeitos genômicos e não genômicos dos glicocorticoides

Figura 4- Ação dos glicocorticoides no sistema imune

Figura 5- Efeitos do GILZ nas células do sistema imunológico

Figura 6- Efeitos Antiapoptóticos da família BCL2

Figura 7- Fluxograma coleta e processamento de amostras de pacientes e controles

Figuras 8- Estratégia de gates usados nas análises de citometria

Figuras 9- Padronização amplificação TS22D3

Figura 10- Padronização amplificação BCL2

Figura 11- Expressão gênica de GILZ e BCL2 em pacientes dos grupos controle e LLC

Figura 12- Correlação de Spearman da expressão de *TSC22D3* e BCL-2 em indivíduos LLC

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Sistemas de estadiamento clínico da LLC

Quadro 2- Sistema de pontuação Matutes

Quadro 3- Representação do painel montado para os anticorpos analisados

Quadro 4- Sequência de primers utilizada para amplificação

Tabela 1- Caracterização dos pacientes e controles em relação a sexo

Tabela 2– Caracterização do Score de Matutes e comorbidades

Tabela 3– Caracterização do grupo controle e pacientes LLC em relação ao Hemograma

Tabela 4- Frequência de marcadores de LLC

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1 Leucemia Linfocítica Crônica	16
2.2 Glicocorticoides	20
2.3 GILZ – Um gene induzido por glicocorticoides	23
2.4 BCL-2	26
3 JUSTIFICATIVA.....	27
4 OBJETIVO.....	28
4.1 Objetivos Específicos.....	28
5 PROPOSTA METODOLÓGICA.....	28
5.1 Delineamento experimental	28
5.2. Descrição da população de estudo	29
5.3 Grupo Controle	30
5.4 Amostras	30
5.5 Hemograma Completo	30
5.6 Citometria de Fluxo	31
5.7 Avaliação da Expressão gênica de TSC22D3 e BCL2 através de qPCR em tempo real.....	32
5.8 Análise estatística	33
6 RESULTADOS.....	34
6.1 Caracterização dos pacientes e grupo controle	34
6.2 Hemograma	35
6.3 Citometria de Fluxo	35
6.4 Avaliação da Expressão gênica de TSC22D3 e BCL2 através de qPCR em tempo real.....	37
6.4.1 <i>Curva de eficiência da reação de TSC22D3 e BCL2.....</i>	<i>37</i>
6.5 Correlação de dados clínicos/ laboratoriais e GILZ.....	39
7 DISCUSSÃO.....	40

8 CONCLUSÃO.....	42
9 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS	51

1. INTRODUÇÃO

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença maligna caracterizada pelo acúmulo progressivo de células B, acometendo pacientes com idade média de 70 anos no momento do diagnóstico. Em sua maioria, os pacientes são assintomáticos, e a descoberta da doença é realizada acidentalmente, por exames de rotina, que revelam linfocitose absoluta com a presença de $\geq 5 \times 10^9/L$ de linfócitos B no sangue periférico por um período mínimo de 3 meses, juntamente com um imunofenótipo CD5+ e expressão dos antígenos de células B CD19, CD20 e CD23 (SHARMA; RAI, 2019; MAVRIDOU; PSATHA; AIVALIOTIS, 2021; SHADMAN, 2023.).

Os glicocorticoides (GCs) são uma classe de hormônios esteroides que regulam a resposta do corpo ao estresse. Nesse contexto, o estresse pode ser definido como uma resposta neuroendócrina inespecífica do corpo (SELYE, 1936). Sua atuação está entre as primeiras respostas fisiológicas ao estresse, contribuindo como mediadores anti-inflamatórios, afetando várias funções em diversos tecidos. Apesar da indução da apoptose de células linfoides ser a justificativa para o uso de GC em doenças linfo-hematopoiéticas, seus efeitos tóxicos e resistência fazem com que o uso de GC sintéticos como adjuvante para o tratamento do câncer seja controverso (HERR; PFITZENMAIER, 2006; AYROLDI et al., 2018; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2022).

Segundo AYROLDI e colaboradores (2018), GCs sintéticos são ferramentas terapêuticas cruciais que induzem a apoptose em células linfo-hematopoiéticas, por meio da regulação transcricional dos genes alvo, através da ativação dos receptores de GCs (GR), incluindo GILZ (zíper de leucina induzido por glicocorticoides). GILZ compõe o grupo de genes que são transcricionalmente induzidos pela ligação GC-GR (DELFINO et al., 2004) e é induzido de forma rápida e ampla em diversas células tratadas com GCs, modulando as mesmas vias de sinalização inflamatórias que os GCs, sugerindo que GILZ poderia se constituir em uma nova abordagem para o tratamento de doenças (BRUSCOLI et al., 2018; VAGO et al, 2020; VAGO et al, 2021).

Estudos utilizando modelos animais demonstram que GILZ é expresso em linfócitos B em diferentes tecidos linfoides e em diferentes estágios de desenvolvimento (BRUSCOLI et al., 2015), sendo capaz de reprimir diretamente Bcl-xL, se ligando-se ao promotor do gene e reprimindo sua transcrição, ou indiretamente, inibindo a atividade do fator de transcrição NF- κ B. Essa inibição desencadeia a via apoptótica mitocondrial com a liberação do citocromo C no citoplasma, e isso explica o achado dos animais deficientes em GILZ apresentarem

aumento de atividade de NF- κ B e superexpressão da proteína BCL-2 (B cell lymphoma protein-2) (DELFINO *et al.*, 2004; BRUSCOLI *et al.*, 2015).

As proteínas da família BCL-2 acima citadas desempenham um papel crucial na via intrínseca para indução de apoptose e na sobrevivência e diferenciação, sendo que expressão aumentada dessas proteínas estão entre os principais responsáveis pela resistência à morte celular programada observada em pacientes com malignidades linfoides como a LLC. A superexpressão mencionada anteriormente é comumente relatada nesses pacientes e tem como possíveis explicações a hipometilação do gene BCL-2 e a deleção dos genes que codificam miR-15 e miR-16 em 13q14 (HUANG *et al.*, 2015; MARQUES-PIUBELLI *et al.*, 2021; BRAGA *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2022). A apoptose prejudicada desempenha um papel fundamental na LLC e a inibição farmacológica de proteínas anti-apoptóticas/pró-sobrevivência, especialmente BCL2, representa uma maneira promissora de forçar a morte de células clonais e contornar resistências a terapias já existentes (MIHALYOVA *et al.*, 2018).

Neste sentido, é de se pensar nos possíveis papéis de GILZ na indução da apoptose de células B de pacientes leucêmicos. Estudos recentes correlacionam os níveis de GILZ com o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) (JOHA *et al.*, 2012) e da própria LLC (SHI *et al.*, 2019), tema do presente estudo. A principal vantagem é que GILZ além de ser induzido através da ligação GC ao GR, demonstra possuir outra via distinta de ativação, na qual se mantém todos os efeitos imunossupressores dos GC sem a presença dos efeitos metabólicos indesejáveis (CHENG; MORAND; YANG, 2014).

Desta forma, no presente estudo foi avaliado a expressão de GILZ e BCL-2 em pacientes com LLC, testando a hipótese: variação nos níveis de GILZ estão relacionados a patogênese da LLC.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Leucemia Linfocítica Crônica

A Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) é uma doença maligna caracterizada pelo acúmulo progressivo de células B CD5+, apresentando uma quantidade crescente de pequenos linfócitos neoplásicos de aspecto maduro no sangue (figura 1), medula óssea e tecidos linfoides secundários (KIPPS *et al.*, 2017). Esta enfermidade exibe uma alta diversidade biológica, genética, molecular e clínica (MAVRIDOU; PSATHA; AIVALIOTIS, 2021).

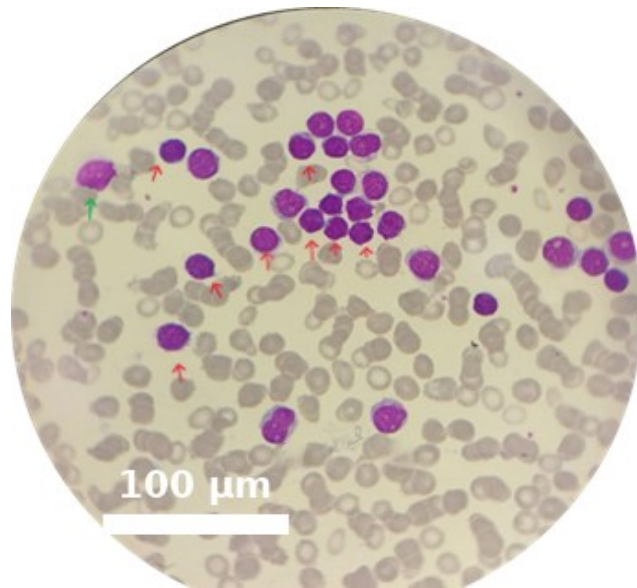


Figura 1: Imagem ilustrativa de esfregaço sanguíneo de um paciente LLC, onde é possível visualizar o aumento de linfócitos de aspecto maduro (seta vermelha) e Mancha de Gumprecht (seta verde). Fonte: próprio autor.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no relatório de 2022, a mortalidade por leucemias no Brasil em 2020 atingiu 6.738 óbitos (correspondendo a uma taxa de 3,18 por 100 mil habitantes). As projeções para o triênio de 2023 a 2025 indicam aproximadamente 11.540 novos casos de leucemia por ano, com um risco estimado de 5,33 casos a cada 100 mil habitantes, colocando-a como a décima neoplasia mais comum.

Estudo de Mavridou e colaboradores (2021) descreveram as características genéticas e metabólicas da LLC. Como demonstrado na figura 2, essas características são reconhecidas como relevantes na fisiopatologia da LLC, sendo que as mutações genéticas atuam de forma independente ou em combinação com rearranjos cromossômicos. A plasticidade metabólica engloba as principais vias de biogênese e bioenergética mitocondrial, bem como a produção de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) e a adaptação ao estresse oxidativo intrínseco, o qual é considerado elevado na LLC.

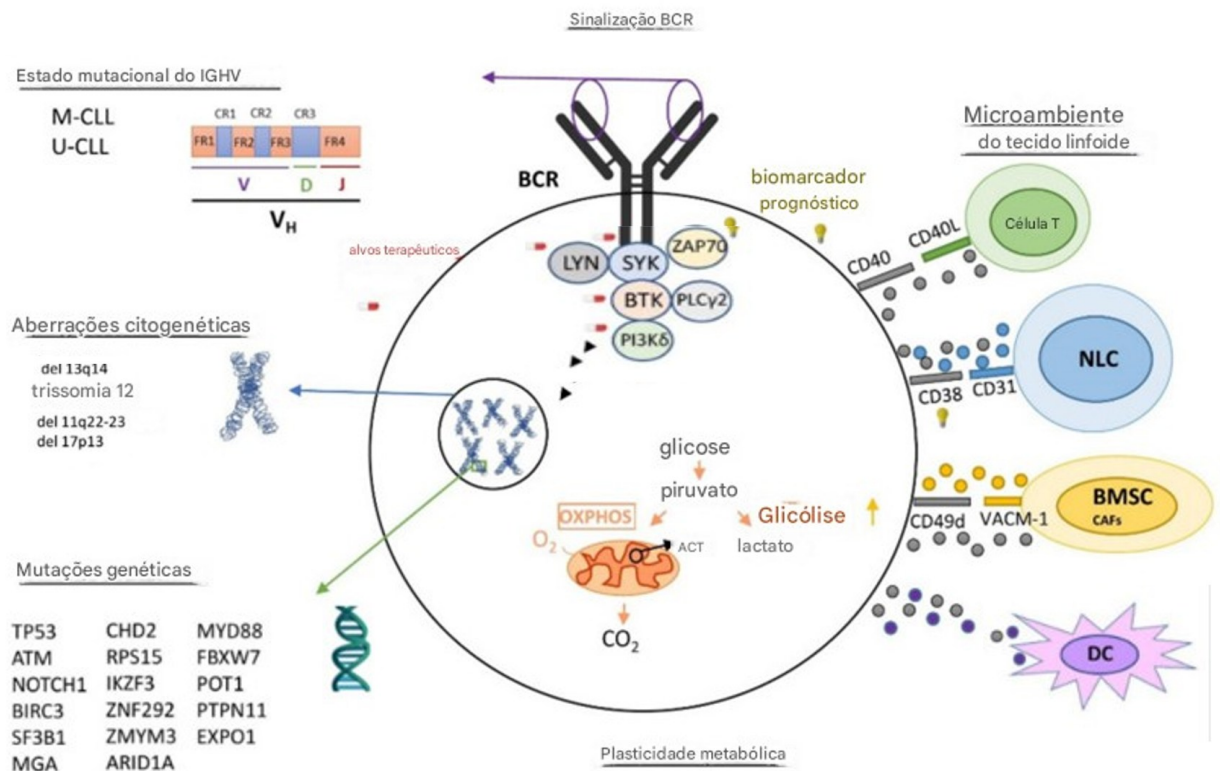


Figura 2: Fisiopatologia da LLC. Alguns dos elementos mais importantes da fisiopatologia da LLC são: (1) mutações genômicas altamente variáveis, (2) perda ou adição de grandes quantidades de material cromossômico, (3) status mutacional da região variável do IGHV, (4) ativação frequente de BCR sinalização e (5) sinais de proliferação contínua do microambiente canceroso. IGHV: genes de região variável de cadeia pesada de imunoglobulina; LLC-M: LLC mutada; U-CLL: LLC não mutada; BCR: receptor de células B; NLC: células semelhantes a enfermeiras; BMSC: células estromais da medula óssea; DC: células dendríticas; OXPHOS: fosforilação oxidativa; TCA: ciclo do ácido cítrico. Fonte: MAVRIDOU; PSATHA; AIVALIOTIS, 2021.

O diagnóstico da LLC é estabelecido pela presença de $\geq 5 \times 10^9/L$ de linfócitos B no sangue periférico por um período mínimo de 3 meses, juntamente com um imunofenótipo CD5+ e expressão dos antígenos de células B CD19, CD20 e CD23. Testes adicionais, incluindo testes genéticos, são necessários para determinar um perfil prognóstico além do estadiamento clínico (HALLEK et al., 2018). As aberrações genéticas na LLC podem incluir alterações cromossômicas, mutações, alterações na expressão de miRNAs e modificações epigenéticas (KIPPS et al., 2017).

A idade média no diagnóstico é de 70 anos e, em relação à sintomatologia, 70 a 80% dos pacientes são assintomáticos, sendo diagnosticados acidentalmente por exames de rotina, que revelam linfocitose absoluta. Cerca de um terço desses pacientes nunca precisará de tratamento para LLC (SHARMA; RAI, 2019; IYER; WANG, 2023; SHADMAN, 2023).

Após o diagnóstico, os pacientes são submetidos à estratificação de risco proposta por Rai e Binet, baseada em exames clínicos e laboratoriais (HALLEK; SHANAFELT; EICHHORST, 2018). Rai e colaboradores (1975) estabeleceram vários estágios com

significado prognóstico, enquanto Binet e colaboradores (1981) propuseram a definição de três grupos de classificação, correspondentes a pacientes de baixo, intermediário e alto risco. Atualmente, o estadiamento da LLC é realizado utilizando-se ambos os sistemas, Rai e Binet, baseando-se em variáveis clínicas e laboratoriais, incluindo presença e grau de citopenia, esplenomegalia e outros (Quadro 1). Além do estadiamento proposto, informações moleculares são cada vez mais utilizadas para aprimorar o prognóstico dos pacientes (SHADMAN, 2023).

Quadro 1- Sistema de estadiamento clínico na LLC

Sistema Rai		Sistema Binet		
Categoria de risco	Achados	Categorias do Estágio		
0	Baixo	Linfocitose	A	Sem citopenia e menos que três áreas linfoides envolvidas
1	Intermediário	Linfocitose e Linfadenopatia	B	Sem citopenia e envolvimento de > 3 áreas linfoides
2	Intermediário	Linfocitose e Hepatoesplenomegalia	C	Presença de anemia ou trombocitopenia
3	Alto	Linfocitose e anemia		
4	Alto	Linfocitose e Trombocitopenia		

Indivíduos são classificados nas categorias de risco proposta por RAI e BINET. Adaptado de SHADMAN (2023) e Conitec- Ministério da Saúde (2023)

Outra classificação relevante no diagnóstico da LLC é o escore proposto por Matutes (Quadro 2), que utiliza um sistema de pontuação baseado na expressão de antígenos pelos linfócitos, permitindo diferenciar a LLC de outras doenças linfoproliferativas que também apresentam linfocitose. Neste escore, a soma dos pontos é utilizada para estratificar os pacientes em dois grupos: uma pontuação de 3-5 favorece o diagnóstico de LLC, enquanto uma pontuação de 0-2 favorece outra doença linfoproliferativa B (MATUTES et al., 1994; MATUTES; POLLIACK, 2000).

Quadro 2: Sistema de pontuação de Matutes

Marcador	Pontos	
	1	0
CD5	Positivo	Negativo
CD23	Positivo	Negativo
FMC7	Negativo	Positivo
sIg	Fraco	Moderado/forte
CD22/CD79b	Fraco/negativo	Moderado/forte

CD: Grupo de diferenciação; sIg: Imunoglobulina de superfície. As pontuações para LLC variam de 3 a 5, enquanto a pontuação de 0 a 2 é relacionada a outros distúrbios de células B. Adaptado de MATUTES et al (1994) e MATUTES; POLLIACK, (2000).

Pacientes em estágio inicial da doença e assintomáticos (estágio Rai 0 e A de Binet) são geralmente mantidos em observação clínica (conhecida como "*watch and wait*"), sem iniciar terapia citotóxica (SHARMA; RAI, 2019). O momento para iniciar o tratamento depende principalmente da avaliação da situação clínica da doença e da apresentação molecular (SHADMAN, 2023). Atualmente, entre as principais opções de tratamento, estão os inibidores ou antagonistas de BCL2, administrados isoladamente ou em combinação com

anticorpos monoclonais (HALLEK et al., 2018). No Brasil, a terapia de primeira linha mais comum é a imunoterapia com FCR (fludarabina, ciclofosfamida e rituximabe). O Grupo Brasileiro de LLC recomenda a avaliação da adequação do paciente à terapia proposta de acordo com uma escala previamente estabelecida (MINISTÉRIO DA SAÚDE/CONITEC, 2024).

Apesar dos avanços científicos no tratamento e prognóstico, há uma lacuna translacional entre o conhecimento básico e sua aplicação clínica na LLC. Mesmo com as estratégias terapêuticas atuais e melhorias, observa-se um aumento nas taxas de incidência e nas segundas malignidades primárias (SPMs), resultando em um crescente número de óbitos (MAVRIDOU; PSATHA; AIVALIOTIS, 2021).

2.2. Glicocorticoides

O estresse pode ser definido como uma resposta neuroendócrina inespecífica do corpo (SELYE, 1936). Nesse contexto, uma série de estímulos, seja biológico (oxidativos, hemodinâmicos, metabólicos, entre outros), mentais e emocionais, evoca uma resposta ao estresse, que visa restaurar a homeostase e facilitar a adaptação (CHOW et al., 2010; CAPPETTA et al., 2021; CHEN et al., 2022.).

Os glicocorticoides (GCs) são uma classe de hormônios esteroides que regulam a resposta do corpo ao estresse. Em conjunto com outros componentes do sistema de resposta, os GCs coordenam o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal). A regulação dos genes-alvo ocorre pela ligação dos GCs aos receptores de glicocorticoides (GRs), modulando assim a fisiologia e o comportamento (CHOW et al., 2010; AHMAD et al., 2021; CAPPETTA et al., 2021). A secreção de cortisol (GC endógeno) ocorre pelas glândulas supra-renais na corrente sanguínea, atingindo tecidos e órgãos, onde coordena importantes processos como imunidade, fisiologia, metabolismo catabólico, cárdio circulatório, renal, entre outros (JURUENA; CLEARE; PARIANTE, 2004; CAPPETTA et al., 2021).

Resumidamente, após o processamento de um estímulo estressante, o hipotálamo desencadeia a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) e arginina vasopressina (AVP). Após a secreção, o CRH é liberado no sistema portal hipofisário, conectando-se à parte anterior da glândula pituitária, formando o eixo HPA (hipotálamo-pituitária-adrenal) e estimulando a liberação contínua de cortisol na circulação sanguínea (MICALE, VINCENZO; DRAGO, FELIPPO, 2018; CUI et al., 2021).

Estudos demonstram que as atividades dos glicocorticoides podem ser divididas em efeitos genômicos e não genômicos (STAHN et al., 2007). Conforme demonstrado na

imagem 3, os efeitos genômicos podem ser divididos em três mecanismos: transativação ou transrepressão gênica, transrepressão gênica por interação proteína-proteína e ligação ao elemento compositivo (Figura 3) (RATMAN et al., 2013; CAIN; CIDLOWSKI, 2017).

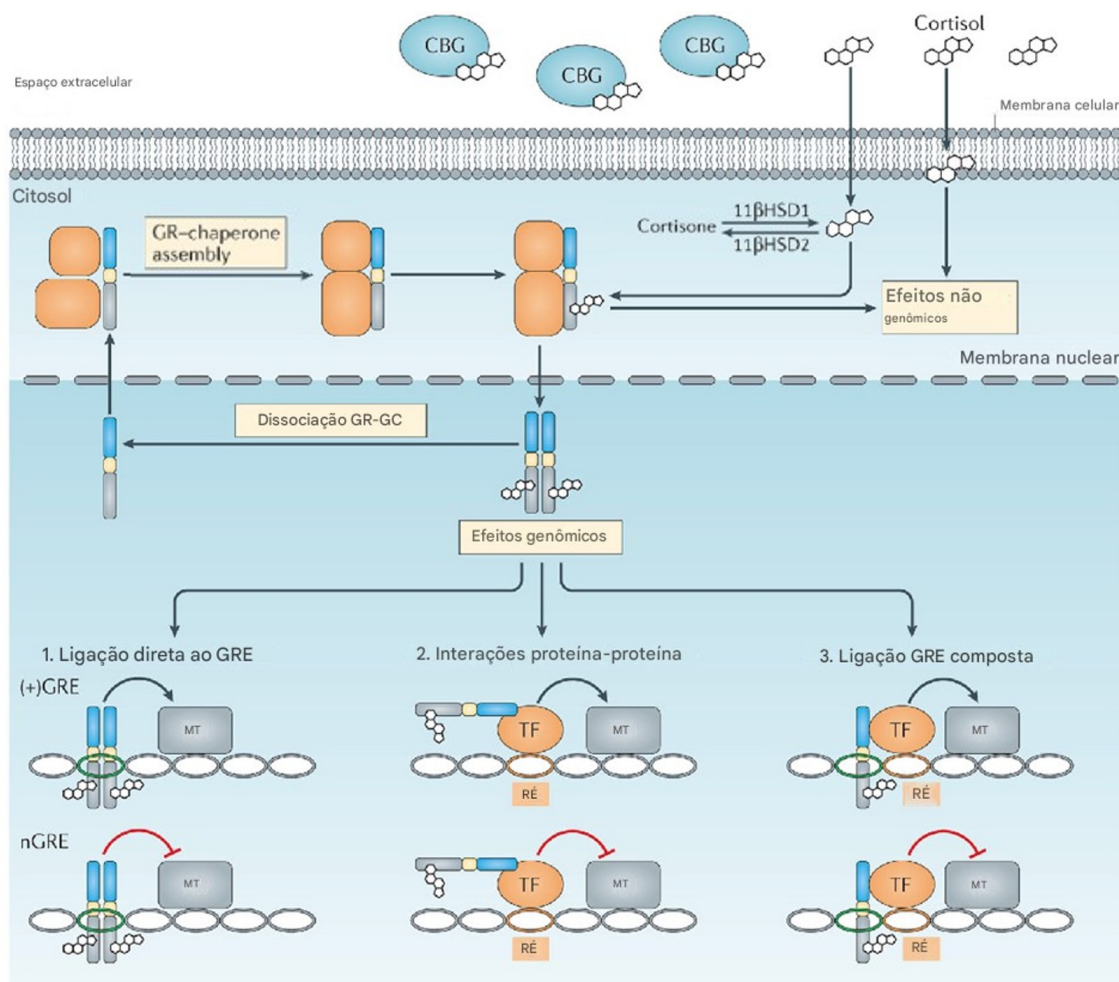
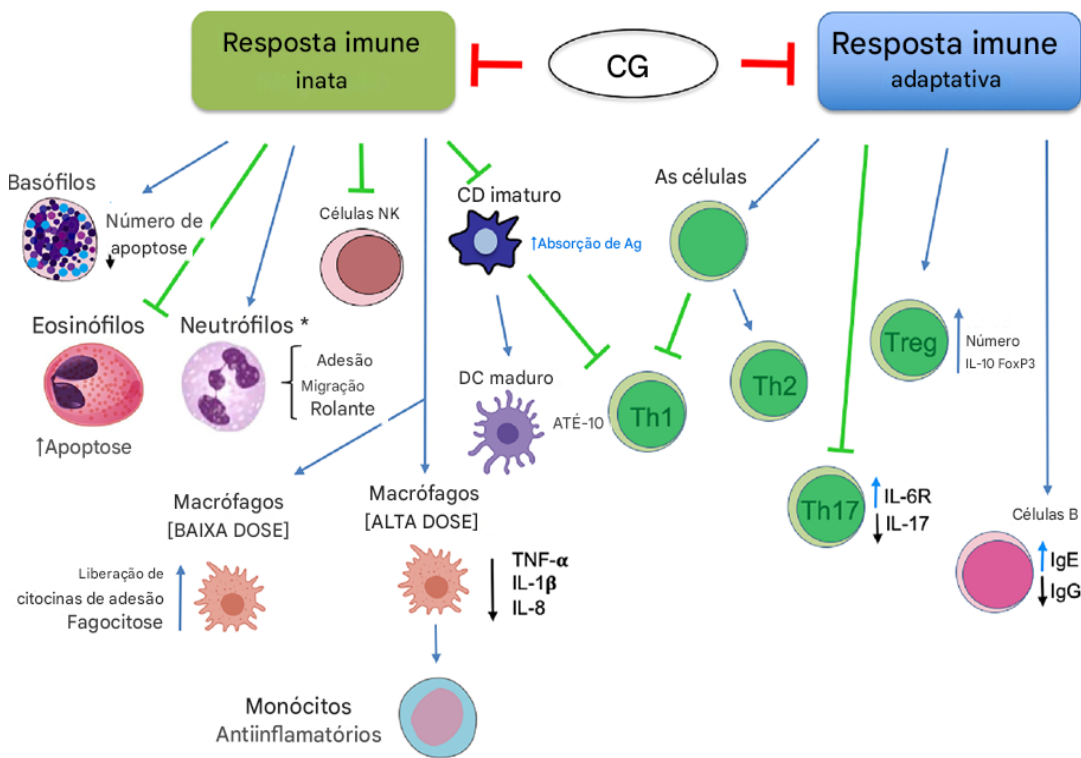


Figura 3: Efeitos genômicos e não genômicos dos glicocorticoides. Atividade dos GCs, divididos em efeitos genômicos e não genômicos. Em efeitos genômicos, se observa três mecanismos, sendo eles: ligação direta a elementos de resposta GC (+GREs) ou GREs negativos (nGREs); interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (TFs) que afetam sua atividade transcricional; e ligação composta a substratos de DNA e proteínas. Fonte: Cain e Cidlowski (2017):

A transativação é o mecanismo genômico clássico de ação dos glicocorticoides e acredita-se que seja também responsável pelos seus efeitos colaterais. A formação do complexo GC/GR resulta em sua translocação para o núcleo como um homodímero e ligação em locais específicos de ligação ao DNA na região promotora de diferentes genes-alvo, conhecidos como elementos de resposta aos glicocorticoides (GREs). Esse processo é responsável pela ativação da transcrição de proteínas anti-inflamatórias e reguladoras, como exemplificado pela regulação positiva de genes como GILZ e DUSP1 (STAHN *et al.*, 2007; STREHL *et al.*, 2019).

Os glicocorticoides atuam regulando o sistema imune e promovendo atividade anti-inflamatória (figura 4). De forma geral, os GCs sintéticos diminuem liberação de citocinas pelas células imunes, induzem apoptose e controlam a proliferação celular, regulando assim o tráfego e o acesso dos leucócitos ao local da inflamação. Um exemplo é a ação dos glicocorticoides sobre macrófagos, células dendríticas e células T, resultando em imunossupressão (STAHN; BUTTGEREIT, 2008; AYROLDI *et al.*, 2018). Bruscoli e colaboradores (2021) descrevem como o eixo HPA atua no sistema imunológico durante processos inflamatórios. Conforme descrito, o eixo HPA regula vias genômicas e não genômicas durante a inflamação, bloqueando assim a ativação, migração e proliferação de células imunes do sistema imune inato e adaptativo.

De acordo com Cain e Cidlowski (2017), o receptor de glicocorticoides expresso em células B afeta vários fatores de transcrição a jusante da sinalização do receptor de células B (BCR).



* Os GC também modulam a expressão de moléculas de adesão, selectinas e quimiocinas.

Figura 4. Ação dos glicocorticoides no sistema imune. Esquema dos efeitos dos GC na resposta imune inata e adaptativa. Setas verdes indicam regulação positiva, setas azuis indicam regulação negativa. Adaptado de Bruscoli et al 2021

Em relação ao câncer, os glicocorticoides ocupam atualmente uma posição central no arsenal terapêutico para o manejo de tumores sólidos ou hematológicos. Evidências indicam que os GCs induzem apoptose em células hematológicas, apoiando assim seu uso como agentes quimioterápicos para leucemias, linfomas e mieloma, ao passo que mecanismos de resistência a esta classe de fármaco, já foram descritos em pacientes com essas malignidades hematológicas (WEI *et al.*, 2006; KALFEIST *et al.*, 2022)

A modulação da apoptose e da proliferação celular, conforme descrito acima, tem seu espaço quando se fala em câncer. Isso porque em diversas doenças, incluindo as malignidades linfo-hematopoiéticas, a inibição da apoptose pode resultar em falha nas terapias ou até mesmo na piora da doença. Apesar de o aumento da apoptose de células linfoides justificar o uso de GCs em doenças linfo-hematopoiéticas, ainda é necessário novos estudos que aprofundem o conhecimento posto, visto que seus efeitos tóxicos e a resistência são uma realidade (HERR; PFITZENMAIER, 2006; AYROLDI; RICCARDI, 2009; AYROLDI *et al.*, 2018; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2022).

2.3. GILZ – Um gene induzido por glicocorticoides

GILZ é uma proteína imunomoduladora pertencente à família *TSC-22D* (Domínio do Clone 22 Estimulado pelo Fator de Crescimento Transformante beta), sendo também denominada *TSC-22D3* (PÉPIN *et al.*, 2016), foi identificada em 1997 em um estudo desenvolvido para caracterizar genes transcricionalmente induzidos por dexametasona (D'ADAMIO *et al.*, 1997). Caracterizada como uma proteína de 135 aminoácidos, GILZ medeia diversos efeitos dos GCs, incluindo a inibição das vias de NF- κ B, MAPKs (proteína cinase ativada por mitógenos) e AP-1 (proteína ativadora 1), estando envolvido nas mesmas respostas imunes de sinalização e vias relacionadas à inflamação implicadas nas atividades anti-inflamatórias e imunossupressoras induzidas por GCs (ASSELIN-LABAT *et al.*, 2004; BERESHCHENKO *et al.*, 2019).

Diferentemente de outras proteínas zipper de leucina, GILZ não possui domínio básico necessário para se ligar ao DNA e não há domínios canônicos de ligação ao DNA ou sinal de localização nuclear. Sua atuação está relacionada à inibição de vias de transdução de sinal como os fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 e das MAPKs, um mecanismo de ação comum à GILZ e GCs. (BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2022). Ainda é reportado na literatura uma variante transcrita de GILZ, Long-GILZ (L-GILZ), sendo esta regulada positivamente por GCs, mas difere de GILZ em algumas características funcionais

(AYROLDI et al., 2018).

Cannarile e colaboradores (2001) mostraram que GILZ é expresso e induzido por GCs em células do sangue periférico, desempenhando um papel fundamental no controle da sobrevivência celular e da apoptose, podendo ter função anti ou pró-apoptótica. Como exemplo, temos a indução da apoptose em alguns tipos de células, como em timócitos, onde a indução do apoptose se dá pela regulação negativa da expressão de BCL-xL (uma proteína anti-apoptótica da família BCL2) e ativação das caspases apoptóticas 8 e 3 (MUSCARI et al., 2020; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2022). Além disso, GILZ induz apoptose de neutrófilos e contribui para a resolução do processo inflamatório agudo, por meio da sua ação imunomoduladora (VAGO et al., 2015).

Em relação às células hematopoiéticas, a atuação de GILZ já foi descrita em neutrófilos, monócitos, células dendríticas, linfócitos T e B (figura 5). Foi mostrado ainda que a expressão de GILZ é aumentada durante a fase resolutive da inflamação e que a administração do peptídeo TAT-GILZ (uma proteína de fusão com GILZ e permeável à célula), no pico da inflamação, promove uma diminuição do número de neutrófilos viáveis e aumenta o número de neutrófilos apoptóticos, os quais são marca de uma resolução eficiente (VAGO et al., 2015).

A expressão de GILZ é evidente em diferentes estágios do desenvolvimento de células B e é regulada pelo tratamento com GCs. Um estudo em modelo murino de senescência sugere que GILZ possa estar relacionado a doenças hematológicas envolvendo células B, uma vez que animais deficientes em GILZ tiveram aumento da sobrevivência de células B com superexpressão de BCL-2, proteína conhecida por sua atividade anti-apoptótica/pró-sobrevida. No estudo mencionado, a falta da proteína em camundongos deficientes em GILZ resulta em desregulação da sobrevivência de células B a partir do estágio de célula PréB (BRUSCOLI et al., 2015; BRUSCOLI; RICCARDI; RONCHETTI, 2022).

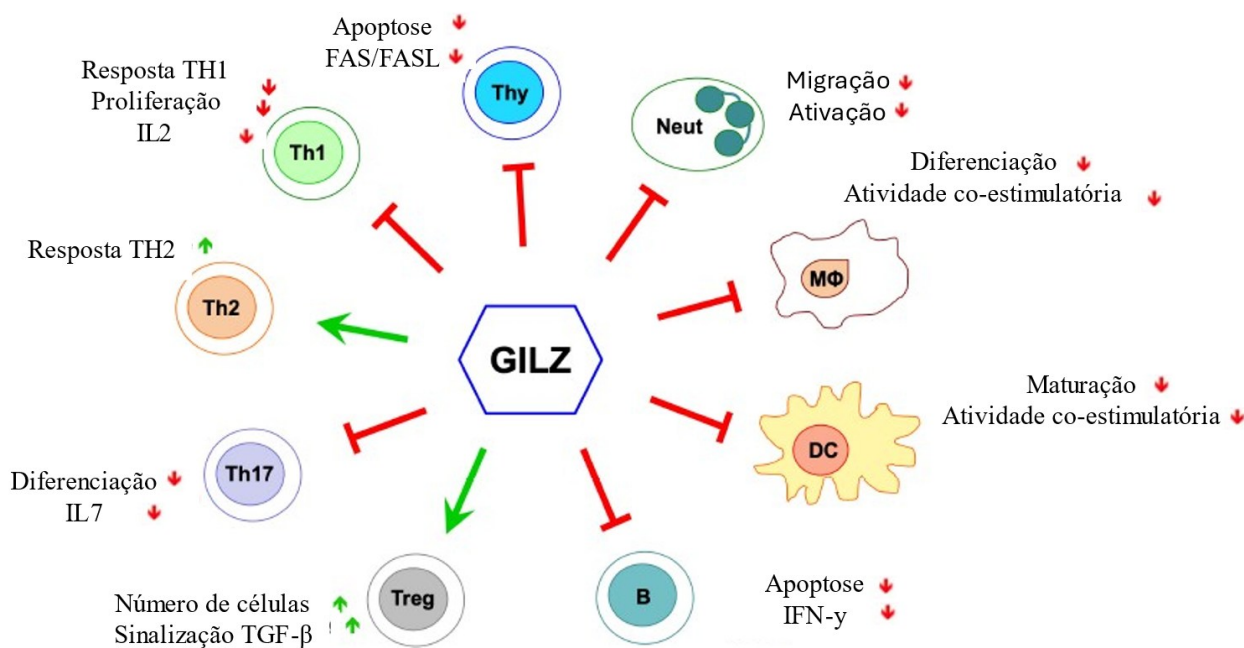


Figura 5: Efeitos do GILZ nas células do sistema imunológico. As setas verdes indicam regulação positiva, as linhas vermelhas indicam regulação negativa. Neutro: neutrófilos; MΦ: monocitos/macrófagos; DC: células dendríticas; B: células B; Treg: células T reguladoras; Thy: Timócitos. Adaptado de Bereshchenko et al 2019.

Sabemos que a inflamação desempenha um papel importante no início da conversão maligna e na promoção do crescimento tumoral e da metástase (AYROLDI et al., 2018), mas o papel de GILZ no câncer, assim como de GCs de forma geral, ainda é controverso, uma vez que pode promover ou suprimir o crescimento tumoral, dependendo do tipo de tumor e de seu microambiente (XU et al., 2023).

Pesquisadores mostraram que em tumor sólido, a super-expressão de GILZ (*TSC22D3*) pode eliminar os efeitos de inibição do crescimento tumoral na quimioterapia, enquanto a deleção de GILZ em células dendríticas atenuou a imunossupressão induzida por stress em tumores sólidos, sugerindo que o gene *TSC22D3* seja um gene associado à mau prognóstico (YANG et al., 2019). Com relação as doenças linfoproliferativas, alguns trabalhos indicam que o aumento da expressão de GILZ favorece a apoptose, auxiliando assim no controle do câncer. Como dito anteriormente, GILZ regula negativamente Bcl-xL, e inibe a via das MAPKs, ambas as vias são pró-sobrevida. Além disso, glicocorticoides também inibem duas das principais vias envolvidas na oncogênese, a via do fator nuclear-κB e a via Raf/Ras/ERK (AYROLDI et al., 2001, 2002).

Na leucemia mielocítica aguda, alguns trabalhos demonstraram que a expressão de GILZ é aumentada em tecidos adultos, associada a altas contagens de leucócitos e de blastos, apresentando dessa forma um risco citogenético desfavorável, taxas de sobrevivência mais

curtas e pior prognóstico (LI et al., 2023; XU et al., 2023). Em contrapartida, na leucemia mieloide crônica, Joha e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão da proteína GILZ estava diminuída em algumas linhagens celulares BCR-ABL+. Ainda, com a restauração na expressão de GILZ, células resistentes ao imatinibe foram novamente sensibilizadas, regulando positivamente a expressão de Bim (uma molécula pró-apoptótica da família BCL2) e diminuindo a expressão de BCL-2 em células humanas e de camundongo que expressam BCR-ABL, sugerindo que GILZ possa ser um regulador essencial de BCR-ABL.

Um estudo do papel de GILZ no mieloma múltiplo identificou a regulação dupla de GILZ por duas vias principais necessárias para a proliferação e morte na doença, a via da PI3-quinase/AKT e GR, desempenhando um papel funcional na morte celular induzida por GCs (GRUGAN et al., 2008).

Como já descrito anteriormente em modelo animal de senescência, os níveis reduzidos de GILZ foram relacionados com aumento de BCL-2 e conseqüente diminuição da apoptose de células B (BRUSCOLI et al., 2015). Um estudo mostrando o papel de GILZ em células B no lúpus eritematoso, demonstrou seu papel protetor na regulação de células B, sugerindo que GILZ poderia se constituir em uma forma de inibir eventos patológicos dependentes de células B (JONES et al., 2016).

2.4. BCL-2

Um dos mais importantes mecanismos relacionados à fisiopatologia da LLC é a perda da capacidade de morte celular programada, devido a hiperexpressão de várias proteínas antiapoptóticas, dentre elas a BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*). As proteínas da família BCL-2 são reguladoras críticas da apoptose celular, e em muitos estudos demonstraram que sua super-expressão aumenta a resistência à apoptose. Além disso, o potencial oncogênico de BCL-2 foi confirmado em modelos de camundongos (PACKHAM; STEVENSON, 2005). Na LLC, a super-expressão de BCL2 é resultado do aumento da transcrição ou perda de miRNAs que atuam como seus reguladores negativos sendo que os mais comuns na fisiopatologia da LLC são as deleções de miR-15A e miR-16-1, (STILGENBAUER et al., 2016; SKELIN et al., 2024).

A família BCL-2 é dividida em três grupos com base na sua função primária, sendo a primeira formada por proteínas anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1), a segunda por proteínas pró-apoptóticas formadoras de poros (BAX, BAK, BOK) e a última são proteínas pró-apoptóticas somente BH3 – como BAD, BID, BIK, BIM, BMF,

HRK, NOXA, PUMA, entre outras (MIHALYOVA et al., 2018; KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018; KOPPARAPU et al., 2023). Dessa forma, a apoptose intrínseca (mitocondrial) é estritamente governada pela família de proteínas BCL-2 (figura 6), que determina o destino celular através do equilíbrio preciso de fatores pró e anti-apoptóticos. Esse conhecimento levou ao desenvolvimento de inibidores específicos da família BCL-2. Estes miméticos sintéticos de homologia 3 de BCL-2 (BH3) ligam-se com alta afinidade a fatores anti-apoptóticos para superar a evasão apoptótica na malignidade (FOWLER-SHORTEN et al., 2024). Desde 2013, a disponibilidade de terapias direcionadas, como inibidores de BTK, anticorpos direcionados a CD20 e inibidores de BCL-2, substituíram amplamente a quimioimunoterapia como opção terapêutica preferida para o tratamento de primeira linha ou subsequente de LLC (MUTHIAH et al., 2024).

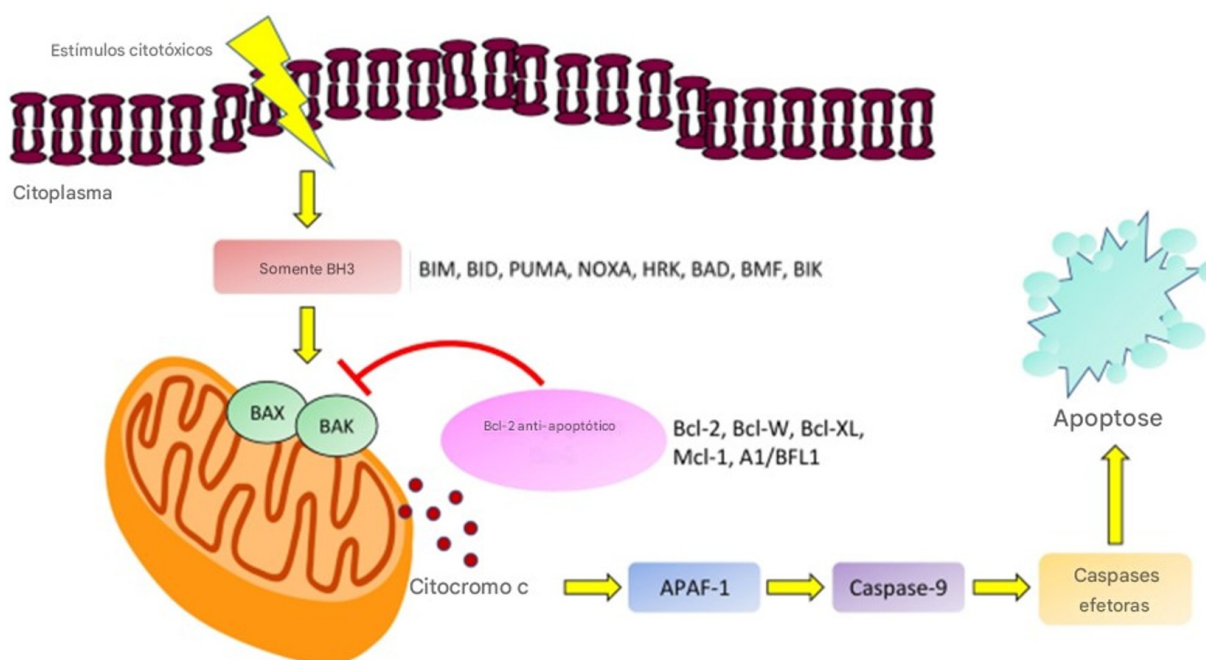


Figura 6: Mecanismo de apoptose mediado por proteínas da família BCL2. Um modelo da via intrínseca de apoptose iniciada por estímulos citotóxicos. As proteínas da família BCL-2 exercem seu efeito anti-apoptóticos inibindo as proteínas BAX, BAK e BH3 e conseqüentemente protegendo a mitocôndria de perda de potencial de membrana e liberação de citocromo c, o qual posteriormente desencadearia a ativação de caspases apoptóticas. Fonte: PLOUMAKI et al., 2023

3. JUSTIFICATIVA

A pesquisa sobre o papel de GILZ em doenças linfoproliferativas, particularmente em células B, ainda é limitada. Portanto, é crucial investigar os possíveis efeitos de GILZ na indução da apoptose de células B em pacientes com leucemia, para melhor entendimento acerca do papel de GCs nessas doenças.

Diante da lacuna de conhecimento sobre o papel da proteína GILZ em pacientes com

LLC, é necessário aprofundar nossa compreensão do seu comportamento, visando enriquecer a discussão sobre o seu papel. Assim, a obtenção de *insights* mais robustos pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes no tratamento de doenças linfoproliferativas.

Se tratando da expressão de BCL-2, apesar de bem estudada sua relação com a LLC, o estudo da possível correlação com GILZ seria importante para ampliar e direcionar as pesquisas de medicamentos que possam alterar o estado de superexpressão de BCL-2 e, conseqüentemente o aumento da apoptose, reduzindo o uso de quimioterapias tradicionais.

Assim, pretendemos com este estudo, mensurar a expressão de GILZ em pacientes com leucemia linfocítica crônica e avaliar sua possível correlação com BCL-2, um gene sabidamente superexpresso em pacientes com LLC.

4. OBJETIVO

Avaliar a expressão gênica de GILZ e BCL-2 em amostras de pacientes com leucemia linfocítica crônica, além analisar possíveis correlações da expressão de GILZ com os dados clínicos e laboratoriais e com a expressão de BCL-2

4.1. Objetivos específicos

- Caracterizar fenotípicamente os pacientes;
- Avaliar o grupo de estudo em relação ao Score de Matutes;
- Avaliar a expressão dos mRNAs de GILZ e BCL2 em pacientes com LLC e controles sem a doença e a correlação entre esses genes;
- Avaliar possíveis correlações entre o perfil hematológico dos pacientes e a expressão de GILZ;
- Avaliar possíveis correlações entre comorbidades e GILZ.

5. PROPOSTA METODOLÓGICA

5.1. Delineamento experimental

Para melhor entendimento da metodologia utilizada no presente estudo, encontra-se

abaixo o fluxograma com todas as etapas realizadas.

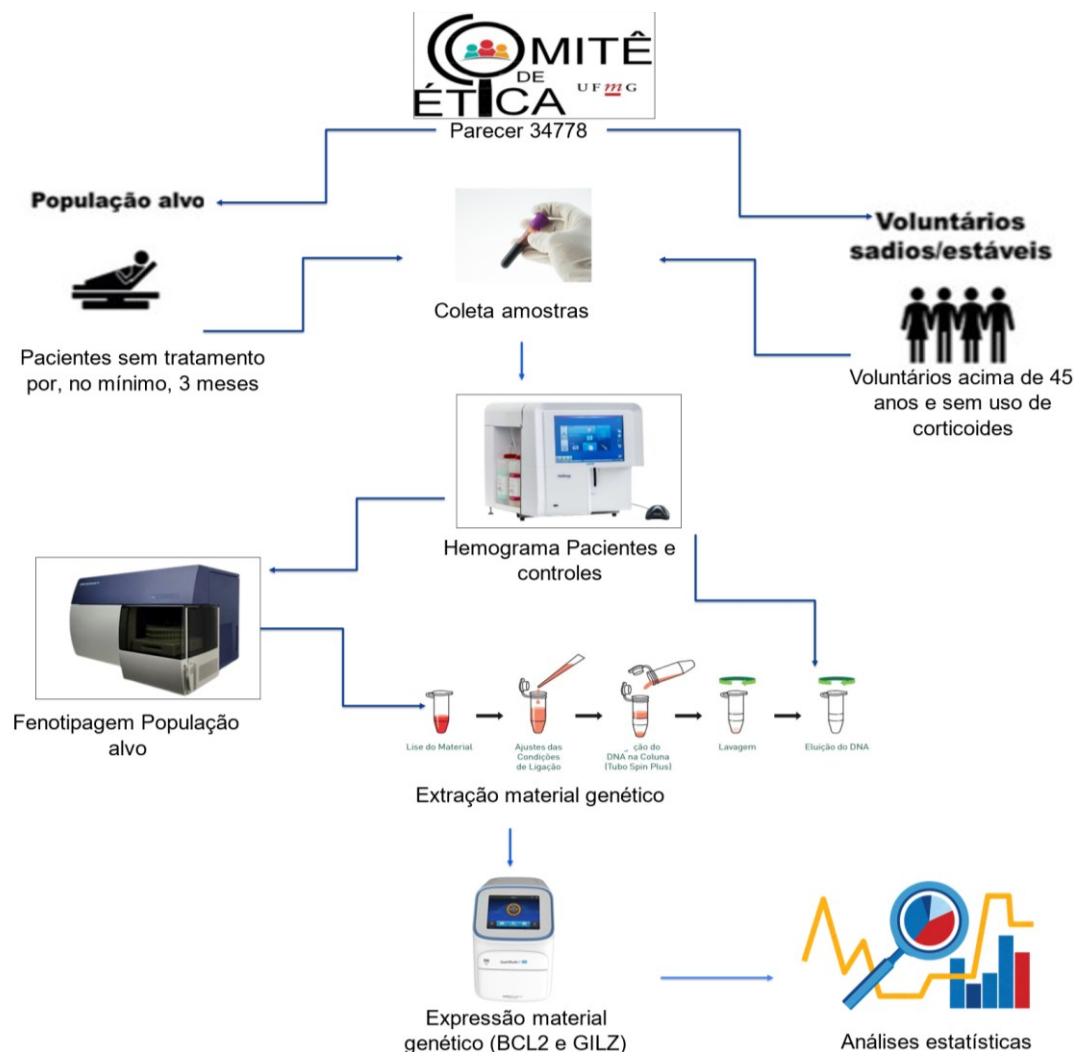


Figura 7: Fluxograma coleta e processamento de amostras de pacientes e controles. sangue total venoso em tubos contendo K3 – ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta foram realizados o hemograma dos grupos de estudo e controle e fenotipagem do grupo de estudo. Após triagem inicial amostras foram lisadas, para posterior extração do material genético, seguida de sua expressão e análises estatísticas.

5.2. Descrição da população de estudo

Os pacientes participantes do estudo foram selecionados pelos médicos hematologistas do Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais, dos quais foi obtida amostra de sangue. O presente estudo está aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP), Projeto CAAE No

02177612.0.00005149, conforme parecer 34778, emenda E3/2016. Foi preenchida uma ficha clínica para cada paciente, após eles terem sido esclarecidos acerca dos objetivos do estudo e após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 2013).

Foram selecionados pacientes com idade igual ou superior a 44 anos com diagnóstico de Leucemia Linfocítica Crônica, de acordo com os critérios estabelecidos no guidelines 2020 (WIERDA W G et al., 2020), e que estavam sem tratamento iniciado, ou com tratamento não realizado nos últimos três meses. Os prontuários dos pacientes selecionados foram analisados para obtenção de dados hematológicos, imunofenotípicos e achados clínicos.

Pacientes em uso de medicamentos/terapias para LLC e menores de 44 anos foram excluídos.

5.3. Grupo Controle

Para o grupo controle, foram selecionados indivíduos vinculados à Associação de Servidores da UFMG (ASSUFEMG) em Belo Horizonte, Minas Gerais, utilizando-se o espaço gentilmente cedido pela associação. Foram coletadas amostras de 21 indivíduos aparentemente hígidos, sem distúrbios hematológicos, com idade e nível socioeconômico similar ao grupo experimental. A coleta de sangue foi feita de forma voluntária, onde os indivíduos foram esclarecidos a respeito dos objetivos do estudo e da importância de sua participação. Todos os participantes deste grupo também assinaram o TCLE. Adicionalmente, visando reduzir as interferências, todos os participantes, no momento da coleta, estavam sem uso de corticoides.

5.4. Amostras

Foram coletados 10 mL de sangue total venoso em tubos contendo K3 – ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1,8mg/nL (VACUETTE®) de cada integrante do estudo por coleta a vácuo. As amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em caixas de transporte de material biológico e direcionadas ao Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental da Faculdade de Farmácia da UFMG, onde ocorreu o processamento e armazenamento através de metodologia específica.

5.5. Hemograma completo

As amostras encaminhadas ao laboratório de hematologia foram analisadas,

por meio de aspiração automática de 20 µL de sangue total pelo equipamento Yumizen H500/H550 (Horiba Medical), localizado no laboratório de hematologia da faculdade de farmácia da UFMG.

5.6. Citometria de Fluxo

As análises foram realizadas no analisador de células LSRFortessa, presente no Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), também localizado na faculdade de farmácia da UFMG, foram utilizados 100 µL de sangue total marcados com anticorpos específicos. A escolha dos anticorpos utilizados foi baseada nas recomendações do Grupo Brasileiro de Citometria de Fluxo (GBCFLUX) e Euroflow para diagnóstico de leucemias utilizando painéis de citometria de fluxo (VAN DONGEN *et al.*, 2012; CORREIA *et al.*, 2015). Foram utilizados os seguintes marcadores: CD4, CD5, CD8, CD19, CD20, CD22, CD38, CD45- onde foram montados painéis de acordo com a fluorescência dos anticorpos. A seguir o quadro representando o painel montado para anticorpos analisados.

Quadro 3: Representação do painel montado para os anticorpos analisados

		Anticorpos	
Painel A	CD5	CD19	CD45
Painel B	CD4	CD22	CD38
Painel C	CD8	CD20	CD45
Painel D	Não marcado		

Foram montados quatro painéis, sendo o não marcado utilizado como controle, para identificar características próprias das células. Fonte: próprio autor.

A análise foi realizada utilizando-se a estratégia de gates, com diferentes combinações monoclonais de acordo com British Committee for Standards in Haematology (BCSH) (MARTI *et al.*, 2005), utilizando-se o software FLOWJO. A compensação da fluorescência foi realizada, a fim de se evitar a sobreposição das cores emitidas pelos fluorocromos, e o controle FMO (Fluorescence Minus One Control) foi aplicado para cada amostra. O objetivo do uso do FMO foi identificar o ponto de corte entre as fluorescências negativa, possíveis interferências de fluorescências entre detectores e a marcação positiva em painéis.

A caracterização fenotípica realizada foi confrontada com a já presente nos prontuários dos pacientes. Além dos anticorpos acima, o painel de fenotipagem realizado pelo serviço de saúde contava com os seguintes marcadores: CD23, IGM, KAPPA, FMC7.

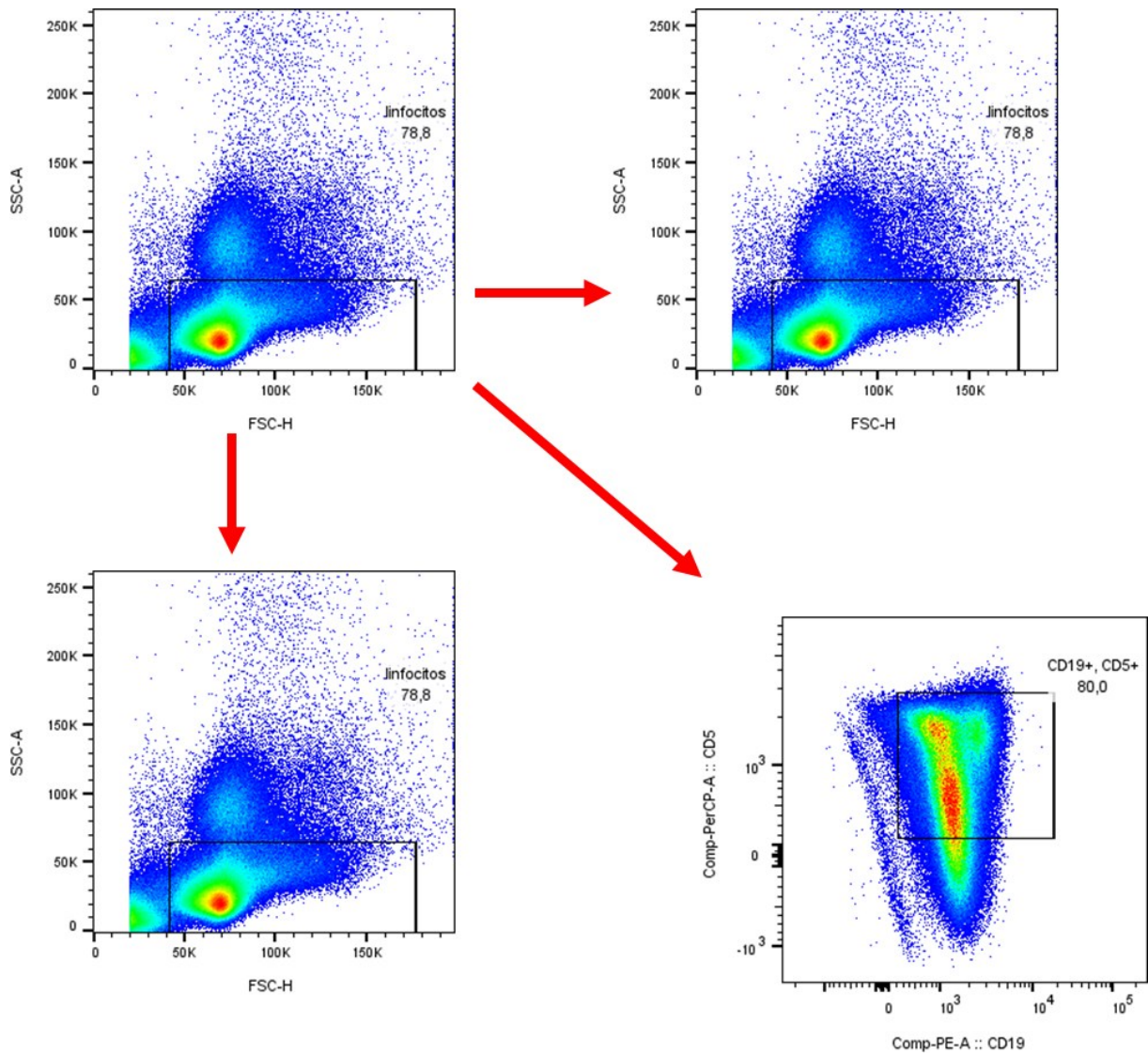


Figura 8. Estratégia de gates usados nas análises de citometria. Perfil paciente CD19/CD5 positivo

5.7. Avaliação da Expressão gênica de *TSC22D3* e *BCL2* através de qPCR em tempo real

Para a análise por qPCR, inicialmente foi realizada a lise celular das amostras de sangue total dos grupos de pacientes e controle, através de uma solução de cloreto de amônio. O processo baseia-se na ruptura da membrana plasmática da célula e a liberação do material intracelular, para posterior purificação do material genético.

Após o processo de lise celular, foi realizada a extração dos ácidos nucleicos com o uso do kit ALLPREP DNA/RNA MINI KIT (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante.

A concentração de RNA total após purificação foi determinada através de absorbância no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Os RNA's foram convertidos a cDNA com o kit High- Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Biosystems), também de acordo

com o protocolo dos fabricantes.

Para a reação em cadeia de polimerase, foi utilizado o Kit QuantiNova no parêlho QuantStudio 5 (QIAGEN®), onde os transcritos de GILZ (*TSC22D3*) e BCL-2 foram amplificados com os iniciadores indicados a abaixo, assim como o transcrito do gene de referência GAPDH:

Quadro 4: Sequência de primers utilizada para amplificação

<u>Primer</u>	<u>Sequência Utilizada</u>
GILZ-F	CCGACAAGCTCAACAGCATA3'
GILZ-R	5'GTGGAAGAAGAGCAGGATGG3'
BCL-2-F	5' TCCGCATCAGGAAGGCTA3'
BCL-2-R	5'AGGACCAGGCCTCCAAGT3
GAPDH-F	5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'
GAPDH-R	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'.

Fonte: (SHI *et al.*, 2019)

5.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se o software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software), e apresentados como média e desvio padrão no caso de distribuição normal, enquanto os resultados que não seguiram este padrão foram apresentados como mediana e intervalo interquartilico. O teste de Shapiro Wilk foi empregado para avaliar a normalidade da distribuição dos dados. Para os parâmetros que apresentaram distribuição normal, a comparação entre os grupos controle e experimental foi realizada através do teste t de Student. Já as variáveis com distribuição fora da normalidade foram analisadas via teste de Mann-Whitney. A investigação da correlação entre os parâmetros estudados foi realizada pela correlação de Spearman. Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterização dos pacientes e grupo controle

O presente estudo avaliou 22 pacientes, sendo 11 do sexo masculino e 11 do sexo feminino com idades entre 44 e 87 anos. O grupo controle foi constituído de 21 voluntários com idades entre 48 e 74 anos, sendo 11 voluntários do sexo masculino e 10 do sexo feminino.

Além de sexo e idade, o grupo estudado foi avaliado em relação ao Score de Matutes e à presença de comorbidades. Dentre as comorbidades, as duas mais frequentemente encontradas foram hipertensão arterial e dislipidemia.

As tabelas a seguir apresentam os resultados descritivos do estudo.

Tabela 1. Caracterização dos pacientes e controles, em relação ao sexo

Grupos	N	Homens	Mulheres	Idade* (anos)
LLC	22	11	11	69 (44-87)
Controle	21	11	10	63 (53-74)
Total	43	22	21	-
Valor de P	-	P>0,05	P>0,05	P>0,05

*Mediana e intervalo interquartilico; LLC: leucemia linfocítica crônica; Teste estatístico: Normalidade, Shapiro-Wilk; Comparação de dois grupos, Mann-Whitney.

Tabela 2: Caracterização dos pacientes em relação ao Score de Matutes e comorbidades

	Matutes 3	Matutes 4	Matutes 5	Comorbidade Associada	Sem comorbidades	Hipertensão	Dislipidemia
Contagem	11	9	2	20	2	17	5
% Total	50%	41%	9%	91%	9%	77%	23%
% Acumulada	50%	91%	100%	91%	100%	77%	23%

6.2. Hemograma

A caracterização dos pacientes em relação aos controles e quanto aos dados do hemograma, são exibidos na tabela 3.

Tabela 3: Caracterização do grupo controle e pacientes LLC, em relação ao hemograma

	Grupo controle	LLC	P
Hemácias	4,79 (3,74 - 5,57)	4,9 (2,79 - 4,80)	<0,0001
Hemoglobina	14,6 (10,0 - 17,3)	12,3 (9,10 - 13,9)	<0,0001
Hematócrito	44,6 (38,9 - 52,5)	38,7 (28,3 - 42,0)	<0,0001
Plaquetas	263 (142 - 351)	141,5 (68 - 348)	<0,0001
Global Leucócitos	6,900 (2,620 - 9,320)	36,335 (6,560 - 277,630)	<0,0001
Neutrófilos	3,720 (0,920 - 6,500)	3,680 (0,850 - 18,160)	0,7228
Linfócitos	2,150 (1,350 - 4,030)	25,240 (0,0300 - 162,020)	<0,0001
Monócitos	0,450 (0,070 - 0,720)	1,890 (0,0100 - 18,000)	0,0016

Teste estatístico: Normalidade, Shapiro-Wilk; Comparação de dois grupos, Mann-Whitney.

Comparando-se os dados do hemograma dos pacientes com LLC e grupo controle, é possível observar uma diferença significativa em alguns parâmetros, com destaque para a global de leucócitos, que foram maiores no grupo LLC que o observado no grupo controle, um achado já esperado para o perfil da doença.

6.3. Citometria de Fluxo

O imunofenótipo das células B neoplásicas é caracterizado pela coexpressão de CD19, CD5, CD23, com expressão fraca de CD20 (RAWSTRON *et al.*, 2018). Em nosso painel conseguimos avaliar a expressão de CD19, CD5 e C20, complementado com os demais marcadores como o CD23, com base nas informações de prontuário dos pacientes,

considerando a fenotipagem realizada também no Hospital das Clínicas.

Todos os pacientes apresentam os marcadores CD19+ e CD5+, o que está de acordo com a literatura para o diagnóstico clássico da LLC. Os marcadores CD19 e CD20 são específicos das células B. O CD19 é fundamental para a ativação e diferenciação dos linfócitos B, enquanto o CD20 é uma fosfoproteína não glicosilada de 35 a 37 kDa, presente em linfócitos B maduros. Seu papel no diagnóstico diferencial de distúrbios de células B é menor do que o FMC7 porque o CD20 é positivo em praticamente todos os casos (DELGADO *et al.*, 2003). Já CD5 é uma molécula normalmente associada ao linfócito T, que se expressa de forma aberrante na LLC JUNIOR *et al.*, 2001).

Tabela 4: Frequência dos marcadores LLC

	Nº Positivos	% Positivos
CD19	22	100%
CD20	19	86,4%
CD22	17	77,3%
CD23	21	95,5%
IGM	7	31,8%
FMC7	16	72,7%
CD4	3	13,6%
CD5	22	100,0%
CD8	8	36,4%
CD38	6	27,3%
CD45	22	100,0%
KAPPA	15	68,2%
LAMBDA	4	18,2%

CD19; CD20; CD22 CD23; IGM; FMC7 são marcadores típicos de células B. CD4, CD5, CD8 são marcadores típicos de células T, expressos em pacientes com LLC. CD38- marcador de Células linfóides progenitoras e células Plasmáticas; CD45- pan-hematopoético-marcador de leucócitos maduros; Kappa e Lambda- Marcador de cadeia leve de imunoglobulina.

6.4. Avaliação da Expressão gênica de *TSC22D3* e *BCL2* através de *qPCR* em tempo real

A PCR em tempo real foi empregada para quantificação relativa da expressão do mRNA de GILZ (*TSC22D3*) e BCL-2, presentes nas amostras dos indivíduos com LLC e

grupo controle. A quantificação das amostras foi realizada em duplicata e o método utilizado foi o de comparação de $\Delta\Delta CT$, considerando a razão entre o gene *TSC22D3* e *BCL2* testado e o gene endógeno *GAPDH*, em relação à amostra controle.

6.4.1 Curva de eficiência da reação de *TSC22D3* e *BCL2*

A eficiência e a amplificação dos genes *TSC22D3* (*GILZ*) e *BCL2* foram testadas através de diluições seriadas, em duplicata, nas concentrações 800F/800R, 800F/400R, 800F/200R, 800F/100R, 400F/800R, 400F/400R, 400F/200R, 400F/100R, 200F/200R e 100F/100R. Foi selecionada a concentração de 800F/800R dos primers *GILZ* e de 400F/400R dos primers *BCL2* por apresentar melhor eficiência nas amplificações.

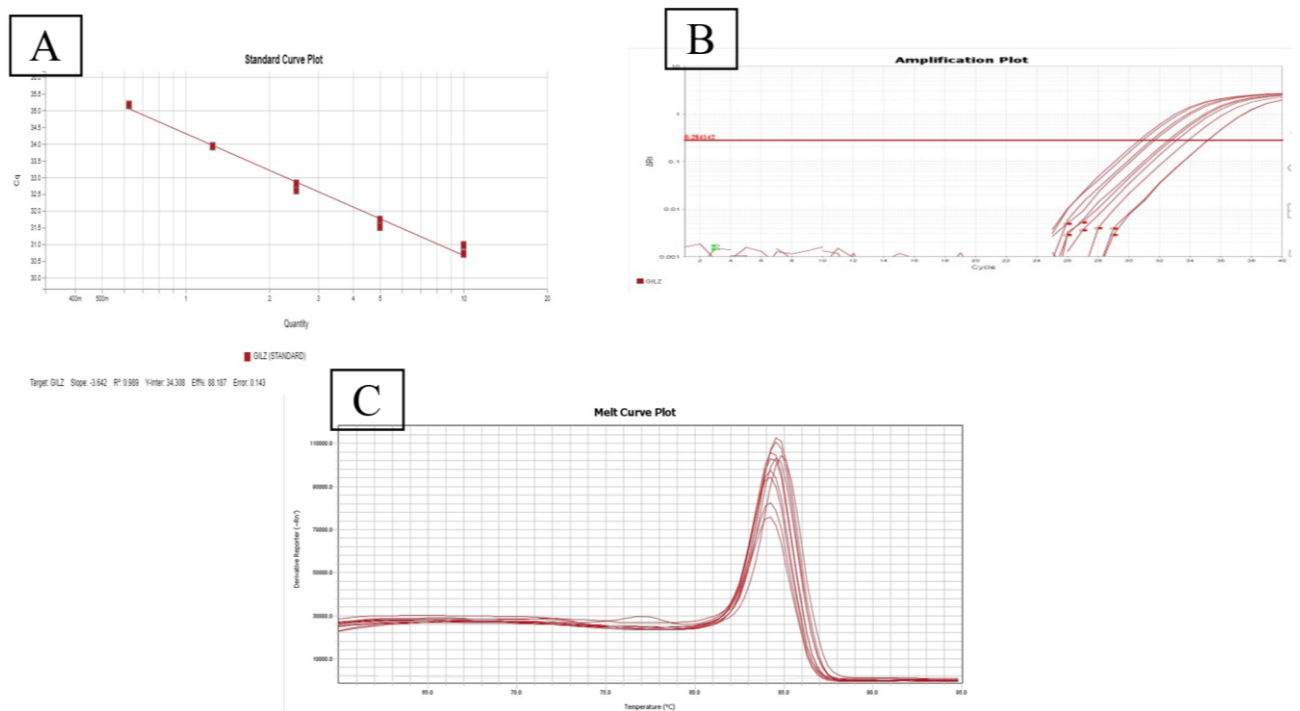


Figura 9. Padronização amplificação *TSC22D3*. A) Curva de eficiência *TSC22D3* com $R^2 = 0,989$; EFF% 88,187. B) Amplificação *TSC22D3* com $\Delta RN = 0,2841$; C) Temperatura Melting *TSC22D3*.

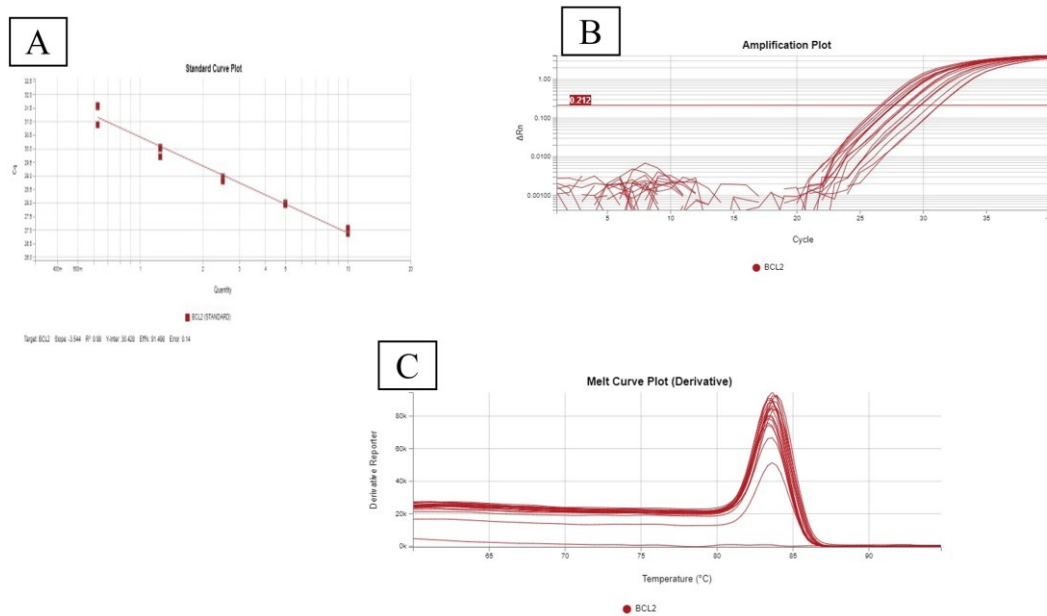


Figura 10. Padronização amplificação BCL2. A) Curva de eficiência BCL2 com $R^2 = 0,98$; $EFF\% 91,49$. B) Amplificação BCL2 com $\Delta RN = 0,212$; C) Temperatura Melting BCL2.

A análise estatística da expressão de GILZ e BCL-2, por não apresentarem distribuição normal, foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Ao comparar as expressões desses marcadores em indivíduos com LLC e seus respectivos controles, foi observado um valor de $p > 0,05$ para GILZ e $p=0,008$ para BCL-2. Apesar da expressão de GILZ atingir valores maiores no grupo controle, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de GILZ entre os dois grupos ($p=0,62$). Como esperado (GOMES et al., 2017), a expressão de BCL-2 foi significativamente maior nos indivíduos com LLC em comparação com os controles, corroborando os dados da literatura.

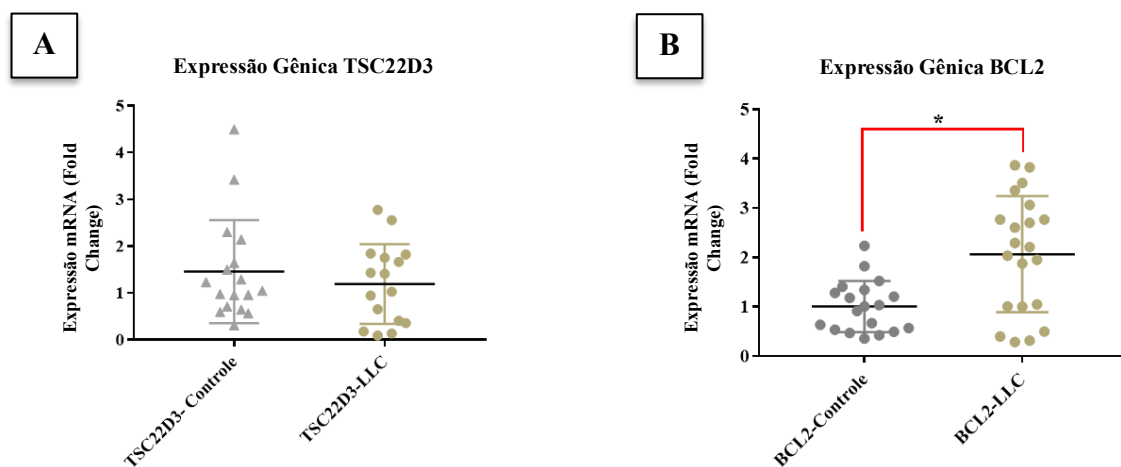


Figura 11. Expressão gênica (Fold Change) de *TSC22D3*(A) e *BCL2*(B) em indivíduos do grupo controle e

LLC. *Teste t de Student (P= 0.008).

Visando estabelecer uma correlação entre a expressão de GILZ e BCL-2, foi realizado o teste de Spearman, e foi observado uma correlação positiva entre a expressão de GILZ e BCL-2 (R2 0,3090 e p=0.04). A análise de regressão linear entre as expressões de GILZ e BCL-2 indicou que há uma relação fracamente significativa entre elas.

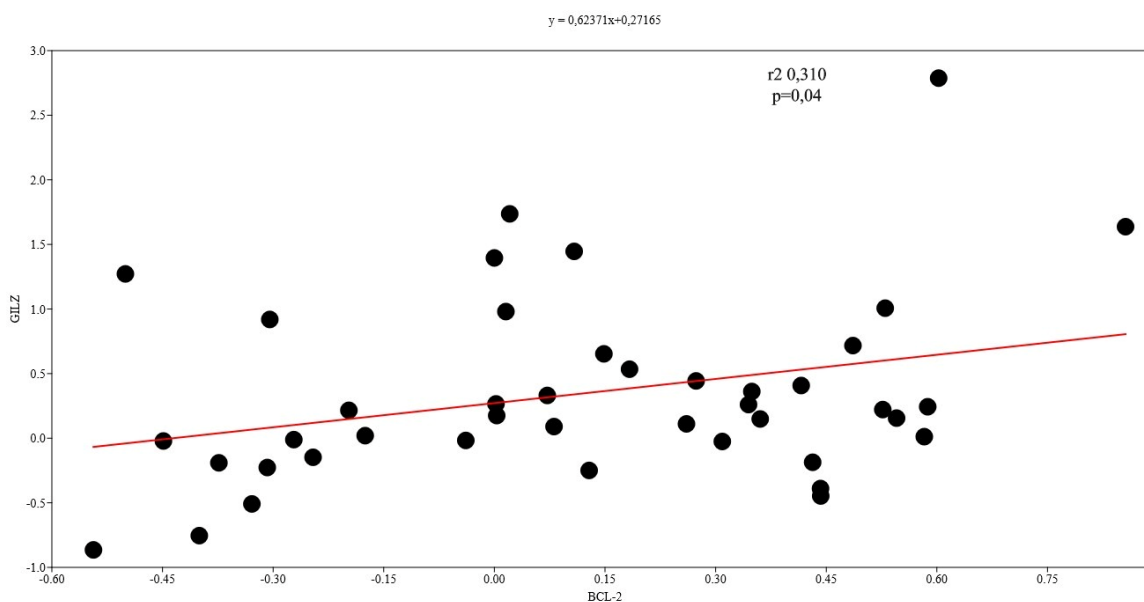


Figura 12. Regressão linear da expressão de TSC22D3 e BCL-2. r2 0,310 e p=0,04.

6.5. Correlação de dados clínicos/laboratoriais e GILZ

Sabendo-se que a expressão de GILZ pode sofrer influências de acordo com diversas situações, sejam elas fisiológicas e/ou patológicas, foram realizadas análises de correlação com os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, a fim de entender se tais resultados poderiam ser influenciados pela desregulação de sua expressão. Foram analisados os dados de leucócitos, neutrófilos, monócitos, linfócitos e plaquetas. Dentre as variáveis analisadas nenhuma demonstrou correlação significativas com a expressão de GILZ.

7. DISCUSSÃO

A relação entre a clínica do paciente e seus dados laboratoriais é de grande valia na Leucemia Linfocítica Crônica (LLC), visto que a estratégia terapêutica é baseada principalmente na sintomatologia. Assim, a decisão de correlacionar os dados encontrados com os dados dos prontuários é essencial.

O presente estudo foi composto de 22 voluntários, sendo 11 do sexo feminino e 11

do sexo masculino. Com relação ao sexo, estudos prévios apontam que homens possuem probabilidade duas vezes maior de ter LLC (RIBEIRO; ALVES; PETINARI, 2023).

O Score de pontuação 3 no sistema matutes foi o mais comumente encontrado, presente em 50% dos pacientes. Essa frequência difere do reportado na literatura, onde Score 4 e 5 são mais comuns. De acordo com a literatura, casos de LLC atípicos podem pontuar 3, e a solução para melhor reenquadramento desses pacientes e consequente manejo clínico seria a adição de mais marcadores, como ROR1, CD81, CD43 e principalmente CD200 (MORA et al., 2019; TING et al., 2018; JALAL, 2021). Considerando que os pacientes deste estudo são atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde o diagnóstico e prognóstico são realizados conforme as ferramentas disponíveis, são necessários mais recursos e tecnologias para o diagnóstico e prognóstico desses pacientes, assim como o emprego de mais marcadores em pesquisas clínicas para melhor classificação ou reenquadramento desses pacientes.

Outro achado comum nos indivíduos portadores de LLC é alta frequência de hipertensão arterial. A hipertensão arterial é a comorbidade mais comumente registrada em pacientes com câncer, apesar do grupo escolhido não estar em tratamento durante os experimentos, sabe-se que o aumento da incidência de hipertensão arterial aumenta com o tratamento quimioterápico (DE SOUZA et al., 2015).

Como esperado para o perfil da doença, os indivíduos com LLC apresentaram linfocitose associada à leucocitose. Ainda assim, a linfocitose monoclonal é encontrada em até 12% da população geral acima de 50 anos (NIETO et al., 2009). O grupo controle pareado em idade com os pacientes de LLC permitiu um perfil mais realista para comparação.

A desregulação imunológica é uma característica da LLC (KATER et al., 2024), nesse sentido, foram analisados os dados de citometria e a imunofenotipagem dos prontuários. Os indivíduos do presente estudo, em relação à fenotipagem, são estratificados em seus registros médicos como positivo, positivo fraco e negativo. Neste estudo, todos os pacientes positivos para o marcador CD20 foram classificados pelo serviço de saúde como positivos, apesar da literatura considerá-lo como positivo fraco na LLC. Além disso, seu papel como marcador na LLC é inferior ao FMC7, visto que o CD20 é positivo em praticamente todos os casos, por isso FMC7 foi incluído no sistema Matutes por ser um marcador confiável para distinguir a LLC de outros distúrbios linfoproliferativos de células B. (DELGADO et al., 2003), o que evidencia mais uma vez a necessidade de atualização das ferramentas diagnósticas hoje utilizadas no serviço de saúde onde os dados foram coletados.

Visando analisar a expressão do mRNA de GILZ em indivíduos portadores de LLC e

grupo controle, verificamos que, apesar de não apresentar significância estatística ($P=0,62$), os indivíduos portadores de LLC seguiram um padrão de menor expressão em relação aos controles. Esse achado corrobora com nossa hipótese inicial, o qual foi baseado nos estudos em animais deficientes em GILZ que apresentavam maior número de linfócitos em relação aos animais controles, sugerindo que GILZ seja importante no controle da sobrevivência dessas células (BRUSCOLI et al., 2015). A falta de significância estatística pode ser explicada pelo baixo número de voluntários, isso se deve, em primeiro lugar, pelo critério de inclusão de pacientes sem tratamento por no mínimo três meses, apesar de afetar o número de indivíduos aptos, tal critério foi crucial para evitar interferências dos tratamentos quimioterápicos e do uso de corticoides nos resultados. Outro fator relevante para o baixo número amostral, está relacionado a interrupção na admissão de novos pacientes por parte do hospital, o que contribuiu para alguns meses sem novos voluntários.

A possibilidade de alguma alteração laboratorial interferir na expressão de GILZ também foi analisada, nesse contexto, os leucócitos totais, linfócitos e as plaquetas foram testados e não apresentaram uma relação causal com GILZ não podendo afirmar um envolvimento de GILZ no aumento da sobrevida desses tipos celulares.

Em relação aos leucócitos e linfócitos, esperava-se uma correlação negativa, visto que inicialmente é relatado nas referências que o aumento dos linfócitos está associado a níveis mais baixos de GILZ, raciocínio esse também empregado para os linfócitos (BRUSCOLI et al., 2015).

Já a contagem de plaquetas pode representar o grau de comprometimento da medula óssea por células leucêmicas, representando dessa forma um importante dado laboratorial. Como proposto na estratificação de Rai e Binet, pacientes com pior prognóstico apresentam em sua classificação estágio Rai IV e Binet C presença de trombocitopenia e assim são considerados pacientes de alto risco. Correlacionar esses dados com GILZ poderia nos trazer novas formas de avaliar o prognóstico desses pacientes (AMAYA-CHANAGA; RASSENTI, 2016). Não encontramos na literatura estudos correlacionando GILZ diretamente com plaquetas, mas como relatado acima, era esperado que a maior expressão de GILZ, juntamente com as plaquetas possuísse um valor prognóstico.

Outro fator relevante foi a grande variação na expressão de GILZ observada nos pacientes com LLC, algo não visto nos pacientes controle, tal variação demonstra como GILZ pode ser alterada em diferentes cenários. Diversos estudos já relataram que a expressão de GILZ é sensível e pode variar em diversos contextos, como depressão (RYAN;

MCCLOUGHLIN, 2019), infecções como sepse (RUSEV et al., 2024), COVID-19 (ATHANASIOU et al., 2024), malária (VANDERMOSTEN et al., 2023) e diversas outras situações fisiológicas e patológicas, dificultando o controle de todas as possíveis variáveis. Além disso, conforme relatado anteriormente, a própria LLC possui uma grande plasticidade metabólica, englobando as principais vias de biogênese e bioenergética mitocondrial, bem como a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e a adaptação ao estresse oxidativo intrínseco (MAVRIDOU; PSATHA; AIVALIOTIS, 2021), o que pode contribuir para explicar uma variação tão grande na expressão de GILZ nos pacientes participantes do presente estudo.

Apesar dos resultados da regressão linear ($R^2 = 0,310$ e $p=0,04$) e a correlação de Spearman ($p=0,0465$) entre GILZ e BCL2 terem demonstrado uma relação estatisticamente fraca, nosso trabalho demonstra que enquanto a expressão de GILZ parece estar diminuída em pacientes com LLC, a expressão de BCL-2 está aumentada. Dado o conhecido papel de BCL-2 no aumento da sobrevivência de linfócitos e de GILZ na indução da apoptose dessas células, esses achados nos apontam para uma possível implicação de GILZ na sobrevivência de linfócitos de pacientes com LLC, o que precisa ser melhor explorado utilizando outras coortes.

8. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no presente estudo, observa-se que é de grande valia a correlação dos dados clínicos e laboratoriais no acompanhamento de pacientes com leucemia linfocítica crônica.

A frequência em que comorbidades, em especial, hipertensão arterial é encontrada nesses pacientes pode afetar diretamente as decisões clínicas, uma vez que poderiam contribuir para o stress fisiológico, se manifestando em sintomas que consequentemente poderiam mudar o status de acompanhamento desses pacientes.

Em relação à expressão de GILZ nos indivíduos LLC, os dados encontrados no presente estudo seguiram em direção ao que foi encontrado em modelos animais, com uma expressão diminuída em pacientes LLC, demonstrando que o papel de GILZ na LLC pode ser melhor explorado, principalmente devido a grande variação de expressão encontrada nestes pacientes.

A associação de GILZ e BCL-2 já foi demonstrado na literatura e apesar de fraca seguiu a mesma direção no presente estudo.

9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

Uma limitação do estudo foi o baixo número de pacientes participantes. Isso se deu principalmente pelo fato de recrutarmos somente pacientes sem tratamento, além de uma interrupção na admissão de novos pacientes por parte do hospital, o que contribuiu para alguns meses sem novos voluntários.

Outro fator importante foi o tempo exíguo para o recrutamento de pacientes e controles, padronização e realização de experimentos e defesa da dissertação, enfim para a conclusão do Mestrado.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, Mir Hilal et al. Pathophysiological implications of neuroinflammation mediated HPA axis dysregulation in the prognosis of cancer and depression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 520, n. November 2020, p. 111093, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111093>>.
- AMAYA-CHANAGA, Carlos I.; RASSENTI, Laura Z. Biomarkers in chronic lymphocytic leukemia: Clinical applications and prognostic markers. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*, v. 29, n. 1, p. 79–89, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beha.2016.08.005>>.
- ASSELIN-LABAT, Marie Liesse et al. GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood*, v. 104, n. 1, p. 215–223, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-12-4295>>.
- ASSOCIAÇÃO MÉDICA MUNDIAL. Declaração de Helsinque da Associação Médica Mundial Princípios Éticos para a Investigação Médica em Seres Humanos. 2013.
- ATHANASIOU, N. et al. Adrenal function in relation to cytokines and outcome in non-critically ill patients with COVID-19. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 47, n. 3, p. 721–728, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s40618-023-02189-y>>.
- AYROLDI, Emira et al. A dual role for glucocorticoid-induced leucine zipper in glucocorticoid function: Tumor growth promotion or suppression? review-article. *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2018.
- AYROLDI, Emira et al. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Inhibits the Raf-Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway by Binding to Raf-1. *Molecular and Cellular Biology*, v. 22, n. 22, p. 7929–7941, 2002.
- AYROLDI, Emira et al. Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor κ B. *Blood*, v. 98, n. 3, p. 743–753, 2001. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood.V98.3.743>>.
- AYROLDI, Emira; RICCARDI, Carlo. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): A new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB Journal*, v. 23, n. 11, p. 3649–3658, 2009.
- BELTRAME, Míriam P. et al. Updating recommendations of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX) for diagnosis of acute leukemias using four-color flow cytometry panels. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 43, n. 4, p. 499–506, 2021.
- BERESHCHENKO, Oxana et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper: A Novel Anti-inflammatory Molecule. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, n. MAR, p. 1–10, 2019.
- BINET, J. L. et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, v. 48, n. 1, p. 198–206, 1981.
- BRAGA, Tatiane Vieira et al. Evaluation of miR-15a, miR-16-1, ZAP-70, Ang-2, and Bcl-2

as potential prognostic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *Braz. J. Pharm. Sci.*, p. 1–11, 2022. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/361273115_Evaluation_of_miR-15a_miR-16-1_ZAP-70_Ang-2_and_Bcl-2_as_potential_prognostic_biomarkers_in_chronic_lymphocytic_leukemia>.

BRUSCOLI, Stefano et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits interferon-gamma production in B cells and suppresses colitis in mice. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. JUL, p. 1–11, 2018.

BRUSCOLI, Stefano et al. Glucocorticoid Therapy in Inflammatory Bowel Disease: Mechanisms and Clinical Practice. *Frontiers in Immunology*, v. 12, n. June, p. 1–9, 2021.

BRUSCOLI, Stefano et al. Lack of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) deregulates B-cell survival and results in B-cell lymphocytosis in mice. *Blood*, v. 126, n. 15, p. 1790–1801, 2015.

BRUSCOLI, Stefano; RICCARDI, Carlo; RONCHETTI, Simona. Gilz as a regulator of cell fate and inflammation. *Cells*, v. 11, n. 1, 2022.

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017.

CANNARILE, L. et al. Cloning, chromosomal assignment and tissue distribution of human GILZ, a glucocorticoid hormone-induced gene [1]. *Cell Death and Differentiation*, v. 8, n. 2, p. 201–203, 2001.

CAPPETTA, Donato et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (Gilz) in cardiovascular health and disease. *Cells*, v. 10, n. 8, p. 1–13, 2021.

CHEN, Shiyin et al. The role of GILZ in lipid metabolism and adipocyte biology. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*, v. 163, n. January, p. 106668, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2022.106668>>.

CHENG, Qiang; MORAND, Eric; YANG, Yuan Hang. Development of novel treatment strategies for inflammatory diseases-similarities and divergence between glucocorticoids and GILZ. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5 JUL, n. July, p. 1–10, 2014.

CHOW, Janet et al. in *Health and Disease*. v. 107, n. 10, p. 243–274, 2010.

CORREIA, Rodolfo P. et al. Recommendations for quality assurance in multiparametric flow cytometry: First consensus of the Brazilian Group of Flow Cytometry (GBCFLUX). *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 51, n. 6, p. 389–396, 2015.

CUI, Bai et al. Cancer and stress: NextGen strategies. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 93, p. 368–383, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.11.005>>.

D'ADAMIO, Francesca et al. A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity*, v. 7, n. 6, p.

803–812, 1997.

DE SOUZA, Vinicius Barbosa et al. Hypertension in patients with cancer. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 104, n. 3, p. 246–252, 2015.

DELFINO, Domenico Vittorio et al. Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood*, v. 104, n. 13, p. 4134–4141, 2004. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-03-0920>>.

DELGADO, Julio et al. Diagnostic Significance of CD20 and FMC7 Expression in B-Cell Disorders. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 120, n. 5, p. 754–759, 2003.

ESPINASSE, Marie Alix et al. Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Is Expressed in Human Neutrophils and Promotes Apoptosis through Mcl-1 Down-Regulation. *Journal of Innate Immunity*, v. 8, n. 1, p. 81–96, 2016.

FOWLER-SHORTEN, Dominic J. et al. BCL-2 inhibition in haematological malignancies: Clinical application and complications. *Blood Reviews*, v. 65, n. March, p. 101195, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.blre.2024.101195>>.

GRUGAN, Katharine D. et al. Dual regulation of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by the glucocorticoid receptor and the PI3-kinase/AKT pathways in multiple myeloma. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 110, n. 3–5, p. 244–254, 2008.

HALLEK, Michael et al. iwCLL guidelines for diagnosis, indications for treatment, response assessment, and supportive management of CLL. *Blood*, v. 131, n. 25, p. 2745–2760, 2018.

HERR, Ingrid; PFITZENMAIER, Jesco. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases. *Lancet Oncology*, v. 7, n. 5, p. 425–430, 2006.

HUANG, Ying et al. Know the enemy as well as the weapons in hand: the aberrant death pathways and therapeutic agents in chronic lymphocytic leukemia. *American journal of cancer research*, v. 5, n. 8, p. 2361–75, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26396912>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4568772>>.

IYER, Prajish; WANG, Lili. Emerging Therapies in CLL in the Era of Precision Medicine. *Cancers*, v. 15, n. 5, p. 1–22, 2023.

JALAL, Sana Dlawar. The contribution of CD200 to the diagnostic accuracy of Matutes score in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia in limited resources laboratories. *PLoS ONE*, v. 16, n. 2 February, p. 1–10, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0247491>>.

JOHA, S. et al. GILZ inhibits the mTORC2/AKT pathway in BCR-ABL + cells. *Oncogene*, v. 31, n. 11, p. 1419–1430, 2012.

- JONES, Sarah A. et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) inhibits B cell activation in systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v. 75, n. 4, p. 739–747, 2016.
- JURUENA, Mario F; CLEARE, Anthony J; PARIANTE, Carmine M. O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, a função dos receptores de glicocorticóides e sua importância na depressão. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, n. 3, p. 189–201, 2004.
- KALE, Justin; OSTERLUND, Elizabeth J.; ANDREWS, David W. BCL-2 family proteins: Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, n. 1, p. 65–80, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2017.186>>.
- KALFEIST, Laura et al. Impact of Glucocorticoid Use in Oncology in the Immunotherapy Era. *Cells*, v. 11, n. 5, p. 1–22, 2022.
- KATER, Arnon P. et al. Long-term immune changes in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia following treatment with venetoclax plus rituximab. *HemaSphere*, v. 8, n. 8, p. 1–12, 2024.
- KIPPS, Thomas J. et al. Chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 3, n. C11, 2017.
- KOPPARAPU, Prasad R. et al. Small Molecule Functional Converter of B-Cell Lymphoma-2 (Bcl-2) Suppresses Breast Cancer Lung Metastasis. *ACS Pharmacology and Translational Science*, v. 2, p. 1–8, 2023.
- KUMAR RAO, P. et al. Uveal melanoma, version 1.2019 featured updates to the NCCN guidelines. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, v. 18, n. 2, p. 121–131, 2020.
- LI, Yang et al. TSC22D3 as an immune-related prognostic biomarker for acute myeloid leukemia. *iScience*, v. 26, n. 8, p. 107451, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107451>>.
- LIU, Lu et al. BCL-2 expression promotes immunosuppression in chronic lymphocytic leukemia by enhancing regulatory T cell differentiation and cytotoxic T cell exhaustion. *Molecular Cancer*, v. 21, n. 1, p. 1–19, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12943-022-01516-w>>.
- GOMES, L C et al. Prognosis biomarkers evaluation in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, v.10, p. 57-62.
- MARQUES-PIUBELLI, Mario L. et al. Expression of BCL2 alternative proteins and association with outcome in CLL patients treated with venetoclax. *Leukemia and Lymphoma*, v. 62, n. 5, p. 1129–1135, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10428194.2020.1861278>>.
- MARTI, Gerald E. et al. Diagnostic criteria for monoclonal B-cell lymphocytosis. *British Journal of Haematology*, v. 130, n. 3, p. 325–332, 2005.

MATUTES, Estella et al. The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, v. 8, n. 10, p. 1640–1645, 1994.

MATUTES, Estella; POLLIACK, Aaron. Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, v. 4, n. 1, p. 22–47, 2000.

MAVRIDOU, Dimitra; PSATHA, Konstantina; AIVALIOTIS, Michalis. Proteomics and drug repurposing in CLL towards precision medicine. *Cancers*, v. 13, n. 14, p. 1–27, 2021.

MICALE, Vincenzo; DRAGO, Filippo. Endocannabinoid system, stress and HPA axis. *European Journal of Pharmacology*, v. 834, n. July, p. 230–239, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.039>>.

MIHALYOVA, Jana et al. Venetoclax: A new wave in hematooncology. *Experimental Hematology*, v. 61, p. 10–25, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.02.002>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/ CONITEC. Relatório para. Relatório para a sociedade, v. 450, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/conitec/pt-br/midias/consultas/relatorios/2024/sociedade/20240405_ReSoc_450_Ibrutinibe_LLCCR1.pdf>.

MORA, Alba et al. CD200 is a useful marker in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, v. 96, n. 2, p. 143–148, 2019.

MUSCARI, Isabella et al. Bcl-xL overexpression decreases GILZ levels and inhibits glucocorticoid-induced activation of caspase-8 and caspase-3 in mouse thymocytes. *Journal of Translational Autoimmunity*, v. 3, n. January, p. 0–4, 2020.

MUTHIAH, Chandrasekar et al. Evaluating population-level outcomes in Chronic Lymphocytic leukemia in the era of novel therapies using the SEER registry. *Leukemia Research*, v. 140, n. March, p. 107496, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.leukres.2024.107496>>.

NIETO, Wendy G; ALMEIDA, Julia; et al. Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood*, v. 114, p. 33–37, 2009.

PACKHAM, Graham; STEVENSON, Freda K. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, v. 114, n. 4, p. 441–449, 2005.

PÉPIN, Aurélie et al. TSC-22 Promotes Interleukin-2-Deprivation Induced Apoptosis in T-Lymphocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 1868, n. April 2015, p. 1855–1868, 2016.

PLOUMAKI, Ioanna et al. Bcl-2 pathway inhibition in solid tumors: a review of clinical trials. *Clinical and Translational Oncology*, v. 25, n. 6, p. 1554–1578, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12094-022-03070-9>>.

RAI, K R et al. of *Chronic. Blood*, v. 46, n. 2, p. 219–235, 1975.

RATMAN, Dariusz et al. How glucocorticoid receptors modulate the activity of other transcription factors: A scope beyond tethering. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 380, n. 1–2, p. 41–54, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.014>>.

RAWSTRON, Andy C. et al. Reproducible diagnosis of chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry: An European Research Initiative on CLL (ERIC) & European Society for Clinical Cell Analysis (ESCCA) Harmonisation project. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, v. 94, n. 1, p. 121–128, 2018.

RIBEIRO, Alessandro Martins; ALVES, Caio Cesar de Souza; PETINARI, Roberta Barbizan. Prevalência e Diagnóstico de pacientes com Leucemia Linfocítica Crônica no Extremo Sul da Bahia, Bahia, Brasil. *Research, Society and Development*, v. 12, n. 3, p. e8312340483, 2023.

RUSEV, Stefan et al. The Association between the rs3747406 Polymorphism in the Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper Gene and Sepsis Survivals Depends on the SOFA Score. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 7, 2024.

RYAN, Karen M.; MCLOUGHLIN, Declan M. Peripheral blood GILZ mRNA levels in depression and following electroconvulsive therapy. *Psychoneuroendocrinology*, v. 101, n. December 2018, p. 304–310, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2018.12.234>>.

SELYE, Hans. Estrés un síndrome producido por diversos agentes nocivos. *Nature*, v. 138, n. I, p. 32–32, 1936.

SHADMAN, Mazyar. Diagnosis and Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia: A Review. *Jama*, v. 329, n. 11, p. 918–932, 2023.

SHARMA, Sandhya; RAI, Kanti R. Chronic lymphocytic leukemia (CLL) treatment: So many choices, such great options. *Cancer*, v. 125, n. 9, p. 1432–1440, 2019.

SHI, Yonghong et al. Ibrutinib reprograms the glucocorticoid receptor in chronic lymphocytic leukemia cells. *Leukemia*, v. 33, n. 7, p. 1650–1662, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0381-4>>.

SKELIN, Josipa et al. Analysis of Primary Chronic Lymphocytic Leukemia Cells' Signaling Pathways. *Biomedicines*, v. 12, n. 3, 2024.

STAHN, Cindy et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 275, n. 1–2, p. 71–78, 2007.

STAHN, Cindy; BUTTGEREIT, Frank. Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, v. 4, n. 10, p. 525–533, 2008.

STILGENBAUER, Stephan et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*,

v. 17, n. 6, p. 768–778, 2016.

STREHL, Cindy et al. Glucocorticoids-All-Rounders Tackling the Versatile Players of the Immune System. *Frontiers in immunology*, v. 10, n. July, p. 1744, 2019.

TING, Y. S. et al. CD200 is a useful diagnostic marker for identifying atypical chronic lymphocytic leukemia by flow cytometry. *International Journal of Laboratory Hematology*, v. 40, n. 5, p. 533–539, 2018.

VAGO, Juliana P. et al. Exploiting the pro-resolving actions of glucocorticoid-induced proteins Annexin A1 and GILZ in infectious diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 133, n. November 2020, 2021.

VAGO, Juliana P. et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper modulates macrophage polarization and apoptotic cell clearance. *Pharmacological Research*, v. 158, n. November 2019, p. 104842, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104842>>.

VAGO, Juliana P. et al. The Role and Effects of Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper in the Context of Inflammation Resolution. *The Journal of Immunology*, v. 194, n. 10, p. 4940–4950, 2015.

VAN DONGEN, J. J.M. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*, v. 26, n. 9, p. 1908–1975, 2012.

VANDERMOSTEN, Leen et al. Glucocorticoid dysfunction in children with severe malaria. *Frontiers in Immunology*, v. 14, n. July, p. 1–16, 2023.

WEI, Guo et al. Gene expression-based chemical genomics identifies rapamycin as a modulator of MCL1 and glucocorticoid resistance. *Cancer Cell*, v. 10, n. 4, p. 331–342, 2006.

XU, Xiao Qiang et al. Comprehensive bioinformatic analysis of the expression and prognostic significance of TSC22D domain family genes in adult acute myeloid leukemia. *BMC Medical Genomics* file:///C:/Users/nanyn/OneDrive - Universidade Federal de Minas Gerais/Mestrado/pesquisa inicial/GILZ/Li 2023 GILZ e lma.pdf, v. 16, n. 1, p. 1–21, 2023.

YANG, Heng et al. Stress–glucocorticoid–TSC22D3 axis compromises therapy-induced antitumor immunity. *Nature Medicine*, v. 25, n. 9, p. 1428–1441, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0566-4>>.

ANEXO I- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (COEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação *in vitro* de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas

Pesquisador: Adriano de Paula Sabino

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 02177612.0.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E
TECNOLOGICO-CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.072.805

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda ao projeto: "Análise Celular, Molecular e Plasmática de Biomarcadores de Diagnóstico, Prognóstico e Avaliação *in vitro* de Potencial Terapêutico de Biomoléculas em Amostras de Pacientes com Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasia/Não Hematológicas" já aprovado por este Comitê.

Justificativa da Emenda: "Atualmente pelas características das análises em andamento, não está havendo necessidade de recrutamento de voluntários, coleta de materiais biológicos e nem intervenção por parte da pesquisa em quaisquer condutas na internação e assistência dos pacientes assistidos no HC-UFMG. As análises laboratoriais do presente trabalho estão sendo conduzidas em amostras sanguíneas já colhidas e processadas na rotina assistencial dos pacientes do HC-UFMG, cujos resultados já foram liberados aos médicos solicitantes. Tais amostras são selecionadas pelos pesquisadores no momento do descarte, que ocorre uma vez por semana no setor de hematologia/bioquímica. As pesquisas de novos biomarcadores nessas amostras que seriam descartadas não terão impactos às condutas clínicas dos respectivos pacientes, pois trata-se de pesquisa básica visando a descoberta de potenciais novos biomarcadores e alvos terapêuticos nestas amostras descartadas. Os dados serão avaliados no coletivo, sem qualquer

Endereço: Av. Presidente Antonio Carlos, 6627 2º. Andar 2 Sala 2005 2 Campus Pampulha
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

ANEXO II- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: "Análise celular, molecular e plasmática de biomarcadores de diagnóstico, prognóstico e avaliação in vitro de potencial terapêutico de biomoléculas sintéticas em amostras de pacientes com neoplasias hematológicas"

Subprojetos:

- Avaliação do perfil de microRNAs em Leucemia Linfocítica Crônica antes e após tratamento com venetoclax
- Estudo do papel da proteína GILZ (Glucocorticoid-induced leucine zipper) na Leucemia Linfocítica Crônica.

Prezado (a) Senhor (a),

O Laboratório de Hematologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais está realizando um estudo de interesse para o diagnóstico e controle das Neoplasias Mielóides, Linfóides e Mielodisplasias/tumores sólidos. Se você quiser participar desse estudo, solicitamos que autorize a coleta de apenas 10 mL de seu sangue para realizarmos exames laboratoriais que incluirão dosagens de proteínas, exames genéticos e testes com biomoléculas, importantes parâmetros para o diagnóstico, avaliação de prognóstico e descoberta de novas drogas para tratamento destas doenças. A coleta da amostra de sangue venoso pode, às vezes, resultar na formação de um pequeno hematoma (roxo) e leve dor localizada. Entretanto, a coleta será feita por profissional capacitado e com grande experiência. Será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito da coleta. Toda informação obtida nessa pesquisa é considerada confidencial. Sua participação é totalmente voluntária e caso você não queira participar não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento. O (a) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação. O participante e o pesquisador assinarão duas vias iguais, ficando uma via com o participante e a outra com o pesquisador.

Qualquer outra informação que desejar poderá ser obtida com o Professor Adriano de Paula Sabino da Faculdade de Farmácia/UFMG, através do telefone 3409-6882. Informações sobre os aspectos éticos da pesquisa poderão ser obtidas com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG/COEP, pelo telefone 3409-4592, localizado à Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, Campus Pampulha, Belo Horizonte - MG. Desde já agradeço sua colaboração.

Prof. Adriano de Paula Sabino (Coordenador do projeto, Professor de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG)

Nome: _____

Documento de identificação: _____

Contato: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____