

**YASMIM CRISTINA FERREIRA
DE ALMEIDA SIQUEIRA**

**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE DA
ENDOGLINA EM LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS
AGUDAS DE CÉLULAS B PEDIÁTRICAS**

Salvador-Bahia

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE DA
ENDOGLINA EM LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS
AGUDAS DE CÉLULAS B PEDIÁTRICAS**

YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA SIQUEIRA

Salvador – BA

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**ANÁLISE DE VARIANTES GENÉTICAS NO GENE DA
ENDOGLINA EM LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS
AGUDAS DE CÉLULAS B PEDIÁTRICAS**

YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA SIQUEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo

Coorientadores: Dra. Keina Maciele Campos Dourado e Dr. Bruno de Almeida Lopes

Salvador – BA

2024

S618 Siqueira, Yasmim Cristina Ferreira de Almeida

Análise de Variantes Genéticas no gene da Endoglina em Leucemias Linfoblásticas Agudas de Células B Pediátricas/Yasmim Cristina Ferreira de Almeida Siqueira. – Salvador, 2024.

85 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Camila Alexandrina Viana de Figueiredo;
Coorientadores: Prof^a. Dr^a Keina Maciele Campos Dourado e Prof.
Dr. Bruno de Almeida Lopes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, 2024.

Inclui referências e anexos.

Responsável técnica Maria de Fátima Mendes Martinelli – CRB/5-551

Sistema Universitário de Bibliotecas da UFBA-SIBI



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO/TESE

Yasmim Cristina Ferreira de Almeida

**AVALIAÇÃO DA ENDOGLINA EM LEUCEMIAS AGUDAS LINFOBLÁSTICAS DE
CÉLULAS B PEDIÁTRICAS**

Salvador, Bahia, 18 de julho de 2024

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente
gov.br THAYANA DA CONCEIÇÃO BARBOSA
Data: 18/07/2024 16:30:17-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Thayana da Conceição Barbosa (Examinadora externa)

Documento assinado digitalmente
gov.br GUSTAVO NUNES DE OLIVEIRA COSTA
Data: 18/07/2024 17:30:32-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Gustavo Nunes de Oliveira Costa (Examinador externo)

Documento assinado digitalmente
gov.br THIAGO MAGALHÃES DA SILVA
Data: 18/07/2024 17:31:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Thiago Magalhães da Silva (Examinador externo)

Documento assinado digitalmente
gov.br TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETO
Data: 24/07/2024 22:50:55-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Tatiane Oliveira Teixeira Muniz Carletto (Examinadora interna)

Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIRÊDO FC
Data: 28/07/2024 10:31:34-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Camila Alexandrina Viana de Figueirêdo Fontana (Examinadora interna)

Aos meus familiares, alicerces, que me incentivaram na conclusão desta etapa:

Meu marido, meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, por me forjar e direcionar no caminho correto.

À minha família por todo apoio e amor incondicional, em especial a meu marido amoroso e companheiro, Eduardo Siqueira e à minha mãe, Cristina Ferreira, por sempre me aconselharem a dar o meu melhor. Ao meu pai, Júlio César, e irmãos, Isis e Júlio, também aos nossos queridos gatos, que enchem nossos dias de amor e ternura.

À professora Dra. Camila Figueiredo, por ter me dado as mãos e aceitar me orientar neste caminho. À professora Dra. Keina Maciele, pelo suporte no direcionamento deste trabalho. Ao professor Dr. Bruno Lopes, pela colaboração no enriquecimento do meu conhecimento acerca deste tema e pelas orientações sempre quando solicitado.

Aos familiares, pais e responsáveis dos pequenos corajosos que enfrentam e enfrentaram essa condição, principalmente por aceitarem contribuir com esta pesquisa neste momento de fragilidade.

Aos profissionais e Hospitais envolvidos que facilitaram a realização desta pesquisa.

Aos colegas e professores do laboratório IMUNOBIO, pelos conhecimentos e momentos compartilhados, em especial às colaboradoras deste trabalho: Louise Lima, sempre solícita, caridosa, colaborou muito para o empreendimento desta tese; à colega Raísa Coelho, igualmente solícita e caridosa, contribuiu para as análises estatísticas; e à colega Candace Machado pelo empenho em fazer acontecer as análises do multiplex. À colega Emile Costa pelos momentos de descontração e suporte em alguns experimentos de bancada. E ao colega João Locke que contribuiu com os cálculos amostrais.

À colega do PPgPIOS, desde 2018, Thaise Toutain, por sua amizade, parceria e conselhos compartilhados.

À UFBA por abrir este espaço de trocas e conhecimento. Aos funcionários e servidores que colaboram para o funcionamento das atividades.

CONSIDERAÇÕES

Foi de suma importância, para o desenvolvimento deste trabalho, o acesso ao banco de dados do programa *Social Change Asthma and Allergy in Latin America* (SCAALA), coordenado pelo Prof. Dr. Maurício Barreto.

APOIO FINANCEIRO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Bolsa de Doutorado

SIQUEIRA, Yasmim Cristina Ferreira de Almeida. Análise de Variantes Genéticas no gene da Endoglina em Leucemias Agudas Linfoblásticas de Células B Pediátricas. 2024. 85f. il. (Tese) Doutorado em Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia.

RESUMO

Introdução: A endoglina (ENG, CD105) é um correceptor integrante da família do fator de transformador do crescimento beta (TGF- β), descrita como um poderoso marcador do processo de angiogênese. Recentemente, a endoglina (ENG) começou a ser mais amplamente estudada no contexto das neoplasias hematopoiéticas. A expressão de ENG é relatada em blastos na leucemia linfoblástica aguda (LLA) em diferentes estudos, sendo apontada como uma promissora via complementar diagnóstica, prognóstica e terapêutica. Sendo assim, o presente estudo analisa as variantes genéticas rs11545664, rs35400405 e rs786514 no gene *ENG* na leucemia linfóide aguda B pediátrica, bem como a dosagem de ENG solúvel (sENG). **Material e Métodos:** O estudo envolveu 117 crianças de 1 a 13 anos em grupos de casos (27) e controles (90). Foi feita a extração do DNA e genotipagem das variantes genéticas, a extração e conversão de RNA para expressão gênica, bem como, a dosagem de sENG. Análises *in silico* também foram realizadas. Em seguida, as frequências genotípicas e alélicas foram comparadas, como também, os dados sociodemográficos dos casos e controles. O grupo de casos foi agrupado por genótipos para as variantes genéticas selecionadas e analisados de acordo com dados clínicos, níveis de dados bioquímicos, expressão gênica de *ENG* e níveis de sENG. **Resultados:** Foi observada uma diferença significativa para o rs7865146 em relação aos níveis de plaquetas para os casos. Os níveis séricos de sENG em pacientes pediátricos com LLA-B recém-diagnosticados foram maiores comparados ao grupo controle ($P < 0,0001$). Nenhum paciente com LLA-B foi a óbito e 23 (85,2%) pacientes foram classificados como de baixo risco pelo índice NCI. As análises *in silico* indicam a possibilidade de envolvimento regulatório/funcional das variantes genéticas avaliadas. **Conclusão:** O nosso estudo não apresentou dados genéticos com achados significativos ou sugestivos para o desfecho de LLA-B. Os níveis plaquetários estavam aumentados para o genótipo TT da variante rs7865146. Este estudo relata que há níveis aumentados de sENG circulante no momento do diagnóstico de pacientes pediátricos com LLA-B. É necessária a condução de estudos adicionais para se amplificar os conhecimentos acerca do papel da ENG no contexto das neoplasias hematológicas.

Descritores: Endoglina. ENG. Leucemia Linfoblástica Aguda. Polimorfismo Genético. Polimorfismo de Nucleotídeo Único.

SIQUEIRA, Yasmim Cristina Ferreira de Almeida. *Genetic Variant Analysis of the Endoglin Gene in Pediatric B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemias*. 2024. 85s. ill. (Thesis) Doctorate in Processos Interativos de Órgãos e Sistemas – Health Sciences Institute, Federal University of Bahia.

ABSTRACT

Introduction: Endoglin (ENG, CD105) is a co-receptor part of the transforming growth factor beta (TGF- β) family, described as a powerful marker of the angiogenesis process. Recently, endoglin (ENG) has been increasingly studied in the context of hematopoietic neoplasms. ENG expression is reported in blasts in acute lymphoblastic leukemia (ALL) across different studies, and it is identified as a promising complementary diagnostic, prognostic, and therapeutic pathway. Therefore, this study examines the genetic variants rs11545664, rs35400405, and rs786514 in the ENG gene in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia, as well as the measurement of soluble ENG (sENG). **Material and Methods:** The study involved 117 children aged 1 to 13 years in case (27) and control (90) groups. DNA was extracted and genetic variants were genotyped, RNA was extracted and converted for gene expression analysis, and sENG levels were measured. In silico analyses were also performed. Genotypic and allelic frequencies were then compared, along with sociodemographic data of cases and controls. The case group was stratified by genotypes for the selected genetic variants and analyzed according to clinical data, biochemical data levels, ENG gene expression, and sENG levels. **Results:** A significant difference was observed for rs7865146 in relation to platelet levels in the cases. Serum sENG levels in newly diagnosed pediatric B-ALL patients were higher compared to the control group ($P < 0.0001$). No B-ALL patients died, and 23 (85.2%) patients were classified as low risk according to the NCI index. In silico analyses indicate the potential regulatory/functional involvement of the evaluated genetic variants. **Conclusion:** Our study did not present genetic data with significant or suggestive findings for B-ALL outcomes. Platelet levels were elevated for the TT genotype of the rs7865146 variant. This study reports elevated levels of circulating sENG at the time of diagnosis in pediatric B-ALL patients. Further studies are needed to expand knowledge about the role of ENG in the context of hematological neoplasms.

Keywords: *Endoglin. ENG Antigen. Genetic Polymorphism. Single Nucleotide Polymorphism.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sinalização canônica de endogлина.	28
Figura 2	Representação esquemática da estrutura da endogлина homodimérica.	29
Figura 3	Estruturas do domínio citoplasmático das isoformas de endogлина.	30
Figura 4	Estrutura esquemática da endogлина solúvel e isoformas.	31
Figura 5	Variação linear de amplificação conforme o número de cópias de DNA obtidas pela RT-PCR e eficiência para os genes (A) <i>ENG</i> e (B) <i>ACTB</i> .	38
Manuscrito 1:		
Figura 1	Nível de expressão para o gene <i>ENG</i> em células humanas de sangue total agrupados por genótipos para as variantes genéticas.	50
Figura 2	Distribuição genotípica das variantes genéticas de <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B de acordo com leucometria.	51
Figura 3	Distribuição genotípica das variantes genéticas de <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B de acordo com níveis de plaquetas.	51
Figura 4	Distribuição genotípica das variantes genéticas de <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B de acordo com níveis de lactato desidrogenase.	52
Figura 5	Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B de acordo com quantificação dos níveis de expressão gênica em medula óssea.	52
Manuscrito 2:		
Figura 1	Níveis de s <i>ENG</i> no plasma sanguíneo em controles e casos.	61
Figura 2	Níveis de s <i>ENG</i> no plasma sanguíneo de acordo com a distribuição genotípica das variantes genéticas de <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação das LLAs baseado nas alterações genéticas.	24
Manuscrito 1:		
Tabela 1	Dados sociodemográficos da população do estudo.	46
Tabela 2	Características clínicas dos pacientes com LLA-B.	47
Tabela 3	Descrição funcional e genética das variantes genéticas no gene <i>ENG</i> .	48
Tabela 4	Frequências Genóticas e Alélicas de variantes genéticas no gene <i>ENG</i> (rs11545664, rs35400405 e rs7865146) em Controles e Pacientes com LLA.	48
Tabela 5	Distribuição genotípica para as variantes genéticas de <i>ENG</i> em pacientes com LLA-B de acordo com dados clínicos.	49
Manuscrito 2:		
Tabela 1	Dados sociodemográficos da população do estudo.	60
Tabela 2	Níveis de sENG (pg/ml) no plasma sanguíneo em controles e casos.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK	Quinase semelhante ao receptor Activina (<i>Activin receptor-Like Kinase</i>)
BMPs	Proteínas morfogenéticas ósseas (<i>Bone Morphogenetic Proteins</i>)
CD105	Endoglina (<i>Endoglin; Cluster Differentiation 105</i>)
CT	Cauda citoplasmática
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRM	Doença Residual Mínima
cDNA	DNA complementar
EC	Célula endotelial (<i>endothelial cell</i>)
ENG	Endoglina (<i>Endoglin</i>)
<i>ENG</i>	Gene da endoglina
HHT	Telangiectasia Hemorrágica Hereditária (<i>Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia</i>)
HSC	Células-tronco hematopoiéticas (<i>Hematopoietic Stem Cells</i>)
kDa	Kilodalton
LA	Leucemia aguda
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLA-B	Leucemia linfoide aguda de origem de células B
LLA-T	Leucemia linfoide aguda de origem de células T
LLC	Leucemia linfoide crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
L-endoglina	Endoglina longa (<i>Large Endoglin</i>)
LTR HSC	Células-tronco hematopoiéticas de repovoamento de longo prazo (<i>Long-Term Repopulating Hematopoietic Stem Cells</i>)
mAb	Anticorpo monoclonal (<i>Monoclonal antibody</i>)
MO	Medula Óssea
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	Domínio órfão (<i>Orphan Domain</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
R-SMAD	Receptor SMAD
RT-qPCR	Reação em Cadeira de Polimerase quantitativa em Tempo Real (<i>Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>)
SCAALA	Mudanças Sociais, Asma e Alergia na América Latina (<i>Social Changes</i>)

Asthma and Allergy in Latin America

sENG	Endoglina solúvel (<i>soluble Endoglin</i>)
S-endoglina	Endoglina curta (<i>Small Endoglin</i>)
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
TGF β RI	Receptores TGF β tipo I
TGF β RII	Receptores TGF β tipo II
TGF- β	Fator de Transformador do Crescimento Beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
TRC105	Anticorpo monoclonal anti-endoglina TRACON105; Carotuximabe
ZP	Zona Pelúcida (<i>Zona Pellucida</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 JUSTIFICATIVA	18
3 OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4 HIPÓTESE	20
5 REVISÃO DE LITERATURA	21
5.1 Leucemia Linfoblástica Aguda	21
5.1.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia	21
5.1.2 Classificação de LLA.....	22
5.1.4. Caracterização Genética.....	23
5.2 Endogлина	25
5.2.1 Descoberta de Endogлина	25
5.2.2 Sinalização e Papel Fisiológico	26
5.2.4 Expressão de Endogлина	31
5.2.5 Endogлина no contexto das Malignidades Hematológicas.....	32
5.2.6 Gene da Endogлина.....	Erro! Indicador não definido.
6 MATERIAL E MÉTODOS	35
6.1 População de Estudo	35
6.2 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), Quantificação e Genotipagem	36
6.3 Extração de Ácido Ribonucléico (RNA) e Síntese de DNA complementar (cDNA)	37
6.4 Quantificação Gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)	38
6.5 Análises Funcionais <i>In Silico</i>	39
6.6 Dosagem de Endogлина Solúvel	39
6.7 Estratégia Estatística	40
6.8 Aspectos Éticos	40
7. RESULTADOS	41
7.1 Manuscrito 1 - Endogлина: Análise de Variantes Genéticas e Expressão Gênica no contexto da Leucemia Linfoblástica Aguda de células B Pediátrica	41
7.1.1 Introdução.....	41
7.1.2 Material e Métodos	42
7.1.3 Resultados.....	46
7.1.4 Discussão	53
7.1.5 Conclusão	55

7.2 Manuscrito 2 – Níveis diferenciais de Endoglina solúvel (sENG) na Leucemia Linfóide Aguda B Pediátrica	56
7.2.1 Introdução.....	56
7.2.2 Material e Métodos.....	57
7.2.3 Resultados.....	60
7.2.4 Discussão	62
7.2.5 Conclusão	63
8 DISCUSSÃO GERAL.....	64
9 CONCLUSÃO GERAL	66
10 REFERÊNCIAS	67
ANEXOS.....	82

1 INTRODUÇÃO

A leucemia linfóide aguda (LLA), também conhecida como leucemia linfoblástica aguda, é uma neoplasia hematológica maligna caracterizada pela perda de habilidade normal de diferenciação e proliferação, havendo um acúmulo de células progenitoras linfóides e expansão clonal em medula óssea (MO), sangue periférico (SP) e outros tecidos (JABBOUR et al., 2015), gerando anemia, trombocitopenia e leucopenia. Os sintomas comuns incluem fadiga, indisposição, hematomas, hemorragias, dispnéia, tontura e infecções (JABBOUR; FADERL; KANTARJIAN, 2005).

Diferentes fatores podem estar diretamente associados à etiologia das neoplasias hematopoiéticas, incluindo fatores genéticos, imunológicos e ambientais (WIEMELS, 2012). Atualmente, o cariótipo dos blastos leucêmicos é um dos fatores prognósticos mais importantes, no entanto, o papel dos genes herdados na etiologia das leucemias agudas não pode ser subestimado, pois pode contribuir para o risco de leucemia (TAYLOR, 1996) e variantes genéticas podem conferir resistência a tratamentos (INABA, GREAVES, e MULLIGHAN, 2013). Desta forma, as variações genéticas precisam ser mais exploradas e novos genes candidatos identificados.

A endoglina (ENG, CD105) é um co-receptor para a superfamília de citocinas do fator de crescimento transformador β (TGF- β , do inglês *transforming growth factor-beta*), que desempenha um papel crucial na regulação da angiogênese (LEBRIN et al., 2004). Apesar de ser amplamente conhecida por sua expressão em células endoteliais, a endoglina também é encontrada expressa nas células-tronco hematopoiéticas (HSC) de todos os sítios hematopoiéticos (CHEN et al., 2002) e, recentemente, vem sendo estudada na etiologia das neoplasias hematopoiéticas (CHAKACHIRO et al., 2013; COSIMATO et al., 2018; DOURARO et al., 2017; BORGES et al. 2019; KAUER et al, 2019; POREBA et al, 2006; ELKHOLY et al. 2021; FONSATTI et al., 2001).

Neste contexto, nosso grupo estudou o papel da ENG nas leucemias agudas (LA) e demonstrou que ela é encontrada distintamente expressa na grande maioria dos blastos leucêmicos em LA, tendo um papel crucial no desenvolvimento desta patologia. O estudo demonstrou, ainda, que ENG é um alvo promissor para intervenção terapêutica, pois ao utilizar anticorpo monoclonal anti-endoglina TRACON105 (TRC105; carotuximabe) como

monoterapia para LLA, sua ação foi ineficaz, podendo este fator, estar relacionado à alta secreção de forma solúvel de endoglina (sENG) (DOURADO et al., 2017).

Apesar dos interessantes resultados demonstrando que a expressão de ENG possui um papel importante no desenvolvimento e tratamento das LA, até o momento nenhum estudo avaliou o papel de variações genéticas em *ENG* no contexto das neoplasias hematopoiéticas. Assim, o presente estudo pretende explorar, em um estudo de caso-controle, o impacto funcional das variantes genéticas rs11545664, rs35400405 e rs7865146 nas LLA de origem de células B pediátrica (LLA-B), bem como analisar a dosagem de endoglina solúvel nesses pacientes.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente as LLA têm boa resposta terapêutica em crianças, porém quando refratária ou recidiva, indica pior prognóstico e menor sobrevida, sendo as mortes causadas, tanto por complicações relacionadas à doença, como à terapia (DELLA STARZA et al., 2019; DIAS et al., 2016; FARHADFAR E LITZOW, 2016). Desta forma, o presente estudo está relacionado com o interesse científico e tecnológico de obter novas informações acerca de como fatores genéticos podem influenciar a expressão de endogлина, podendo apresentar um atividade regulatória e impacto funcional no gene da endogлина e, ocasionalmente estar relacionado ao desenvolvimento e progressão de doenças associadas à expressão deste receptor, como é o caso da LLA-B. O entendimento do conjunto destes fatores pode enriquecer a compreensão da patogênese da LLA-B, de modo a suscitar nova via de diagnóstico, prognóstico e terapêutica.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar o impacto funcional de variantes genéticas no gene *ENG* e avaliar o nível de ENG solúvel na LLA-B pediátrica.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Analisar as frequências genótípicas e alélicas das variantes genéticas em *ENG* na LLA-B pediátrica;

3.2.2 Avaliar o impacto funcional *in silico* das variantes genéticas sobre a regulação e expressão da endoglina

3.2.4 Verificar se há diferenças entre os genótipos para as variantes genéticas avaliadas neste estudo de acordo com dados clínicos, dados bioquímicos, expressão gênica de *ENG*, e níveis de ENG solúvel.

3.2.5 Avaliar a dosagem de endoglina solúvel em pacientes pediátricos com LLA-B ao diagnóstico e comparar com controles.

4 HIPÓTESE

As variantes genéticas no gene da endoglina podem estar influenciando a expressão gênica, podendo apresentar uma atividade regulatória e impacto funcional no gene da endoglina e, eventualmente, estar relacionado a uma maior predisposição para o desenvolvimento de leucemia linfóide aguda B pediátrica.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

As causas da LLA, na maioria dos casos, são desconhecidas. As malignidades hematológicas se desenvolvem como resultado de alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam nas células hematopoiéticas (JI-YOON NOH, 2020), como ocorre em muitos eventos de câncer, sendo considerada uma condição multifatorial, podendo incluir, além de fatores genéticos, fatores imunológicos e ambientais (WIEMELS, 2012).

É postulado que diferentes agentes infecciosos, como vírus e bactérias, induzem uma resposta imune anormal ou desregulada em um indivíduo suscetível, promovendo a LLA. Além disso, a radiação ionizante é considerada uma exposição causal estabelecida para LLA na infância (INABA, GREAVES E MULLIGHAN, 2013).

Outras condições como a trissomia constitutiva 21 ou síndrome de Down em crianças apresentam risco substancialmente elevado para LLA, cerca de 40 vezes na idade de 0 a 4 anos (HASLE, 2000). Do mesmo modo, síndromes de instabilidade cromossômica, tais como Anemia de Fanconi e a Anemia de Bloom, também foram associadas a um maior risco de desenvolver leucemias (SEIF, 2011).

5.1.1 Aspectos Gerais e Epidemiologia

A LLA é a neoplasia maligna mais comum em crianças e adolescentes até 19 anos de idade, sendo responsável por cerca de 25% de todos os cânceres infantis. Aproximadamente 3.000 crianças e adolescentes de 1 a 19 anos são diagnosticadas anualmente com LLA nos Estados Unidos (WARD et al., 2014), sendo a incidência aproximadamente de 3,4 casos em cada 100.000 crianças, apresentando um pico de incidência entre 2 e 5 anos de idade, diminuindo entre adolescentes e adultos jovens (BELSON; KINGSLEY; HOLMES, 2007)

No Brasil, foi registrado um pico de incidência entre 2 e 10 anos, sendo maior aos 4 anos, mais comum da cor branca e no sexo masculino (MELO, 2008), sendo considerado o câncer mais comum em crianças menores de 15 anos (INCA, 2020). A idade é considerada

como um fator prognóstico importante na LLA, pois a sobrevida diminui progressivamente entre bebês e adultos (INABA, GREAVES, e MULLIGHAN, 2013).

A LLA tem uma tendência à maior frequência em meninos do que em meninas, além disso, meninas parecem ter um prognóstico ligeiramente melhor do que meninos, o que parece estar associado a ocorrência de recidivas testiculares e risco aumentado de recidiva em MO e sistema nervoso central (QUINTANILLA et al., 2003; GALLIONE et al., 2004). A incidência anual da doença difere marcadamente de acordo com a cor e o grupo étnico. Os Estados Unidos têm revelado, nas últimas décadas, que em crianças negras e hispânicas com LLA, as taxas de sobrevivência apresentam-se um pouco mais baixas do que aquelas em crianças brancas com LLA (KAHN et al., 2018).

Atualmente, a sobrevida de pacientes pediátricos com LLA tratados em países de alta renda excede 90% (INABA; GREAVES; E MULLIGHAN, 2013; PUI, NICHOLS, YANG, 2019), no geral, essa taxa é superior a 80% devido à terapia intensiva. O principal problema é a recidiva, que ocorre em cerca de 20% das crianças com LLA, e o prognóstico desses pacientes é ruim. A resposta precoce ao tratamento está fortemente associada ao risco de recorrência, por isso é essencial estabelecer fatores prognósticos mais sensíveis (DELLA STARZA et al., 2019).

A quimioterapia é administrada com base na classificação de risco estratificada, conforme determinado por fatores clínicos, como idade (1–9,9 anos vs. <1 ou ≥ 10 anos) e contagem de leucócitos ao diagnóstico ($< 50 \times 10^9 / L$ vs. $\geq 50 \times 10^9 / L$); análise citogenética e genômica de células LLA; e avaliação da resposta com um ensaio de doença residual mínima (DRM), que reflete a presença de células leucêmicas residuais sem evidência clínica da doença. Além disso, há uma melhora substancial nos resultados para aqueles que tem ajuste da dosagem com base em estudos farmacodinâmicos e farmacogenômicos, otimizando a quimioterapia convencional (INABA e PUI, 2021).

5.1.2 Classificação de LLA

Inicialmente, a LLA foi descrita pela classificação geral da leucemia aguda (LA) que caracteriza quanto à linhagem hematopoiética (linfoide ou mieloide) predominantemente envolvida no processo e quanto ao grau de maturidade dessas células (aguda ou crônica),

sendo divididas em quatro padrões distintos: LLA, Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Linfóide Crônica e Leucemia Mieloide Crônica (DESCHLER e LUBBERT, 2006). Dentre eles, as LLAs apresentam uma grande relevância clínica, uma vez que constituem a principal causa de câncer em crianças e adolescentes, sendo 85% dos casos derivados de linhagens de células B e 15% de linhagens de células T (PUI; ROBISON; LOOK, 2008).

Embora o grupo das leucemias seja altamente heterogêneo, a apresentação clínica dos diferentes subtipos é semelhante. Inicialmente, o diagnóstico das LAs era realizado apenas através da análise morfológica e citoquímica. Posteriormente, surgiram novas técnicas como imunofenotipagem, citogenética e biologia molecular para a adequada classificação, que hoje são indispensáveis para um diagnóstico diferencial entre elas, bem como a estratégia terapêutica a ser utilizada (HAFERLACH et al., 2007).

De acordo com classificação Franco-Americano-Britânica, a LA é caracterizada pela presença de blastos perfazendo mais de 30% das células nucleadas da MO (BENNET et al., 1976), enquanto que, pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), a LA é determinada pela contagem de 20% de blastos na MO. Além disso, a classificação da OMS foi revisada em 2016, incorporando novos dados clínicos, prognósticos, morfológicos, imunofenotípicos e genéticos (ARBER et al., 2016). Recentemente a classificação da OMS foi alterada através da 5ª edição com foco nas neoplasias linfóides, publicada em 2022.

5.1.4. Caracterização Genética

Atualmente, o cariótipo dos blastos leucêmicos é um dos fatores prognósticos mais importantes, pois através da identificação de anormalidades genéticas pode-se incorporar terapia molecular direcionada para reduzir o risco de recidiva, mostrando o grande impacto genético na fisiopatologia da doença. Na LLA-B, os subtipos genômicos recorrentes são caracterizados por aneuploidia cromossômica (alterações numéricas), como hiperdiploidia (>50 cromossomos) ou hipodiploidia (<44 cromossomos) e por rearranjos (alterações estruturais): fusão *ETV6::RUNX1*, fusão *TCF3::PBX1*, fusão *BCR::ABL1* (cromossomo Philadelphia), e rearranjo de *KMT2A (MLL)*. Outras anormalidades genéticas recentemente identificadas por análises genômicas abrangentes incluem *BCR-ABL1* semelhante, amplificação intracromossômica do cromossomo 21 (iAMP21), rearranjos envolvendo os

genes *DUX4*, *ZNF384*, *MEF2D* e *NUTM1*, alteração em *PAX5* (*PAX5alt*) e *ETV6-RUNX1*-semelhante (INABA e PUI, 2021).

Com base nas alterações genéticas, os casos de LLA podem ser classificados em três categorias: baixo, intermediário e alto risco (Tabela 1). No entanto, as alterações genéticas podem ser combinadas com variáveis clínicas e a resposta à terapia para estratificar o risco dos pacientes com LLA de células B em grupos de prognóstico (TEACHEY e PUI, 2019).

Tabela 1 – Classificação das LLAs baseado nas alterações genéticas.

Risco	Alterações genéticas
Baixo risco	<i>ETV6-RUNX1</i> , alta hiperdiploidia, <i>DUX4r</i>
Risco intermediário	<i>TCF3-PBX1</i> , <i>iAMP21</i> , <i>PAX5alt</i> , <i>ZNF384r</i> , <i>NUTM1r</i>
Alto risco	Hipodiploidia, <i>BCR-ABL1</i> , <i>KMT2Ar</i> , <i>MEF2Dr</i> , <i>TCF3-HLF</i> , <i>BCR-ABL</i> semelhante, <i>ETV6-RUNX1</i> semelhante

Fonte: Adaptado de Inaba e Pui (2021).

Novos alvos terapêuticos para LLA são urgentemente necessários e continuam sendo um desafio clínico (INABA, GREAVES, E MULLIGHAN, 2013), uma vez que, apesar de um significativo progresso no tratamento ter sido alcançado na última década, ainda existem casos refratários, nos quais a segunda linha de quimioterapia tem um efeito fraco e raramente resulta em aumento da sobrevida (DIAS et al., 2016; FARHADFAR E LITZOW, 2016). Além disso, a identificação de novos marcadores prognósticos não apenas ajudará a aumentar a precisão da estratificação de risco dos pacientes, como também minimizará as chances de recaída, otimizando a terapia nos estágios iniciais do tratamento (RASHED et al., 2019).

5.1.5 Variantes genéticas nas leucemias

As variantes genéticas que se referem à variação de nucleotídeo único (*SNV*, do inglês: *single nucleotide variation*) que é a variação genética mais comum, ocorre aleatoriamente na população em geral e afeta um par de bases de nucleotídeo na sequência de bases do genoma (NIH, 2024). Esse tipo de alteração pode ter um impacto funcional no desenvolvimento de leucemias e na resistência ao tratamento (INABA e PUI, 2021).

As variantes genéticas em regiões não codificadoras, conhecidas como *introns*, e em regiões reguladoras, podem afetar a regulação transcricional e impedir a ligação de fatores de transcrição, podendo interferir na expressão gênica e molecular da proteína (BERTOLINO et al., 2005; CASTONGUAY et al., 2011). Dependendo de onde estão localizados, as variantes genéticas podem interferir na função de um gene, afetando as vias metabólicas (NIH, 2024). Nesse sentido, uma série de estudos já investigaram a associação de variantes genéticas e LLA.

Um estudo pioneiro sugere que as variantes genéticas comuns de baixa penetrância (*IKZF1*-rs4132601, *ARIDB5*-rs708942, *CEBPE*-rs2239633) estão associadas a LLA infantil, em uma população europeia, e diminuíram a expressão de seus respectivos produtos. Os genes identificados neste estudo estão envolvidos na regulação transcricional e diferenciação de progenitores de células B (PAPAEMMANUIL et al., 2009). Similarmente, já foi demonstrado uma correlação significativa entre LLA e variantes genéticas nos genes da *HLA-II* (WU et al. 2017) e de *MLAA-34* (LEI et al. 2017). Além disso, são relatados que variantes genéticas de genes envolvidos com vias metabólicas dos agentes quimioterápicos têm significados prognósticos na LLA infantil (DAVIES, BHATIA, ROSS, et al., 2002; KRAJINOVIC, COSTEA, CHIASSON, 2002), a exemplo de *TPMT* (SCHMIEGELOW et al., 2009), *NUDT15* (YANG et al., 2015) e *CEP72* (DIOUF et al., 2015).

Estudos recentes, do nosso grupo (DOURADO et al., 2017; SAMPAIO, 2023) e outros (CHAKACHIRO et al., 2013; COSIMATO et al., 2018; KAUER et al, 2019; POREBA et al, 2006; ELKHOLY et al. 2021) apontam sugestões promissoras para novas vias complementares diagnósticas, prognósticas e terapêuticas para a LLA, sugerindo a endoglina como um alvo a ser melhor explorado.

5.2 Endoglina

5.2.1 Descoberta da Endoglina

A endoglina, também conhecida como ENG ou *cluster* de diferenciação 105 (ENG, CD105), é uma glicoproteína transmembranar expressa como um homodímero com peso final

de 180 kDa (GOUGOS E LETARTE, 1988). Inicialmente a molécula de ENG foi identificada em 1985 através do desenvolvimento de anticorpo monoclonal murino (mAb) 44G4 criado para proteínas da superfície celular de uma linhagem de célula leucêmica pré-B, denominada HOON (QUACKENBUSH e LETARTE, 1985). Pesquisas subsequentes evidenciaram que o mAb 44G4 reage fortemente com as células endoteliais (ECs) de todos os tipos de vasos sanguíneos (QUACKENBUSH e LETARTE, 1985; GOUGOS E LETARTE, 1988). Dessa forma, ENG foi amplamente descrita como constitutivamente expressa em ECs vasculares. Através da ligação a ligantes da superfamília TGF- β , ENG exerce papel crucial no processo de angiogênese, remodelamento vascular e homeostase, participando do controle de diversos processos celulares, como diferenciação, proliferação, inflamação e cicatrização de feridas (BERNABEU e LÓPEZ-NOVOA, 2009; LÓPEZ-NOVOA e BERNABEU, 2010; LI et al., 2004; LEBRIN et al., 2004; ABDALLA e LETARTE, 2006).

5.2.2 Sinalização e Papel Fisiológico

Funcionalmente, o papel de ENG está relacionado à sua atuação como integrante da família TGF- β (Cheifetz et al., 1992). Os integrantes de TGF- β compõem mais de 30 membros, formando um conjunto de citocinas multifuncionais, entre eles as isoformas de TGF- β (1, 2 e 3), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), ativinas A, inibinas, nodal e hormônios anti-Mülleriano (DERYNCK e MIYAZONO, 2008; MOUSTAKAS e HELDIN, 2005; WAKEFIELD e HILL, 2013) as quais atuam na proliferação, migração, diferenciação e apoptose (GORDON e BLOBE, 2008). Foi relatado que sete receptores TGF β tipo I (TGF β RI: quinases semelhantes a activina, ALKs 1–7) e cinco receptores TGF β tipo II (TGF β RII) são expressos no genoma humano (HELDIN e MOUSTAKAS, 2016). A endogлина juntamente com o β -glicano constituem os receptores tipo III, são co-receptores, auxiliares ou acessórios de sinalização (CHEIFETZ et al., 1992; LÓPEZ-CASILLAS et al., 1991; LETAMENDIA et al., 1998; BARBARA et al., 1999; LASTRES et al., 1996) que agem regulando o acesso de TGF- β ao complexo heteromérico de receptores I e II, modulando as respostas celulares (WRANA et al. 1992; BERNABEU et al., 2010; GUERRERO-ESTEO et al., 2002).

ENG é regulada pela fosforilação através da interação com receptores TGF- β e aos ligantes TGF- β 1 e ao TGF- β 3 em ECs humanas com elevada afinidade (Cheifetz et al., 1992).

Foi demonstrado que ENG pode interagir direta e indiretamente com os diferentes membros de TGF- β (BARBARA et al., 1999; CHEIFETZ et al., 1992; LETAMENDIA et al., 1998; LASTRES et al., 1996; GUERRERO-ESTEO et al., 2002; LLORCA et al., 2007). Especificamente, em associação com TGF β RII, ENG liga-se a TGF β 1, TGF β 3, activina-A, BMP-2 e BMP-7, mas não se liga ao TGF- β 2 (CHEIFETZ et al., 1992; BARBARA et al., 1999; LETAMENDIA et al., 1998). Também foi demonstrado que ENG se liga diretamente à BMPs 9 e 10 (ALT et al., 2012; CASTONGUAY et al., 2011), mediando uma resposta aumentada de ALK1 à BMP-9 (MALLET et al., 2015).

Na via de sinalização canônica, o TGF- β pode ativar duas cascatas através da formação do complexo receptor (Figura 1). O ligante TGF- β se liga ao TGF β RII, que são serina / treonina quinases constitutivamente ativas e transfosforila o TGF β RI, que por sua vez transduz o sinal fosforilando o receptor-SMAD (R-SMAD) a *downstream* (LEBRIN et al., 2004; WRANA et al., 1994; HELDIN e MOUSTAKAS, 2016). O envolvimento de diferentes TGF β RI (ALKs) pode provocar a indução de diferentes R-SMADs, demonstrando efeitos opostos (LEBRIN et al., 2004).

Essencialmente, o ligante de TGF- β se liga ao TGF β RII, que recruta e ativa ALK5 na ausência de ENG, promovendo a fosforilação de Smad 2 / 3, regulando genes alvo envolvidos na maturação dos vasos (Figura 1A). Enquanto que a presença de ENG inibe a via ALK5 e promove o recrutamento e transfosforilação de ALK1, que subsequentemente fosforila Smad 1 / 5 / 8 resultando na regulação de genes alvo angiogênicos (Figura 1B) (LEBRIN et al., 2004; LIU e PAUWEE, 2021).

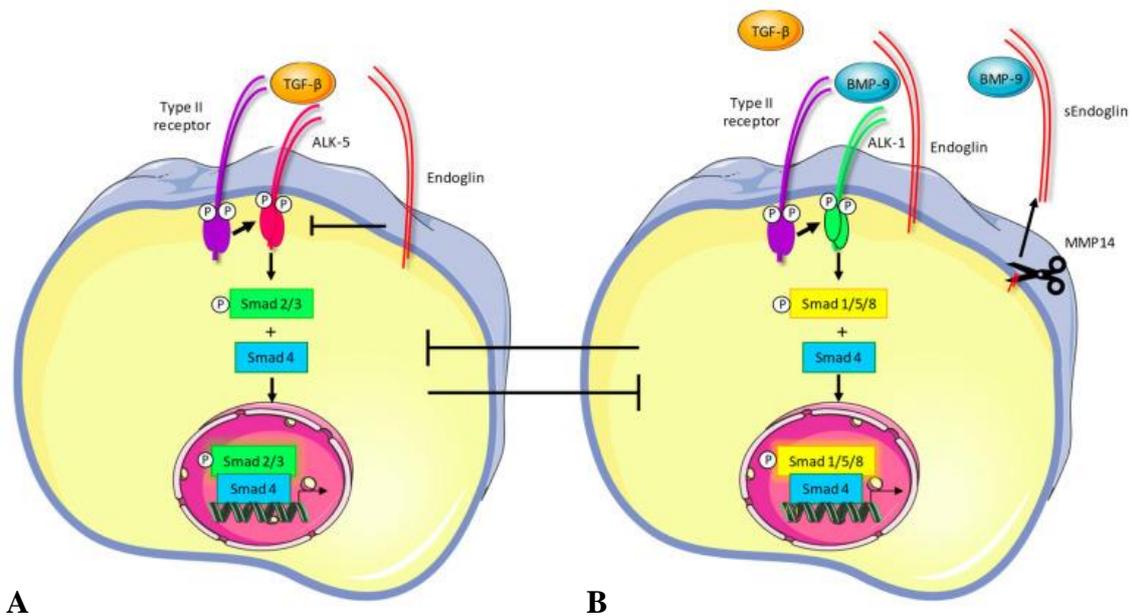


Figura 1 – Sinalização canônica de endogлина.

Notas: (A) via canônica intermediada por ALK-5 na ausência de ENG. (B) via intermediada por ALK1 na presença de ENG, a qual inibe a via ALK-5. Há também a representação da clivagem de ENG por metaloproteinase-14, liberando sENG que mantém a capacidade de se ligar ao BMP-9.

Fonte: Adaptado de Liu e Pauwee (2021).

É importante ressaltar que ALK5 é a via relacionada com a inibição da proliferação e migração celular, sendo o mediador predominante da sinalização de TGF- β em ECs quiescentes, enquanto o ALK1 promove essas respostas e é preferencialmente ativado durante a angiogênese (LEBRIN et al., 2004; BERTOLINO et al., 2005).

5.2.3 Estrutura Molecular de Endogлина

A molécula de ENG é composta por 658 aminoácidos (aa), iniciando com um peptídeo sinal (resíduos 1-25) e seguida por três estruturas diferenciadas: um grande domínio extracelular (ectodomínio, 561 aa), uma região transmembranar (25 aa) e uma pequena cauda citoplasmática de comprimento variável (CT, mais comum de 47 aa) (FIGURA 2) (GOUGOS E LETARTE, 1990). A região extracelular apresenta diferentes domínios: um extenso domínio órfão (OR, do inglês *orphan domain*; resíduos 26-362) e dois módulos de Zona Pelúcida (ZP; resíduos 363-561) (GOUGOS E LETARTE, 1990).

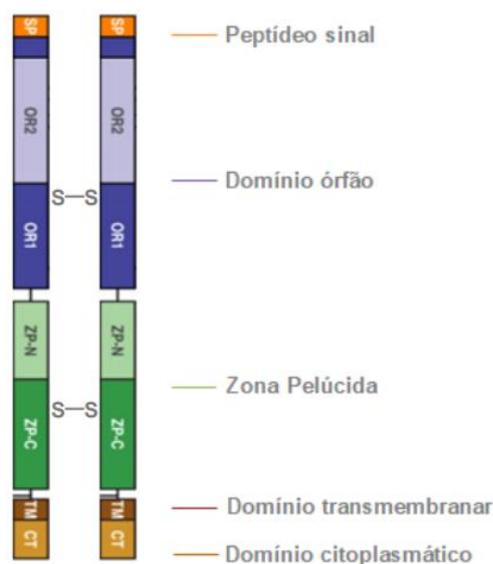


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da endogлина homodimérica.

Nota: SP, peptídeo sinal; OR, região órfão; ZP, zona pelúcida; TM, domínio transmembranar; CT, domínio citoplasmático.

Fonte: Adaptado de Saito et al., 2017.

Estruturalmente, ENG pertence à família ZP (módulos ZP-N e ZP-C), uma importante região para a polimerização e interação de proteínas devido a disposição de resíduos de cisteínas conservadas (JOVINE; DARIE; LITSCHER, 2007; LLORCA et al., 2007), implicando na homodimerização e estabilidade da molécula (ABDALLA et al., 2006; SAITO et al., 2017).

A estrutura de OR consiste em dois domínios entrelaçados (OR1 e OR2, vide Figura 1) apresentando ~18% de similaridade entre suas sequências de aminoácidos (SAITO et al., 2017). Essa estrutura apresenta resíduos de cisteína que são alvos potenciais no envolvimento de ligações intermoleculares (LLORCA et al., 2007).

O terminal C na região CT de ENG é rico em resíduos de serina / treonina, importantes substratos para fosforilação por ALK5 e T β RII (GUERRERO-ESTEO et al., 2002; LASTRES et al. 1994; WRANA et al. 1992). Esse domínio CT interage também com proteínas Tctex2 β (MENG et al, 2006), β -arrestina2 (LEE e BLOBE 2007), Zyxin e ZRP-1 (KOLEVA et al.,2006) e supõe-se que através dessas ligações, ENG pode mediar adesão e migração celular, transporte de proteína via vesículas endocíticas e rearranjos de actina F, participando na reorganização do citoesqueleto (PÉREZ-GOMEZ et al., 2010).

A ENG mais predominante é a L-Endogлина (do inglês: *Large Endoglin*) que apresenta uma variante de *splicing* alternativo, a S-Endogлина (do inglês: *Small Endoglin*). Essa variante evidencia um Terminal C encurtado (14 aa) devido retenção do íntron 14 (Figura 3) (PÉREZ-GOMEZ et al., 2010; BELLÓN et al., 1993). Ambas isoformas já foram relatadas como expressas na membrana plasmática em células mieloides, endotélio e placenta (BELLÓN et al., 93). A S-Endogлина não apresenta resíduos importantes de fosforilação por TBR II e TBRI (ALK1 e ALK5) (Figura 3) e parece ser induzida durante a senescência endotelial, com ação antiangiogênica, o que pode culminar em patologia vascular dependente da idade (LEBRIN et al., 2004).

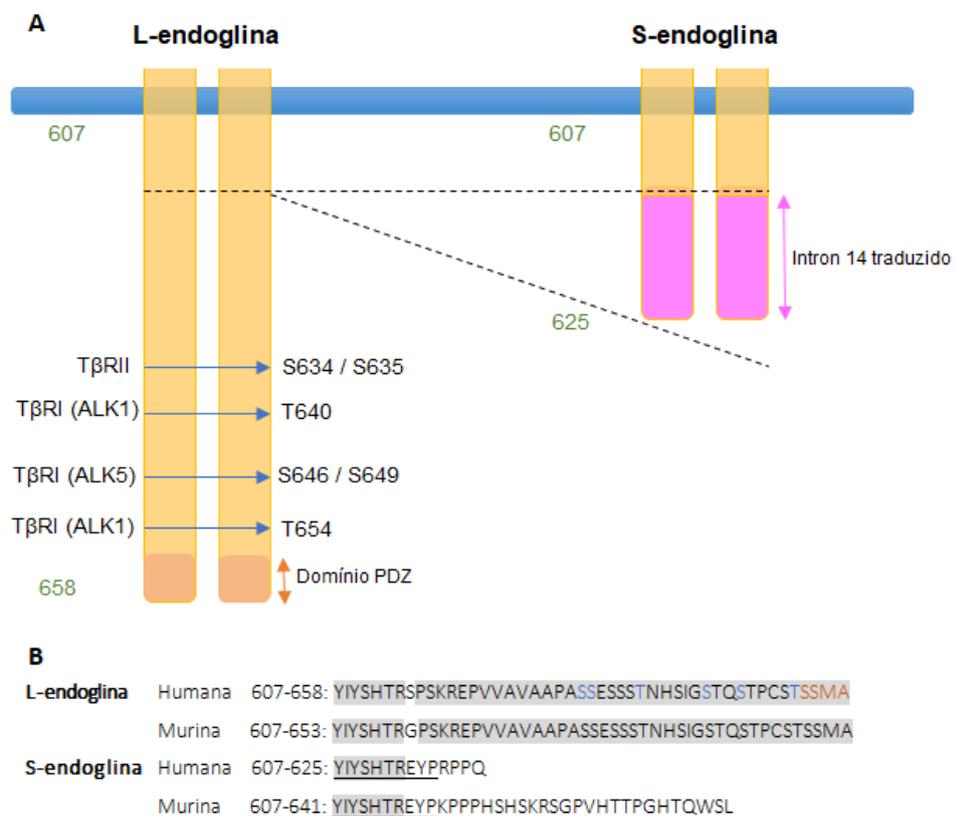


Figura 3 – Estruturas do domínio citoplasmático das isoformas de endogлина.

Nota: (A) Representação esquemática do domínio citoplasmático de isoformas de endogлина humana. Setas representam locais de interação receptores TGF- β . (B) Sequência peptídica do domínio citoplasmático de isoformas de endogлина humana e murina; em azul estão representados os resíduos fosforilados, em laranja os resíduos do domínio PDZ e em sublinhado os aminoácidos em comum em L-endogлина nas espécies de humano e murino.

Fonte: Adaptado de Almeida (dissertação, 2019).

A ENG possui uma forma solúvel (sENG) (Figura 4), circulante de ectodomínio (resíduos 1-586; 65 kDa) que pode formar complexos heteroméricos com integrantes TGF- β ,

atuando negativamente, com efeito antiangiogênico e apresentando papel importante na atividade pró-inflamatória (VENKATESHA ET AL., 2006; GALLARDO-VARA et al., 2018; ARISTORENA et al., 2019; VAREJCKOVA et al., 2017). O derramamento de sENG ocorre sob certas condições fisiológicas como inflamação, lesão endotelial, bem como na presença de fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e anticorpos anti-endogлина (LÓPEZ-NOVOA e BERNABEU, 2010; GALLARDO-VARA et al., 2018; ARISTORENA et al., 2019), tendo seus níveis plasmáticos aumentados em condições fisiopatológicas envolvendo o endotélio como na pré-eclâmpsia (VENKATESHA et al., 2006; GREGORY et al., 2014); câncer e metástase (HAWINKELS et al., 2010; LI et al., 2000); doenças relacionadas à inflamação (BLÁZQUEZ-MEDELA et al., 2010; HONSAWEK; TANAVALLEE; YUKTANANDANA, 2009); e mais recentemente em leucemias agudas (DOURADO et al., 2017), representando um potencial biomarcador para essas patologias.



Figura 4 – Estrutura esquemática das isoformas de endogлина.

Notas: Endogлина solúvel (sENG), isoforma curta (S-endogлина) e isoforma longa (L-endogлина). Domínios relevantes como ectodomínio (ECD), domínio transmembranar (TB) e citoplasmático (CT) e sítios de fosforilação por TGF- β II e ALK1 indicados na isoforma longa (P).

Fonte: Adaptado de JENG et al., 2021.

5.2.4 Expressão de Endogлина

ENG é reconhecidamente expressa em ECs vasculares, sendo regulada positivamente em tecidos submetidos à angiogênese, como em tecidos em regeneração e inflamados, ou em tumores (FONSATTI et al., 2003; JERKIC et al., 2006; LÓPEZ-NOVOA e BERNABEU, 2010). Já a inibição de ENG prejudica o processo de angiogênese (LI et al., 2000), sendo considerada um bom alvo para normalização vascular.

Foi evidenciado que camundongos nulos para ENG ($ENG^{-/-}$) morrem na gestação (E10-11.5) devido à angiogênese defeituosa e graves anormalidades cardiovasculares. Em contrapartida, camundongos ENG heterozigotos ($ENG^{+/-}$) apresentam uma vida útil normal (BOURDEAU; DUMONT; LETARTE, 1999; LI et al., 1999; ARTHUR et al., 2000). Em humanos, a haploinsuficiência de ENG ($ENG^{+/-}$) é responsável por um dos tipos mais comuns

de telangiectasia hemorrágica hereditária (HHT), a HHT do tipo 1, já tendo sido associada ao aumento de permeabilidade vascular devido fragilidade da barreira epitelial (ANDERBERG et al., 2013).

A expressão elevada e seletiva de ENG em vasos sanguíneos recém-formados em tumores sólidos destacou ENG como um indicador prognóstico desfavorável (ROSEN et al., 2014; PAAUWE; TEN DIJKE; HAWINKELS, 2013). Foi constatado que as alterações na estrutura da vasculatura devido ao aumento de expressão de *ENG* leva a falta de estabilização e maturação dos vasos, facilitando o intravasamento e a metástase das células tumorais (JAIN e MARTIN 2014; REYMOND e D'ÁGUA 2013). Diante disto, um anticorpo monoclonal específico para ENG, o TRC105, foi desenvolvido como terapia anti-angiogênica e testado em estudos de até fase III para tumores sólidos. Recentemente os estudos foram interrompidos devido não apresentar resultados significativamente eficazes (AHLUWALIA et al., 2023; JONES et al., 2021).

Para além da angiogênese no endotélio, foi demonstrado que ENG apresenta um papel importante na hematopoiese, atuando como um marcador funcional que define e permite o enriquecimento de um subgrupo de HSCs (HSCs, do inglês *hematopoietic stem cells*) de repovoamento de longo prazo (LTR HSCs, do inglês *long term repopulation*) que são ENG+ CD34+ (BORGES, 2019; CHEN et al., 2002; PIERELLI et al., 2000). Esses achados trazem luz sobre sua participação na imunidade inata e adaptativa, demonstrando um papel importante em outros processos, como a regulação da resposta imune, tema explorado em artigos de revisão recentes (OLLAURI-IBÁÑEZ; AYUSO-ÍÑIGO; PERICACHO, 2021; SCHOONDERWOERD; GOUMANS; HAWINKELS, 2020).

5.2.5 Endoglina no contexto das Malignidades Hematológicas

No contexto das neoplasias hematopoiéticas, ENG foi investigado nas síndromes mielodisplásicas (SMD) e leucemias. Na SMD, o CD105 apresentou maior expressão em eritroblastos em comparação com controles patológicos e saudáveis ($P < 0.001$). O estudo aponta ainda o uso de ENG na investigação diagnóstica para SMD (DELLA PORTA et al., 2006).

Nas LMAs, Fonsatti et al. (2001) mostrou que ENG foi expresso em 47% dos casos (Fonsatti et al., 2001). Em um grande estudo de análise citométrica, Cosimato et al. (2018) encontrou positividade para CD105 em 36,9% dos blastos em 246 de 666 casos de LMA, principalmente nos subtipos mais imaturos (COSIMATO et al., 2018). Já em um estudo baseado em análises de imunohistoquímica, ENG foi encontrada expressa em 24% dos casos de forma variável (de 11% a 100%) na medula de 119 pacientes com LMA de diferentes subtipos (CHAKACHIRO et al, 2013). Uma expressão considerável foi observada por citometria de fluxo em 92% (57/62) dos pacientes analisados com LMA, tendo sido associada a resultados desfavoráveis e falhas de resposta à quimioterapia (KAUER et al., 2019). Os autores indicam ENG como marcador prognóstico na LMA, sugerindo que o aumento de angiogênese dá uma melhor chance de sobrevivência de células malignas com aumento do risco de DRM (KAUER et al., 2019). Além disso, XU et al. (2017) sugeriram que a resistência à terapia intensiva pode ser explicada pela presença de transportadores de resistência a múltiplas drogas induzidos pelo fator 1 alfa induzível por hipóxia, HIF1a, em células blásticas ENG+ com LMA alta (XU et al., 2017).

Na LLA, ENG apresentou expressão em 82% das LLA-B, e em 7% de LLA de origem de células T (LLA-T) (FONSATTI et al., 2001). A expressão de ENG na LLA foi mais consistente em linhagens mais imaturas, como em LLA Pró-B (77% dos casos), LLA-B de tipo comum (84% dos casos) e LLA Pré-T (27% dos casos). Já os subtipos maduros das linhagens B e T não expressaram ENG (FONSATTI et al., 2001). A expressão imunofenotípica de ENG foi relatada por Cosimato et al. (2018) em 68,4% dos casos (230 de 336) de LLA, principalmente nos casos de LLA-B, apresentando 81,8% de expressão nos subtipos mais imaturos em grupos de alto e muito alto risco (COSIMATO et al., 2018). Também foi relatada expressão de ENG associada a maior taxa de falha de indução (ELKHOLY et al., 2021), tendo sido associada a pior prognóstico (CATCHPOOLE et al., 2007). Esses dados indicam que informações adequadas sobre o impacto prognóstico na LLA-B ainda merecem uma avaliação mais aprofundada.

No estudo de nosso grupo, Dourado et al. (DOURADO et al., 2017) demonstraram, em um modelo de xenoenxerto, que blastos ENG+ apresentam maior atividade leucemogênica em comparação com sua contraparte negativa. Este artigo também mostrou que o direcionamento de células blásticas *in vivo* com o mAb TRC105 preveniu o enxerto de células LMA em camundongos e inibiu a progressão da leucemia após o estabelecimento da doença. Na LLA-

B, mesmo na presença de derramamento de antígeno, o TRC105 atuou em sinergia com quimioterapia de baixa intensidade na inibição do crescimento da leucemia (DOURADO et al., 2017).

Um recente estudo brasileiro desenvolvido por Sampaio (2023) demonstrou a expressão positiva de ENG em na maioria dos casos diagnosticados com LLA-B. Os achados revelaram, pela primeira vez, que a expressão de ENG em hematogônias pode estar relacionada ao processo de diferenciação normal de células B, tanto em pacientes com DRM positiva quanto negativa, indicando a possibilidade do uso de ENG na identificação de blastos leucêmicos. Esse estudo sugere que ENG possa ser utilizado para correlação da intensidade de expressão diferencial entre as células doentes. Esses dados são primários, mas trazem novas informações que podem contribuir tanto para o diagnóstico como ao prognóstico das LLA-B (SAMPAIO, 2023).

Com base nos resultados desses estudos prévios, se faz necessário aprofundar no entendimento de como fatores genéticos podem influenciar a expressão de ENG, podendo apresentar uma atividade regulatória e impacto funcional no gene da endoglina (*ENG*) e, ocasionalmente estar relacionado ao desenvolvimento e progressão de doenças associadas à expressão deste receptor, como é o caso da LLA-B.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 População de Estudo

O estudo de caso-controle incluiu uma amostra de conveniência de 117 crianças não aparentadas com idade de 1 a 13 anos. O grupo controle foi composto por 90 crianças provenientes do projeto Programa Social Change, Asthma and Allergy in Latin America (SCAALA), uma coorte brasileira (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011), e o grupo de casos compreendeu 27 crianças recém-diagnosticadas com LLA-B.

A população do SCAALA compreendeu 1309 crianças entre 4 e 11 anos, sem grau de parentesco. Para este trabalho, foram extraídas, aleatoriamente e sem pareamento, informações de 90 indivíduos que compunham o grupo controle do banco imputado do projeto SCAALA. O desenho do estudo já foi relatado em outros trabalhos (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011).

Para os casos, foram incluídas amostras de pacientes com LLA-B com idade igual ou inferior a 13 anos, provenientes majoritariamente do Hospital Martagão Gesteira (HMG, 21 casos), seguido do Hospital Aristides Maltez/Liga Bahiana Contra o Câncer (HAM/LBCC, 5 casos), ambos localizados no município de Salvador, e do Hospital Manoel Novaes (HMN, 1 caso) no município de Itabuna. Os hospitais ficam localizados no estado da Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas no período de agosto de 2021 a junho de 2023.

O diagnóstico de LLA tem como base o que é preconizado pela Organização Mundial da Saúde (ARBER et al., 2016; STEVEN et al., 2017). O critério de diagnóstico considera a apresentação clínica, o hemograma completo, os esfregaços morfológicos e citoquímicos, e confirmado através das análises da porcentagem de blastos na MO e no SP através da técnica de citometria de fluxo, procedimento padrão no diagnóstico clínico desta patologia (ARBER et al., 2016; STEVEN et al., 2017).

Foram obtidos, para o grupo de casos deste estudo, dados clínicos, demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, data de nascimento, tipo de amostra utilizada no diagnóstico, percentual de blastos leucêmicos, leucometria, concentração de enzima lactato desidrogenase (LDH; um conhecido marcador de progressão em neoplasias hematológicas), contagem de

plaquetas, idade ao início do tratamento, diagnóstico imunofenotípico, citogenética, sorologia, tratamento, exame do líquido cefalorraquidiano (LCR).

A estratificação de risco foi feita de acordo com os critérios do *National Cancer Institute* (NCI) através da idade e apresentação de contagem de leucócitos ao diagnóstico (SMITH et al., 1996). Os casos foram classificados em grupo de risco padrão (baixo) (crianças de 1 ano a <10 anos com leucócitos <50.000/ μ L no momento do diagnóstico) e grupo de alto risco (crianças com idade \geq 10 anos e/ou crianças com leucócitos \geq 50.000/ μ L no momento do diagnóstico) (SMITH et al., 1996).

Foram utilizados como critérios de não inclusão para ambos os grupos: presença concomitante de outras doenças consideradas graves, como: HIV1-2, HTLV, Lúpus Eritematoso Sistêmico, síndromes genéticas (ex.: Down, Fanconi, Bloom) e neurofibromatose. Como critérios de exclusão para os casos, foram consideradas as amostras insuficientes ou com baixa qualidade de material genético e diagnóstico inconclusivo para LLA-B ou positivo para outro fenótipo. Foram excluídos 2 pacientes que tiveram diagnóstico para LMA e LLA-T. Um paciente foi transferido para outro estado, assim, somente seus dados e sua amostra coletados inicialmente foram considerados para as análises.

6.2 Extração de Ácido Desoxirribonucleico (DNA), quantificação e genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue coletadas em tubos com EDTA de MO e SP de acordo com o protocolo do kit *Pure Link Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen). Todas as amostras extraídas foram uniformizadas em uma concentração de 100 ng/ μ L e armazenadas a -30°C.

A quantificação fotométrica do DNA foi realizada após os processos de extração através da leitura no espectrofotômetro NanoDrop Lite Spectrophotometer 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). A mensuração da quantidade de DNA obtida das amostras foi realizada utilizando 2 μ L. A unidade de concentração foi dada em ng/ μ L, sob absorbância medida à 260 nm. Para verificar a pureza das amostras, foram utilizados números próximos a 1,8, como valores de referência da razão dos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm.

A genotipagem foi realizada em PCR de tempo real no equipamento *QuantStudio 12K* (Applied Biosystems) utilizando sondas comerciais *TaqMan* (Thermo Fisher Scientific) para as variantes genéticas rs11545664 (ID do ensaio: C_192035372_10), rs35400405 (ID do ensaio: C_25592395_10) e rs7865146 (ID do ensaio: C_3130534_30).

As variantes genéticas foram selecionadas de acordo com a frequência do menor alelo (do inglês, minor allele frequency – MAF) (> 5%) para a população de Salvador descrita no projeto SCAALA (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011); pela posição de interesse; dados de anotação de potencial regulatório consultado através do banco de dados RegulomeDB (v2.2; dbSNP 153; www.regulomedb.org); e através de busca na literatura.

6.3 Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) e síntese de DNA complementar (cDNA)

Alíquotas de 0,5 mL de *buffy coat* foram obtidas das amostras de MO e armazenadas em 1,0 mL de reagente: primeiramente em *RNAlater* (Ambion; amostras ENG 01-04) e, posteriormente, foi adquirido o reagente *TRIzol Reagent* (Invitrogen; amostras ENG 05-30). As amostras foram mantidas congeladas a -80 °C até que os RNAs totais fossem preparados usando o kit *Pure Link RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific) conforme as recomendações do fabricante.

O RNA extraído foi submetido à quantificação fotométrica em *NanoDrop 1000* (Thermo Fisher Scientific) utilizando 2 µL de cada amostra. A concentração foi expressa em ng/µl, determinada pela absorbância medida a 260 nm. Na avaliação da pureza, utilizamos como referência uma relação ideal entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm, geralmente entre 1,8 e 2,0. Apenas as amostras com quantificação e qualidade satisfatórias foram selecionadas para a síntese do cDNA.

Para síntese de cDNA, 500 ng de RNA foram submetidos à transcrição reversa em no máximo 13 µL (volumes abaixo foram completados com água DEPC), utilizando 2 µL de Oligo(dT) e dNTP de *SuperScript IV Master Mix* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura foi homogeneizada e levada ao termociclador *ProFlex PCR System* (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 65°C por 5 minutos, 50-55°C por 10 minutos, e 80°C por 10 minutos.

6.4 Quantificação gênica por PCR quantitativo em Tempo Real (RT-qPCR)

Com os cDNAs funcionantes, foi iniciado o procedimento para quantificação dos níveis de expressão gênica através de RT-qPCR no equipamento *QuantStudio 12K Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), e as informações foram processadas pelo programa *QuantStudio Real-Time PCR versão 1.2* (Applied Biosystems).

As sondas comerciais *TaqMan* (Thermo Fisher), rs11545664 (ID do ensaio: C_192035372_10), rs35400405 (ID do ensaio: C_25592395_10) e rs7865146 (ID do ensaio: C_3130534_30) foram utilizadas para a detecção dos genes *ENG* e β -actina (*ACTB*, gene de referência). Cada RT-PCR foi realizada com 20 ng de amostra de cDNA em 5 μ l de *MasterMix Rox* (Applied Biosystems), 0,5 μ L da respectiva mistura de primer e água DEPC em quantidade suficiente para 10 μ L.

Um experimento de validação foi realizado para verificar as eficiências dos genes-alvo e controle (Figura 5). A amplificação de todas as amostras apresentou a mesma eficiência para a quantificação exata de dados de RT-PCR. Uma curva de diluição seriada, começando com 30 ng de cDNA do grupo controle, foi utilizada. Os valores médios do ciclo de detecção (*cycle threshold*, C_T) foram traçados em relação à concentração logarítmica da respectiva diluição. Os valores da regressão linear aplicados a essa curva foram também obtidos. As eficiências de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope})^{-1}}$) foram próximos de 1,0 (Figura 5).

A quantificação dos níveis de expressão gênica relativa foi realizada usando o método comparativo C_T ($\Delta\Delta C_T$), como previamente descrito (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

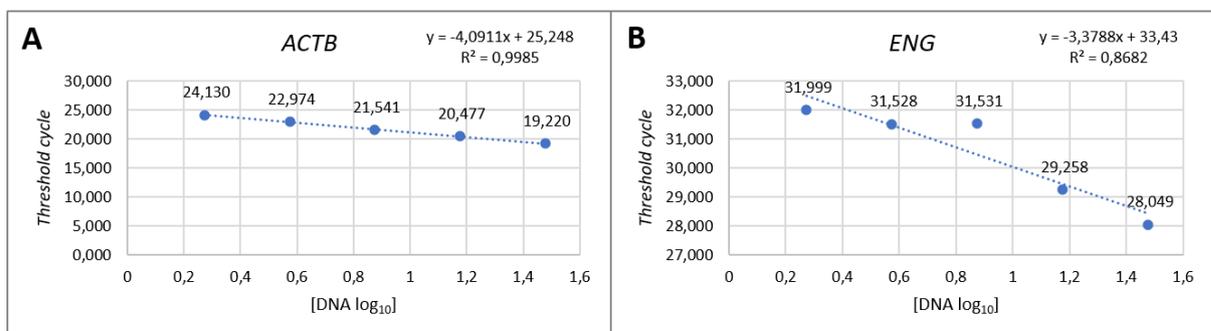


Figura 5 – Variação linear de amplificação conforme o número de cópias de DNA obtidas pela RT-PCR e eficiência para os genes (A) *ACTB* e (B) *ENG*.

6.5 Análises Funcionais *In Silico*

Análises para investigar o impacto das variantes na expressão genética de *ENG* em sangue total foram realizadas através do banco de dados GTEx Project (GTEx Analysis Release V8 em www.gtexportal.org/home/). Essa plataforma permite identificar eQTL de acordo com um genótipo e expressão relativa do gene.

Foi utilizado o recurso Haploreg (v4.2) para explorar estados de cromatina, conservação e alterações de motivos regulatórios. Essa ferramenta utiliza dados do Projeto 1000 Genomas, Roadmap Epigenomics e ENCODE, conservação de sequência em mamíferos, o efeito de variantes genéticas em motivos regulatórios e na expressão de estudos eQTL (WARD e KELLIS, 2012).

6.6 Dosagem de Endogлина Solúvel

Para determinar os níveis circulantes de sENG, foram obtidas 26 alíquotas de plasma viáveis de amostras de sangue venoso doadas pelos pacientes com LLA-B e armazenadas a -20°C até o uso. Para os controles, foram utilizadas amostras de plasmas congeladas a -30°C do projeto SCAALA. Posteriormente, a concentração de sENG foi mensurada através de ensaio, utilizando o kit *MILLIPLEX*® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analito com esferas (*beads*) magnéticas para ENG (HAGP1MAG-12K-01, Merck), e seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, um total de 25 µL de *beads* magnéticas foi colocado em uma placa de 96 poços. As *beads* foram então lavadas uma vez com o tampão de lavagem fornecido pelo fabricante, e as amostras foram transferidas para cada poço. Uma diluição seriada dos padrões foi realizada e colocada nos poços apropriados. A placa foi incubada durante a noite a 4°C. As *beads* foram lavadas três vezes com o tampão de lavagem, e o anticorpo de detecção foi adicionado e incubado por 1 hora. As *beads* foram novamente lavadas, seguidas pela adição de 25 µL de Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) a cada poço. Após lavar as *beads* três vezes com o tampão de lavagem, elas foram ressuspensas no tampão de leitura e agitadas por 5 min.

O ensaio foi realizado na plataforma *Luminex MAGPIX*® (Life Technology, Carlsbad, Califórnia, EUA) através do software de análise *xPONENT*® (v.4.2.1324.0, Luminex

Corporation). Uma fórmula de regressão 5-PL foi utilizada para as concentrações das amostras a partir das curvas padrão. Os resultados foram expressos em pg/ml.

6.7 Estratégia estatística

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste *Kolmogorov–Smirnov* a fim de verificar a normalidade da distribuição das variáveis. As comparações entre grupos para variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste χ^2 e exato de *Fisher*. O teste *Mann Whitney* foi utilizado na comparação dos dois grupos de variáveis quantitativas com distribuição não normal. Para variáveis quantitativas com mais de dois grupos e com distribuição não normal, foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis* e, para distribuição normal foi utilizada a análise ANOVA. Os gráficos foram produzidos no software estatístico *STATA 8.2* (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado o GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com na geração dos gráficos.

6.8 Aspectos éticos

O estudo prospectivo está de acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (CEP-ICS-UFBA), com aprovação em abril/2019, CAAE número 03826318.2.0000.5662. Para os dados do projeto SCAALA foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal da Bahia (registro 003-05/CEP-ICS) e pelo Comitê Nacional de Ética de Pesquisa do Brasil (CONEP, resolução número 15 895/2011). Os pacientes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento pelo responsável legal da criança.

7. RESULTADOS

7.1 Manuscrito 1 - Endoglina: Análise de Variantes Genéticas e Expressão Gênica no contexto da Leucemia Linfoblástica Aguda de células B Pediátrica

Yasmim Cristina Ferreira de Almeida Siqueira¹, Louise Correia de Lima¹, Raísa Santos Coelho¹, Bruno de Almeida Lopes², Keina Maciele Campos Dourado¹, Camila Alexandrina Figueiredo¹

Afiliações

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

² Genetics of Acute Leukaemia Laboratory (GenLAB), Research and Innovation Coordination, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brasil.

7.1.1 Introdução

A endoglina (ENG, CD105) é um correceptor integrante da família do fator transformador de crescimento β (TGF- β) amplamente descrita como um poderoso marcador de angiogênese, estando envolvida em processos patológicos vasculares e na progressão tumoral (FONSATTI et al., 2001). Seu uso tem sido proposto para imagem e prognóstico tumoral, bem como sugere potencial terapêutico em pacientes com tumores sólidos e outras doenças neoplásicas que apresentam aumento da angiogênese (CHAKACHIRO et al., 2013). Apesar da expressão de ENG ter sido bastante explorada no contexto de tumores sólidos e angiogênese, só mais recentemente começou a ser mais amplamente estudada nas neoplasias hematopoiéticas.

A MO, localizada no centro da maioria dos ossos longos, abriga grande quantidade de células-tronco hematopoiéticas (HSC) que são responsáveis por reabastecer constantemente todos os tipos celulares. As HSCs de longo prazo (HSC-LT) são um subgrupo que expressam o CD105 (CHEN et al., 2002). Nesse tipo celular, o CD105 parece atuar como um mediador que afeta a quiescência e permite o repovoamento a longo prazo, cruciais para a manutenção do conjunto de HSC (BORGES et al., 2019).

A expressão do CD105 já foi relatada na síndrome mielodisplásica (DELLA PORTA et al., 2006), na leucemia linfóide aguda (LLA) (FONSATTI et al, 2001; CATCHPOOLE et al. 2007; DOURADO et al, 2017; COSIMATO et al. 2018, POREBA et al., 2006; ELKHOLY et al., 2021) e na leucemia mieloide aguda (LMA) (CHAKACHIRO et al, 2013; DOURADO et al, 2017; COSIMATO et al., 2018; KAUER et al, 2019; XU et al., 2017). Através de estudos morfológicos e imunofenotípicos é estabelecido que, os subtipos celulares mais imaturos apresentem expressão constitutiva do CD105, embora essa expressão esteja ausente em subtipos mais diferenciados (FONSATTI et al., 2001).

Um estudo do nosso grupo desenvolvido por Dourado et al. (2017), revelou pela primeira vez que a expressão de ENG tem um papel crucial no desenvolvimento da leucemia aguda (LA) (DOURADO et al., 2017). Interessantemente, esse estudo revelou que o bloqueio da ENG em um modelo *in vivo* utilizando o anticorpo monoclonal TRC105, inibiu a progressão da leucemia após o estabelecimento da doença em LMA, mas não em LLA. Na LLA o TRC105 sozinho foi ineficaz devido a uma maior secreção de sENG. Contudo, quando combinado com quimioterapia padrão, a inibição da progressão da doença foi potencializada, indicando que o TRC105 pode representar uma nova opção terapêutica para as LAs (DOURADO et al., 2017).

Aliado a esses dados, achados recentes do nosso grupo, liderado por Sampaio (2023) também apontam sugestões promissoras para novas vias complementares de diagnóstico e prognóstico para a LLA-B. Tomados esses resultados em conjunto, sugere-se *ENG* como um alvo a ser melhor explorado. Assim, considerando que *ENG* atua como um importante regulador dos estágios iniciais da especificação dos hemangioblastos e do comprometimento hematopoiético (PERLINGEIRO, 2007), o presente trabalho teve como objetivo analisar, em um estudo de caso-controle, a expressão gênica e o impacto funcional de variantes genéticas no gene *ENG* em pacientes pediátricos com LLA-B.

7.1.2 Material e Métodos

7.1.2.1 População e Desenho do Estudo

Este estudo incluiu 117 crianças com idade de 1 a 13 anos. O grupo controle compreendeu 90 crianças do projeto Programa *Social Change, Asthma and Allergy in Latin America* (SCAALA), uma coorte brasileira (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011), e o grupo de casos compreendeu 27 crianças recém-diagnosticadas com LLA-B. O projeto SCAALA foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal da Bahia (registro 003-05/CEP-ICS), e pelo Comitê Nacional de Ética de Pesquisa do Brasil (CONEP, resolução número 15 895/2011). O estudo prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia (CAAE número 03826318.2.0000.5662/CEP-ICS). Os pacientes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento pelo responsável legal da criança.

A população do SCAALA compreendeu 1309 crianças entre 4 e 11 anos, sem grau de parentesco. Para este trabalho foram extraídas, aleatoriamente e sem pareamento, informações de 90 indivíduos que compunham o grupo controle do banco imputado do projeto SCAALA. O desenho do estudo já foi relatado em outros trabalhos (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011).

Para os casos, foram incluídas amostras de pacientes com LLA-B com idade igual ou inferior a 13 anos, provenientes majoritariamente do Hospital Martagão Gesteira (HMG, 21 casos), seguido do Hospital Aristides Maltez/Liga Bahiana Contra o Câncer (HAM/LBCC, 5 casos), ambos localizados em Salvador, e do Hospital Manoel Novaes (HMN, 1 caso) localizado em Itabuna. Todos os hospitais ficam localizados no estado da Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas no período de agosto de 2021 a junho de 2023.

Foram obtidos, para o grupo de casos deste estudo, dados clínicos, demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, data de nascimento, tipo de amostra utilizada no diagnóstico, percentual de blastos leucêmicos, leucometria, LDH, contagem de plaquetas, idade do início do tratamento, diagnóstico imunofenotípico, citogenética, sorologia, tratamento, exame do líquido cefalorraquidiano (LCR).

A estratificação de risco foi feita de acordo com os critérios do *National Cancer Institute* (NCI), através da idade e apresentação de contagem de leucócitos ao diagnóstico (SMITH et al., 1996). Os casos foram classificados em grupo de risco padrão (baixo) (crianças de 1 ano a <10 anos com leucócitos <50.000/ μ L no momento do diagnóstico) e

grupo de alto risco (crianças com idade ≥ 10 anos e/ou crianças com leucócitos $\geq 50.000/\mu\text{L}$ no momento do diagnóstico) (SMITH et al., 1996).

Foram utilizados como critérios de não inclusão para ambos os grupos: presença concomitante de outras doenças consideradas graves, como: HIV1-2, HTLV, Lupus Eritematoso Sistêmico, síndromes genéticas (ex.: Down, Fanconi, Bloom) e neurofibromatose. Para os casos, foram consideradas como critérios de exclusão as amostras insuficientes ou com baixa qualidade de material genético e diagnóstico inconclusivo para LLA-B ou positivo para outro fenótipo. Foram excluídos 2 pacientes que tiveram diagnóstico para LMA e LLA-T. Um paciente foi transferido para outro estado, assim, somente seus dados e amostra coletados inicialmente foram considerados para as análises.

7.2.1.2 Extração de DNA e genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de MO e SP coletadas em tubos com EDTA de acordo com o protocolo do kit *Pure Link Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen). Todas as amostras extraídas foram uniformizadas à concentração de $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ e armazenadas a -30°C . A genotipagem foi realizada em PCR de tempo real em no equipamento *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR* (Applied Biosystems), utilizando sondas comerciais *TaqMan* (Thermo Fisher Scientific) para as variantes genéticas rs11545664 (ID do ensaio: C_192035372_10), rs35400405 (ID do ensaio: C_25592395_10) e rs7865146 (ID do ensaio: C_3130534_30).

As variantes genéticas foram selecionadas de acordo com o MAF ($> 5\%$) para a população de Salvador descrito no projeto SCAALA (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011); pela posição de interesse; dados de anotação de potencial regulatório consultado através do banco de dados RegulomeDB (v2.2; dbSNP 153; www.regulomedb.org); e através de busca na literatura.

7.2.1.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

Alíquotas de 0,5 mL de *buffy coat* obtidas das amostras de MO foram armazenadas em 1,0 mL de reagente RNAlater (Ambion; amostras ENG 01-04) e TRIzol Reagent (Invitrogen; amostras ENG 05-30), e foram mantidas congeladas a -80 °C. Os RNAs totais foram preparados usando o kit *Pure Link RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, foi feita a síntese de cDNA a partir da transcrição reversa de 500 ng de RNA em no máximo 13 µL, utilizando 2 µL de Oligo(dT) e dNTP de *SuperScript IV Master Mix* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Água tratada com DEPC esterilizada e filtrada foi usada em todas as reações de cDNA.

7.2.1.4 Quantificação Gênica por RT-qPCR

Com os cDNAs funcionantes, foi iniciado o procedimento para quantificação dos níveis de expressão gênica através de RT-qPCR no equipamento *QuantStudio 12K Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as informações foram processadas pelo programa *QuantStudio Real-Time PCR versão 1.2* (Applied Biosystems). As sondas comerciais *TaqMan* (Thermo Fisher) foram utilizadas para a detecção dos genes *ENG* e *β-actina* (*ACTB*, gene de referência). Cada RT-PCR foi realizada com 20 ng de amostra de cDNA em 5 µl de *MasterMix Rox* (Applied Biosystems), 0,5 µL da respectiva mistura de primer e água DEPC em quantidade suficiente para 10 µL. A quantificação dos níveis de expressão gênica relativa foi realizada usando o método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$), como previamente descrito (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

7.2.1.5 Análises funcionais In Silico

Análises para investigar o impacto das variantes na expressão genética de *ENG* em sangue total foram realizadas através do banco de dados *GTEX Project* (GTEX Analysis Release V8 em www.gtexportal.org/home/).

O recurso *Haploreg* (v4.2) foi utilizado para explorar estados de cromatina, conservação e alterações de motivos regulatórios (WARD e KELLIS, 2012).

7.2.1.7 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste *Kolmogorov–Smirnov* para verificar a normalidade da distribuição das variáveis. As comparações entre grupos para variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste χ^2 e exato de *Fisher*. O teste *Mann Whitney* foi utilizado para comparar dois grupos de variáveis quantitativas com distribuição não normal. Para variáveis quantitativas com mais de dois grupos e com distribuição não normal, foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis* e, para distribuição normal foi utilizada a análise ANOVA. Os gráficos foram produzidos no software estatístico STATA 8.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado o GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com para a geração dos gráficos.

7.1.3 Resultados

7.1.3.1 População do Estudo

As características da população estudada estão sumarizadas na Tabela 1. O grupo controle apresenta igual proporção para sexo e mediana de idade de 7 anos e 5 meses, já o grupo caso tem 55% de meninos, mediana de idade de 4 anos, e a maioria apresenta cor da pele reportada pelo responsável como parda (56%), enquanto que o grupo controle apresenta maioria de cor de pele preta (32%), seguida de cor parda (31%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados sociodemográficos da população do estudo.

Variáveis/categorias	Controles (n = 90)	Casos (n = 27)	Valor de P
Sexo, n (%)			0,612*
Masculino	45 (50)	15 (55)	
Feminino	45 (50)	12 (44)	
Idade (anos), mediana (IQ)	7,5 (5,9-8,5)	4,0 (2,4-6,4)	<0,001 ⁺
1-10 anos, n (%)	85 (94)	25 (93)	0,722*
>10 anos, n (%)	5 (6)	2 (7)	
Cor da pele, n (%)			0,087*
Preta	29 (45)	6 (22)	
Parda	28 (43)	15 (56)	
Branca	7 (11)	6 (22)	

* Teste Qui-quadrado de Pearson, ⁺ Teste Mann-Whitney.

No tempo do seguimento do estudo prospectivo (agosto/2021 a novembro/2023) de leucemia pediátrica, não houve registro de óbito, e 23 (85%) pacientes foram classificados como de baixo risco pelo índice NCI (Tabela 2). Dos 27 casos de LLA-B, 25 (93%) foram acompanhados até a fase de consolidação e a fase primária de manutenção; 3 de 26 casos (12%) foram refratários ao primeiro ciclo de indução. A remissão ao primeiro ciclo de indução foi alcançada em 16 de 26 casos (62%) (Tabela 2). Alguns pacientes apresentavam dados faltantes em prontuário, o que impossibilitou a contagem global em algumas categorias analisadas.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes com LLA-B.

Parâmetros	n = 27
Grupo de risco NCI, n (%)	
Baixo	23 (85)
Dados laboratoriais, mediana (IIQ)	
Leucometria ($\times 10^9/L$)	8.900 (1.800-338.900)
Plaquetas ($\times 10^3/cmm$)	55 (8-895)
LDH (U/L)	860 (240-20.970)
Aberrações genéticas de alto risco, n (%)	
<i>BCR::ABL1</i>	
Sim	2 (7)
Não	8 (30)
Dados clínicos, n (%)	
Outra infiltração extramedular	6 (22)
Recaída	2 (7)
Não recaída	14 (54)
Falha na indução	3 (12)
Remissão	16 (62)
Status vital	
Vivo	27 (100)

LDH – lactato desidrogenase

7.1.3.2 Descrição das variantes genéticas no gene *ENG*

A descrição funcional e genética das variantes genéticas compreendida no estudo está sumarizada na Tabela 3. Os dados do Haploreg apontam possibilidade de envolvimento regulatório/funcional para essas variantes genéticas (Tabela 3), estando associadas a estados de cromatina, conservação e alterações de motivos regulatórios em diferentes tecidos.

Tabela 3 – Descrição funcional e genética das variantes genéticas no *ENG*.

Variante genética	Posição (GRCh37)	Alelos ^a	MAF ^b	Anotação ^c	Haploreg
rs11545664	9:130605385	T/C	0,19	Sinônimo (p.Leu69=)	EHM, DNase, MC, SiPhy
rs35400405	9:130616621	A/G	0,09	Missense, (p.Thr5Met)	PHM, EHM, DNase, PB
rs7865146	9:130619637	T/C	0,45	Upstream	PHM, EHM, DNase, RPB, MC, eQTL

^a O primeiro é o alelo alternativo e o segundo é o alelo de referência (1/2). ^b Frequência do menor alelo (minor allele frequency) referente à coorte do SCAALA. ^c NCBI (National Center for Biotechnology Information). EHM, Enhancer Histone Mark; eQTL, expression Quantitative Trait Loci; MC, Motifs Changed; PHM, Promoter Histone Mark; RPB, Regulatory Protein Bindpla; SiPhy, Site-specific PHYlogenetic analysis.

As frequências genotípicas e alélicas das variantes genéticas são descritas na Tabela 4. Para esta análise, não houve diferença significativa entre as frequências dos genótipos e alelos para casos e controles.

Tabela 4 – Frequências Genotípicas e Alélicas das variantes genéticas do gene *ENG* em Controles e Pacientes com LLA.

Variante genética	Controles (n = 90)	Casos (n = 27)	Valor de P*			
	N (%)	N (%)	Modelo alélico	Modelo aditivo	Modelo dominante	Modelo recessivo
rs11545664						
Frequência genotípica				0,6914	**	**
CC	56 (62,2)	20 (74,1)				
CT	31 (34,4)	5 (18,5)				
TT	3 (3,3)	2 (7,4)				
Frequência alélica			0,5283			
C	143 (79,4)	45 (83,3)				
T	37 (20,6)	9 (16,7)				
rs35400405						
Frequência genotípica				**	**	**
GG	76 (84,4)	21 (77,8)				
GA	14 (15,6)	5 (18,5)				
AA	-	1 (3,7)				
Frequência alélica			0,2423			
G	166 (92,2)	47 (87,0)				
A	14 (7,8)	7 (12,9)				

Continuação da tabela 4

Variante genética	Controles (n = 90)	Casos (n = 27)	Valor de P*			
	N (%)	N (%)	Modelo alélico	Modelo aditivo	Modelo dominante	Modelo recessivo
rs7865146						
Frequência genotípica				0,3277	0,2726	1,0
CC	30 (33,3)	6 (22,2)				
CT	40 (44,4)	15 (55,6)				
TT	20 (22,2)	6 (22,2)				
Frequência alélica			0,4723			
C	100 (55,6)	27 (48,2)				
T	80 (44,4)	27 (48,2)				

* Teste Mann-Whitney. ** Modelo não foi possível ser realizado devido baixa frequência de genótipo.

A Tabela 5 traz a distribuição genotípica dos pacientes com LLA de acordo com a resposta ao tratamento. Observou-se que os 3 pacientes que apresentaram falha na indução da remissão apresentam os genótipos mais frequentes de cada variante genética analisada.

Tabela 5 – Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B de acordo com resposta ao tratamento.

Variante genética	Falha na indução (n = 3)	Não falha na indução (n = 16)	Recaída (n = 2)	Remissão (n = 16)
rs11545664				
CC	3 (100,0)	11 (68,7)	2 (100,0)	10 (62,5)
CT	-	4 (25,0)	-	5 (31,2)
TT	-	1 (6,2)	-	1 (6,2)
rs35400405				
GG	3 (100,0)	12 (75,0)	2 (100,0)	13 (81,3)
GA	-	3 (18,7)	-	3 (18,7)
AA	-	1 (6,2)	-	-
rs7865146				
CC	-	4 (25,0)	-	4 (25,0)
CT	3 (100,0)	8 (50,0)	1 (50,0)	9 (56,2)
TT	-	4 (25,0)	1 (50,0)	3 (18,7)

7.1.3.4 Predição de anotação funcional

O genótipo CT da variante genética rs11545664 foi correlacionado com o aumento da expressão do gene *ENG* no sangue total ($P < 0,0001$), na plataforma Gtex (Figura 1A). Contudo, quando investigada a influência das variantes genéticas rs30400405 e rs7565146

nos níveis de expressão de *ENG*, não foi observada correlação para os dados desta plataforma (Figura 1B e 1C).

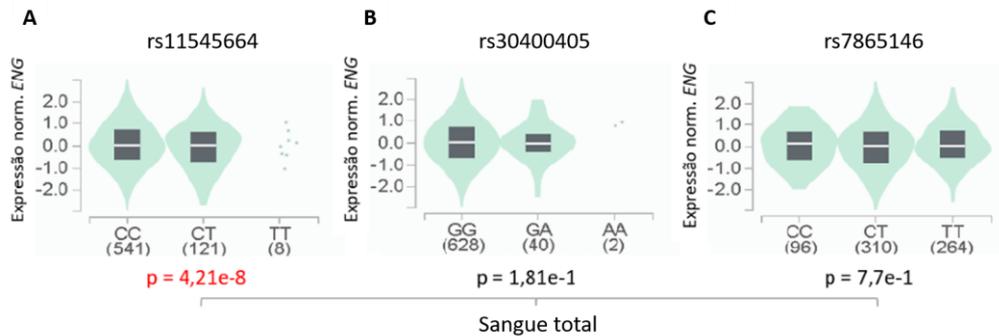


Figura 1 – Nível de expressão para o gene *ENG* em células humanas de sangue total agrupados por genótipos para as variantes genéticas.

Valor de *P* em destaque na cor vermelha: $P < 0,0001$. Fonte: GTEx Analysis Release V8 (GTEx Project em www.gtportal.org/home/).

7.1.3.5 Análise de indicadores bioquímicos e Distribuição Genotípica

A fim de avaliar se as variantes genéticas em *ENG* apresentam diferenças estatísticas para os níveis bioquímicos de marcadores importantes à LLA, foram feitas análises dos níveis de leucócitos, das plaquetas e do LDH para os diferentes genótipos (Figuras 2-4). Observou-se que o genótipo homocigoto recessivo TT do rs7865146 exibiu mediana maior de plaquetas em comparação com os genótipos CC e CT no modelo aditivo ($P = 0.03$, Figura 3C). Não foram encontradas diferenças significantes nas demais análises.

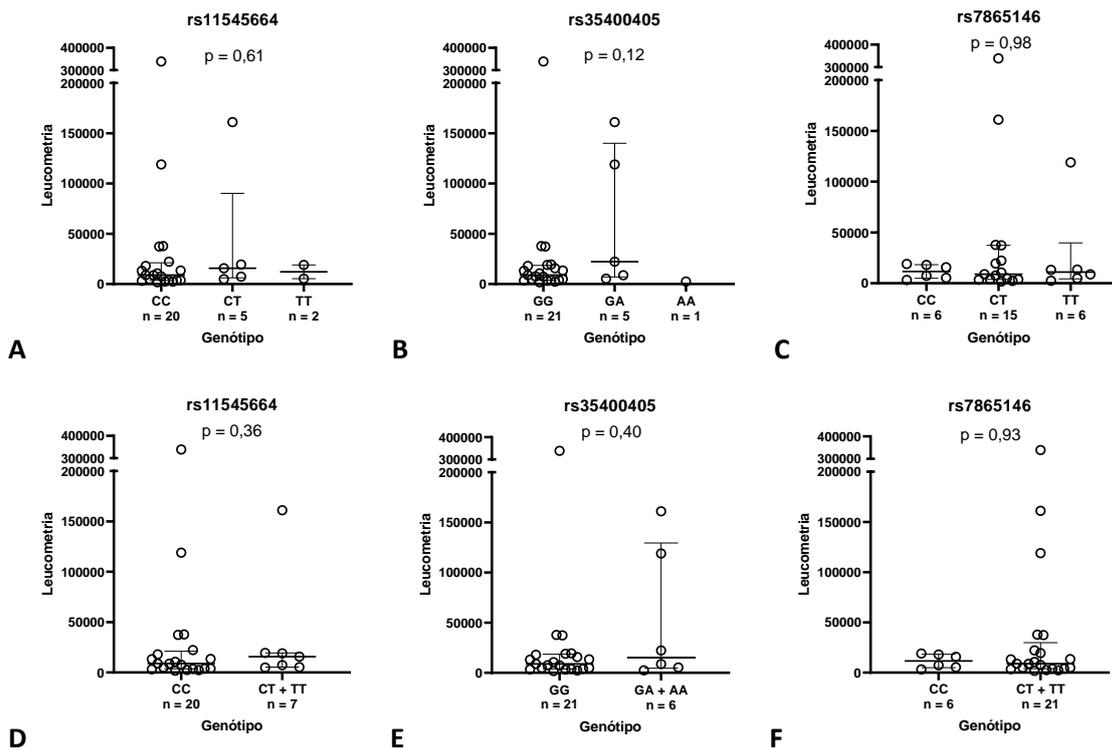


Figura 2 – Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B de acordo com leucometria.

(A-C) Representação do número de indivíduos por genótipo. (D-F) Representação dos modelos de dominância dos alelos T, A, e T, respectivamente. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

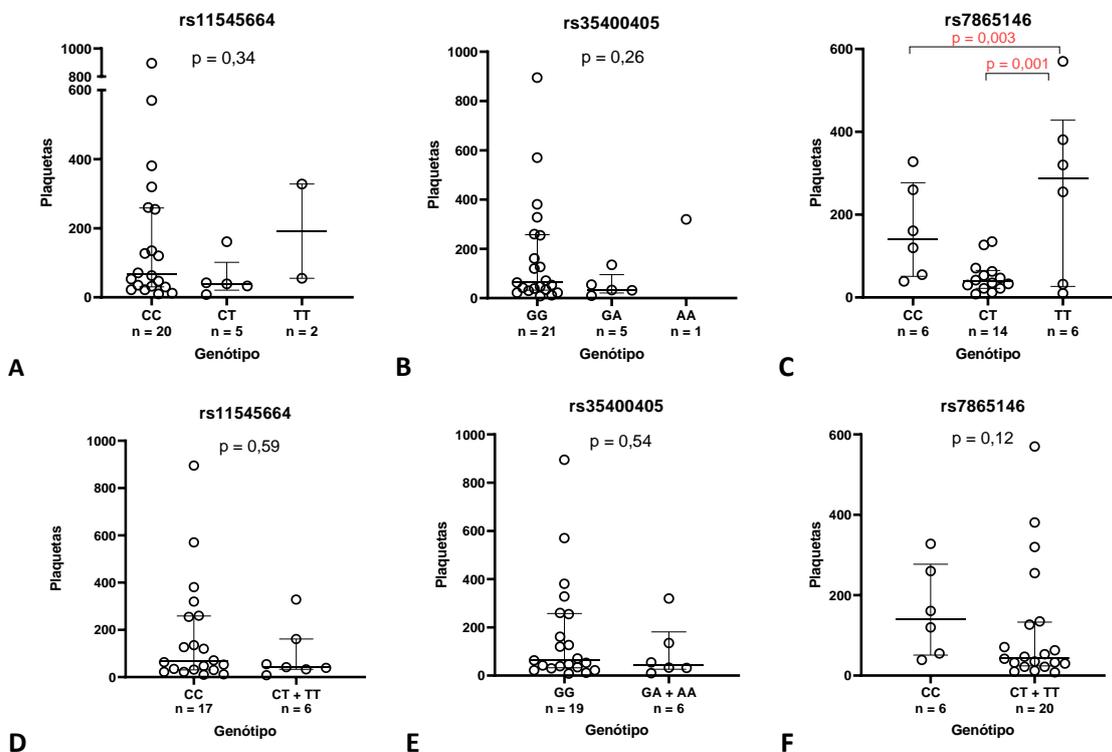


Figura 3 – Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B de acordo com níveis de plaquetas.

(A-C) Representação do número de indivíduos por genótipo. (D-F) Representação dos modelos de dominância dos alelos T, A, e T, respectivamente. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

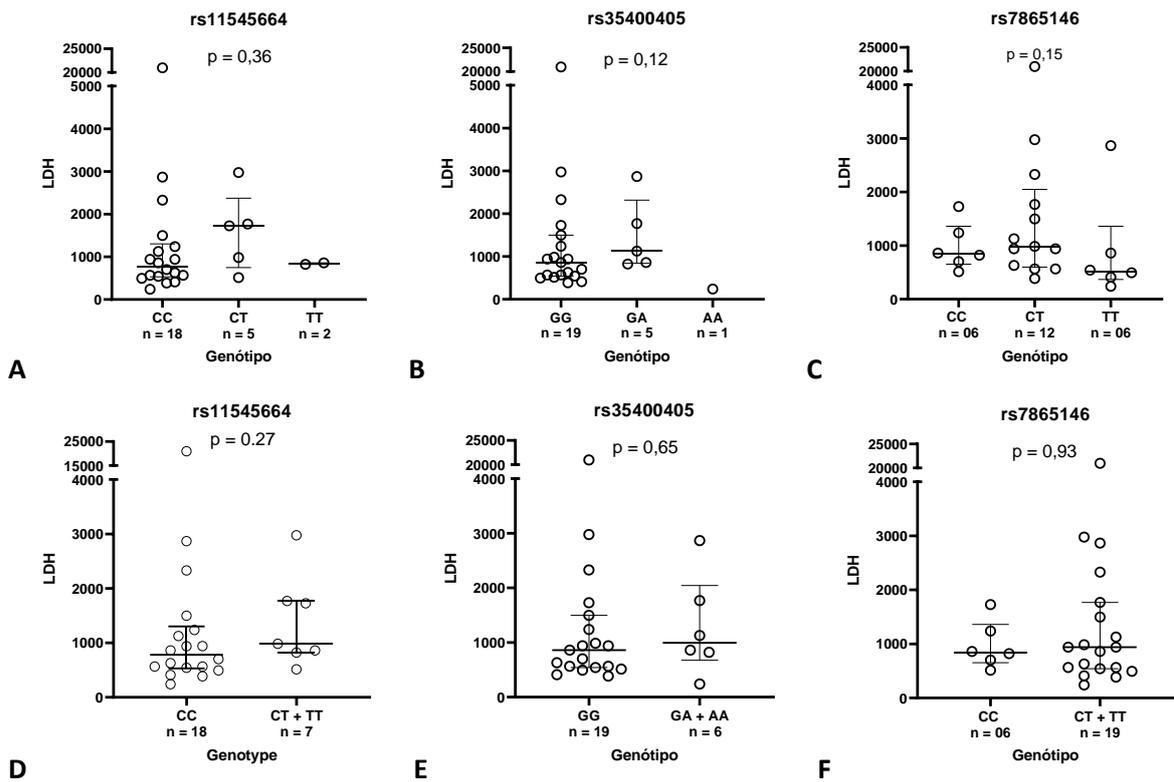


Figura 4 – Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B de acordo com níveis de lactato desidrogenase. (A-C) Representação do número de indivíduos por genótipo. (D-F) Representação dos modelos de dominância dos alelos T, A, e T, respectivamente. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

7.1.3.6 Expressão Gênica

Analisamos se a expressão gênica de *ENG* pode ser alterada de acordo com os genótipos, porém não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 5).

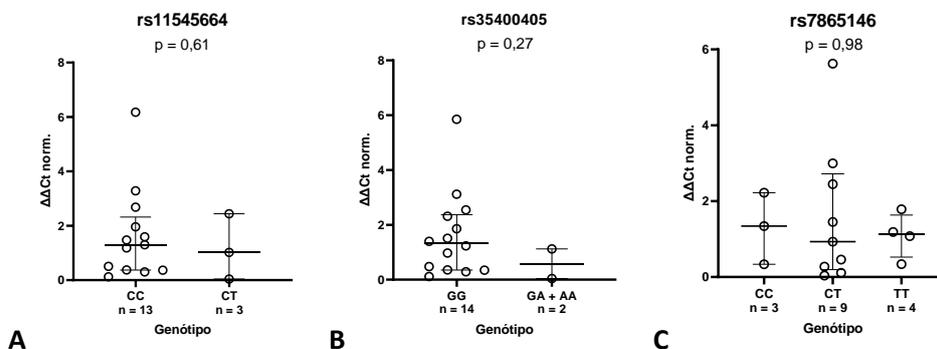


Figura 5 – Distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B de acordo com quantificação dos níveis de expressão gênica em medula óssea. (A-C) Representação do número de indivíduos por genótipo. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

7.1.4 Discussão

A endogлина vem sendo um alvo de maior interesse no campo das neoplasias hematológicas, especialmente na investigação das leucemias agudas nos últimos anos (FONSATTI et al., 2001; CATCHPOOLE et al. 2007; DOURADO et al., 2017; COSIMATO et al., 2018, POREBA et al., 2006; ELKHOLY et al. 2021; KAUER et al. 2019; XU et al., 2017), devido à sua função na angiogênese, apresentando grande impacto nos tumores sólidos de diferentes sítios e, assim como à sua expressão em HSC-LT, podendo repercutir no comprometimento hematopoiético (BORGES et al., 2019; PERLINGEIRO, 2007). Neste trabalho, analisamos a expressão gênica e o impacto funcional de variantes genéticas no gene *ENG* em pacientes pediátricos com LLA-B.

A LLA é a neoplasia maligna mais comum em crianças e adolescentes até 19 anos de idade, sendo responsável por cerca de 25% de todos os cânceres infantis. No Brasil, é considerado o câncer mais comum em crianças menores de 15 anos (INCA, 2019), tendo sido registrado um pico de incidência entre 2 e 10 anos (maior aos 4 anos), ocorrendo com maior frequência em indivíduos com a cor da pele branca e do sexo masculino (MELO, 2008). Os resultados deste estudo estão consistentes em relação à mediana de idade (4 anos). A cor da pele parda foi a mais autodeclarada (56%), o que também foi relatado por Carvalho et al. (2023) em um estudo da prevalência e da caracterização da mortalidade em crianças e adolescentes por leucemia no Nordeste do Brasil (CARVALHO et al., 2023). Este fator pode ser devido à alta miscigenação local.

Em relação à leucometria, é possível observar que a maioria das crianças com LLA-B apresentam leucometria baixa (mediana de $8.900/\text{mm}^3$), o que é esperado para o desfecho ($<10.000/\text{mm}^3$) (PUI et al., 2010). O nível de LDH apresentou mediana de 860 (240-20.970) UI/L, próximo ao nível de LDH (822 (340–3200) UI/L) referido no estudo de Elkholy et al. (2021), o qual relata uma correlação positiva fraca ($r_s < 0,3$; valor de P de 0,035) entre o LDH e a expressão do CD105 (ELKHOLY et al., 2021). As frequências genotípicas e alélicas foram analisadas em relação aos genótipos, não sendo observada correlação entre as variáveis.

O genótipo CT da variante rs11545664 apresenta maior expressão em sangue total de acordo com a base de dados de eQTL do Gtex ($P < 0,0001$). No entanto, essa diferença não foi observada na população estudada, possivelmente devido ao número amostral. O rs11545664 é uma variante sinônima, localizada no *éxon 2* e é indicado como elemento

conservado (SiPhy), apesar de apresentar MAF de 19% na nossa população. Essa região apresenta importante atividade como intensificador gênico em alguns tipos celulares, como HSC primárias e células primárias endoteliais da veia umbilical. O rs11545664 foi relacionado à alteração da sequência de motivos de ligação ao DNA, podendo reduzir a afinidade com fatores de transcrição (TF) importantes ao desenvolvimento e à função normal das células linfoides, como Ets e NF-kappaB (WARD E KELLIS, 2012). Vale destacar, que variantes sinônimas podem alterar a cinética de tradução do RNA mensageiro devido à alteração da sequência dos ácidos nucleicos, dessa maneira, pode afetar o dobramento da proteína co-traducional e repercutir na produção e função da proteína, influenciando o risco e o espectro dos sintomas da doença, bem como podendo afetar a resposta terapêutica (RAUSCHER E IGNATOVA, 2018).

Ao investigar a distribuição dos níveis de leucócitos, plaquetas e LDH em relação aos genótipos das variantes genéticas, observamos que, no modelo dominante, o genótipo TT do rs7865146 afeta os níveis de plaquetas ($P = 0,003$) em relação aos genótipos CC e TC. O rs7865146 é uma variante intergênica, localizada a $< 3\text{kb}$ a *upstream* de *ENG*, em uma região regulatória, apresentando atividade como intensificador e promotor gênico em diferentes tipos celulares. Além disso, demonstrou modificar a sequência de diferentes motivos de DNA (WARD E KELLIS, 2012). Uma possível associação de *ENG* com alteração de plaquetas pode ser plausível, uma vez que *ENG* é necessária à homeostase vascular e desempenha um papel na adesão plaquetária ao endotélio (ROSSI et al., 2018). Sendo assim, é possível inferir que uma desordem na expressão de *ENG* pode refletir nos níveis plaquetários. No entanto, os dados deste estudo não mostram diferença estatística entre os genótipos para os níveis de expressão de *ENG*.

Digno de nota, os achados indicam que as variantes genéticas analisadas neste estudo, estão, muito provavelmente, relacionadas com importante atividade regulatória do gene em diversos tipos celulares, alterando motivos de DNA e a interação com diferentes TFs. Contudo, não houve correlação entre as frequências genótípicas e alélicas e os diferentes genótipos, possivelmente devido ao pequeno número amostral.

As limitações do presente estudo envolvem o número pequeno de participantes, o que impossibilita que haja um efeito e poder estatístico robusto na observação mais adequada dos fenômenos. Além disso, estender a duração do acompanhamento pode ser interessante na avaliação da recidiva no tratamento a longo prazo.

7.1.5 Conclusão

A endoglina é um potencial marcador prognóstico de pacientes pediátricos com LLA-B, como os estudos mais recentes vêm sugerindo. O nosso estudo não apresentou dados com achados significativos ou sugestivos para a LLA-B. Foi encontrada diferença significativa no aumento dos níveis de plaquetas para o genótipo TT do rs7865146, o que pode ser plausível devido ao envolvimento de ENG na integridade endotelial. Os achados indicam que as variantes genéticas analisadas neste estudo estão, muito provavelmente, relacionadas com importante atividade regulatória do gene em diversos tipos celulares. Em conclusão, é necessária a condução de estudos adicionais para avançarmos na compreensão dos mecanismos exatos pelos quais ENG influencia as neoplasias hematológicas.

7.2 Manuscrito 2 – Níveis diferenciais de Endogлина solúvel (sENG) na Leucemia Linfoide Aguda B Pediátrica

Yasmim Cristina Ferreira de Almeida Siqueira¹, Louise Correia de Lima¹, Candace Machado de Andrade¹, Bruno de Almeida Lopes², Keina Maciele Campos Dourado¹, Camila Alexandrina Figueiredo¹

Afiliações

¹ Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brasil.

² Genetics of Acute Leukaemia Laboratory (GenLAB), Research and Innovation Coordination, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brasil.

7.2.1 Introdução

A endogлина (ENG, CD105) é uma glicoproteína transmembrana, um correceptor integrante da família do fator transformador de crescimento β (TGF- β), amplamente descrita como um poderoso marcador de angiogênese, estando envolvida em processos fisiológicos e patológicos vasculares e na progressão tumoral (FONSATTI et al., 2001). Sua expressão tem sido relatada para além das células endoteliais, nas células do sistema imunológico, como em células da imunidade inata e adaptativa, sugerindo seu papel na resposta imune, e sendo relatada na diferenciação da hematopoiese (BORGES, 2019; CHEN et al., 2002; PIERELLI et al., 2000).

A liberação de ENG da matriz celular ocorre sob certas condições fisiológicas, como no aumento do estresse oxidativo, complicações isquêmicas e mesmo por ação de anticorpos anti-endogлина (LÓPEZ-NOVOA e BERNABEU, 2010; GALLARDO-VARA et al., 2018; ARISTORENA et al., 2019). A porção transmembranar de ENG é clivada por metaloproteínases de matriz, ocorrendo o derramamento de sua forma solúvel circulante (sENG) que pode formar complexos heteroméricos com integrantes TGF- β . Dessa forma, é conhecida por atuar negativamente, com efeito antiangiogênico e apresentando papel importante na atividade pró-inflamatória (VENKATESHA et al., 2006; GALLARDO-VARA et al., 2018; ARISTORENA et al., 2019; VAREJCKOVA et al., 2017).

Os níveis plasmáticos aumentados de sENG foram relatados em condições fisiopatológicas envolvendo o endotélio como na pré-eclâmpsia (VENKATESHA et al., 2006; GREGORY et al., 2014); câncer e metástase (FONSATTI et al., 2001; LI et al., 2000); doenças relacionadas à inflamação (BLÁZQUEZ-MEDELA et al., 2010; HONSAWEK; TANAVALLEE; YUKTANANDANA, 2009); e mais recentemente em leucemias agudas (DOURADO et al., 2017), representando um potencial biomarcador para essas condições.

Um estudo do nosso grupo desenvolvido por Dourado et al. (2017), revelou pela primeira vez que a expressão de ENG tem um papel crucial no desenvolvimento da leucemia aguda (LA) (DOURADO et al., 2017). Interessantemente, esse estudo revelou que o bloqueio da ENG em um modelo *in vivo* utilizando o anticorpo monoclonal TRC105, inibiu a progressão da leucemia após o estabelecimento da doença na leucemia mieloide aguda (LMA), mas não na LLA. Na LLA o TRC105 sozinho foi ineficaz devido a uma maior secreção de sENG. Contudo, quando combinado com quimioterapia padrão, a inibição da progressão da doença foi potencializada, indicando que o TRC105 pode representar uma nova opção terapêutica para as LAs (DOURADO et al., 2017). Um estudo mais recente aponta a importância de investigar a medição acoplada de ENG em células blásticas e sENG no soro de pacientes com LLA-B (ELKHOLY et al., 2021). Sendo assim, o presente estudo objetiva investigar a presença dos níveis de sENG no soro de pacientes pediátricos recém-diagnosticados com LLA-B e comparar com controles, bem como, analisar os níveis de sENG em relação às variantes genéticas no gene da endogлина.

7.2.2 Material e Métodos

7.2.2.1 População e Desenho do Estudo

Este estudo inclui 65 crianças com idade de 1 a 13 anos. O grupo controle compreendeu 39 crianças do projeto Programa *Social Change, Asthma and Allergy in Latin America* (SCAALA), uma coorte brasileira (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011) e o grupo de casos compreendeu 26 crianças recém-diagnosticadas com LLA-B. O projeto SCAALA foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal da Bahia (registro 003-05/CEP-ICS) e pelo Comitê Nacional de Ética de Pesquisa do Brasil (CONEP, resolução número 15 895/2011). O estudo prospectivo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Bahia (CAAE número 03826318.2.0000.5662/CEP-ICS). Os

pacientes foram incluídos no estudo após assinatura do termo de consentimento pelo responsável legal da criança.

A população do SCAALA compreendeu 1309 crianças entre 4 e 11 anos, sem grau de parentesco. Para este trabalho foram extraídas, aleatoriamente e sem pareamento, informações de 90 indivíduos que compunham o grupo controle do banco imputado do projeto SCAALA. O desenho do estudo já foi relatado em outros trabalhos (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011).

Para os casos, foram incluídas amostras de pacientes com LLA-B com idade igual ou inferior a 13 anos, provenientes majoritariamente do Hospital Martagão Gesteira (HMG), seguido do Hospital Aristides Maltez/Liga Bahiana Contra o Câncer (HAM/LBCC), ambos localizados em Salvador, e do Hospital Manoel Novaes (HMN) localizado em Itabuna. Todos os hospitais ficam localizados no estado da Bahia, Brasil. As amostras foram coletadas no período de agosto de 2021 a junho de 2023.

Foram obtidos, para o grupo de casos deste estudo, dados clínicos, demográficos e laboratoriais, como: idade, sexo, data de nascimento e tipo de amostra utilizada no diagnóstico.

Foram utilizados como critérios de não inclusão para ambos os grupos: presença concomitante de outras doenças consideradas graves, como: HIV1-2, HTLV, Lupus Eritematoso Sistêmico, síndromes genéticas (ex.: Down, Fanconi, Bloom) e neurofibromatose. Para os casos, foram consideradas como critérios de exclusão as amostras insuficientes ou com baixa qualidade de material genético e diagnóstico inconclusivo para LLA-B ou positivo para outro fenótipo. Foram excluídos 2 pacientes que tiveram diagnóstico para LMA e LLA-T. Um paciente foi transferido para outro estado, assim, somente seus dados e amostra coletados inicialmente foram considerados para as análises.

7.2.2.2 Dosagem de sENG

Para determinar os níveis circulantes de sENG, foram obtidas 26 alíquotas de plasma viáveis de amostras de sangue venoso que foram doadas pelos pacientes com LLA-B ao momento do diagnóstico e armazenadas a -20°C até o uso. Para os controles, foram utilizadas

amostras de plasmas congeladas a -30°C do projeto SCAALA. Posteriormente, a concentração de sENG foi mensurada através de ensaio utilizando o kit *MILLIPLEX*[®] (Merck, Darmstadt, Alemanha) e analito com esferas magnéticas para ENG (HAGP1MAG-12K-01, Merck), seguindo as instruções do fabricante. O ensaio foi realizado na plataforma *Luminex MAGPIX*[®] (Life Technology, Carlsbad, Califórnia, EUA) através do software de análise *xPONENT*[®] (v.4.2.1324.0, Luminex Corporation). Uma fórmula de regressão 5-PL foi utilizado para as concentrações das amostras a partir das curvas padrão. Os resultados foram expressos em pg/ml.

7.2.2.3 Extração de DNA e genotipagem

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de sangue coletadas em tubos com EDTA de MO e SP de acordo com o protocolo do kit *Pure Link Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen). Todas as amostras extraídas foram uniformizadas à concentração de 100 ng/ μL e armazenadas à -30°C . A genotipagem foi realizada em PCR de tempo real em no equipamento *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR* (Applied Biosystems) utilizando sondas comerciais *TaqMan* (Thermo Fisher Scientific) para as variantes genéticas rs11545664 (ID do ensaio: C_192035372_10), rs35400405 (ID do ensaio: C_25592395_10) e rs7865146 (ID do ensaio: C_3130534_30).

As variantes genéticas foram selecionadas de acordo com o MAF ($> 5\%$) para a população de Salvador descrito no projeto SCAALA (BARRETO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2011); pela posição de interesse; dados de anotação de potencial regulatório consultado através do banco de dados RegulomeDB (v2.2; dbSNP 153; www.regulomedb.org); e através de busca na literatura.

7.2.2.4 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos ao teste *Kolmogorov–Smirnov* para verificar a normalidade da distribuição das variáveis. As comparações entre grupos para variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste χ^2 e exato de *Fisher*. O teste *Mann Whitney* foi

utilizado para comparar dois grupos de variáveis quantitativas com distribuição não normal. Para variáveis quantitativas com mais de dois grupos e com distribuição não normal, foi utilizado o teste de *Kruskal Wallis* e, para distribuição normal foi utilizada a análise ANOVA. Os gráficos foram produzidos no software estatístico STATA 8.2 (StataCorp LP, College Station, TX, USA). Os valores de $P < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Foi utilizado o GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com para a geração dos gráficos.

7.2.3 Resultados

7.2.3.1 População do estudo

As características da população estudada estão sumarizadas na Tabela 1. O grupo controle apresenta proporção igual para sexo e mediana de idade de 7 anos e 2 meses, já o grupo caso tem 58% de meninos, mediana de idade de 4 anos e 2 meses e a maioria apresenta cor da pele reportada pelo responsável como parda (54%), enquanto que o grupo controle apresenta maioria de cor de pele preta (47%) e parda (47%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados sociodemográficos da população do estudo.

Variáveis/categorias	Controles (n = 39)	Casos (n = 26)	Valor de P
Sexo, n (%)			0,478*
Masculino	19 (49)	15 (58)	
Feminino	20 (51)	11 (42)	
Idade (anos), mediana (IIQ)	7,2 (5,9-8,4)	4,2 (2,5-6,5)	<0,001 ⁺
1-10 anos, n (%)	38 (97)	24 (92)	0,334*
>10 anos, n (%)	1 (3)	2 (8)	
Cor da pele, n (%)			0,039*
Preta	18 (47)	6 (23)	
Parda	18 (47)	14 (54)	
Branca	2 (5)	6 (23)	

*Teste Qui-quadrado de Pearson, ⁺ Teste Mann-Whitney.

7.2.3.2 Dosagem de sENG

A dosagem de sENG foi realizada para casos e controles. Os níveis séricos de sENG em pacientes pediátricos com LLA-B recém-diagnosticados foi maior comparado ao grupo

controle (Tabela 2; Figura 1). Os valores de mediana (IIQ) de sENG detectados em controles e casos foi de 434,6 (326,6-573,7) e 1789,0 (1383,0-2530,5) pg/ml, respectivamente (Tabela 2). Não houve diferenças significantes para os níveis de sENG para as comparações entre os genótipos para os casos (Figura 2).

Tabela 2 – Níveis de sENG (pg/ml) no plasma sanguíneo em controles e casos.

	n	Mediana*	(IIQ)*	Valor de P ⁺
Controles	39	434,6	(326,6-573,7)	<0,0001
Casos	26	1789,0	(1383,0-2530,5)	

* pg/ml. ⁺ Teste Mann-Whitney.

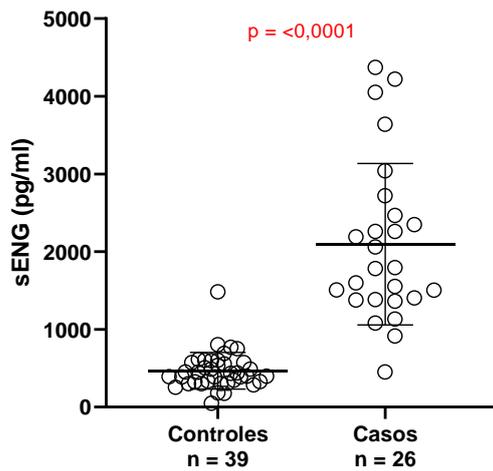


Figura 1 – Níveis de sENG no plasma sanguíneo em controles e casos. Em destaque na cor vermelha: Valor de $P < 0,05$.

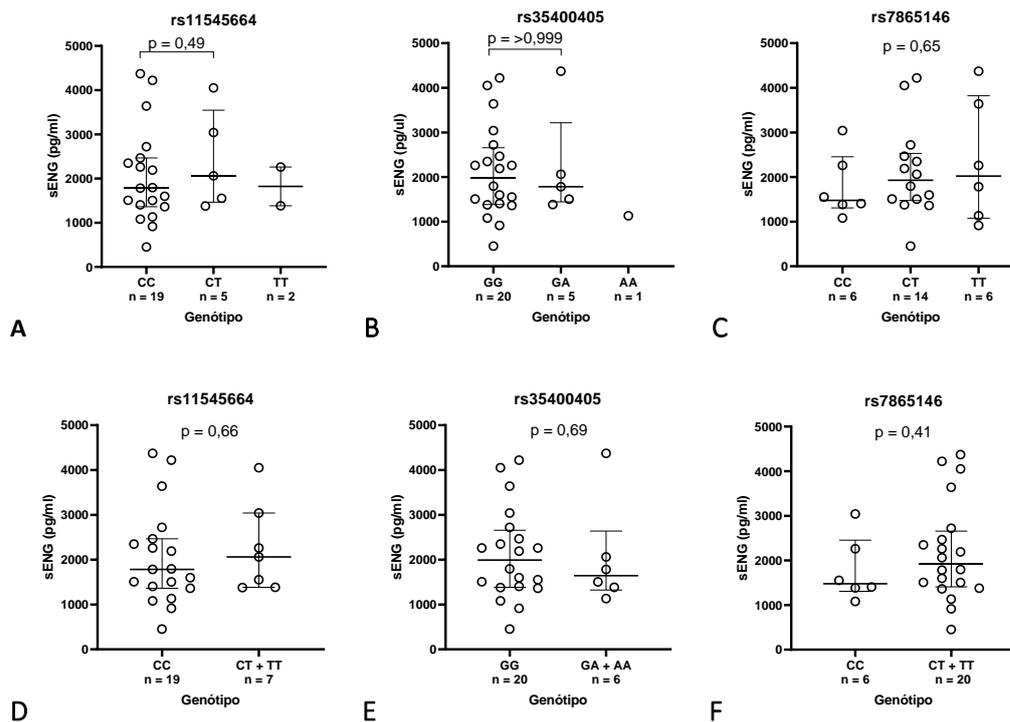


Figura 2 - Níveis de sENG no plasma sanguíneo de acordo com a distribuição genotípica das variantes genéticas do gene *ENG* em pacientes com LLA-B.

(A-C) Representação do número de indivíduos por genótipo. (D-F) Representação dos modelos de dominância dos alelos T, A, e T, respectivamente. Testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

7.2.4 Discussão

Diferentes tipos celulares com expressão de ENG no microambiente da MO podem contribuir para sustentar altos níveis de sENG, que são correlacionados à mal prognóstico em câncer (FONSATTI et al., 2001; HAWINKELS et al., 2010; LI et al., 2000). Foi relatada anteriormente um aumento significativo da vascularização da MO na LLA quando comparadas com biópsias de controles (PEREZ-ATAYDE et al., 1997; AGUAYO et al., 2000). Tendo em vista o relato de maior secreção de sENG no seguimento de experimento com LLA por Dourado et al. (2017), constatamos que ao momento do diagnóstico, pacientes com LLA-B possuem níveis de sENG superiores aos controles com diferença significativa entre os grupos ($P < 0,0001$). Os níveis plasmáticos de sENG elevados já foram constatados em gestantes com pré-eclâmpsia, indivíduos com osteoartrite e pacientes cardiovasculares, sendo também correlacionados com a progressão e a gravidade dessas condições (VENKATESHA et al., 2006; GREGORY et al., 2014; HONSAWEK; TANAVALEE; YUKTANANDANA, 2009; VAREJCKOVA et al., 2017; BLÁZQUEZ-MEDELA et al., 2010).

No presente estudo, ao analisar os níveis plasmáticos de sENG entre os genótipos das variantes genéticas rs11545664, rs35400405 e rs7865146, não foram observadas diferenças significantes entre os casos, o que pode ser devido ao pequeno número amostral.

Recentemente, têm aumentado o número de estudos voltados à investigação da angiogênese e moléculas relacionadas à angiogênese na leucemia, pois desempenham um papel significativo no curso dessas doenças tendo em vista que as células hematopoiéticas são sustentadas no leito vascular normal da MO (ABBOUD E LICHTMAN, 1995 apud AGUAYO et al, 2000). É factível afirmar que os fatores angiogênicos, como ENG, podem ter um efeito direto na vascularização da medula, bem como nas células hematopoiéticas e leucêmicas devido à sua atuação na hematopoiese (AGUAYO et al, 2000; BORGES et al., 2019; PERLINGEIRO, 2007).

As limitações deste estudo se referem à medição de sENG em grupo controle com período da coleta em momentos distintos dos casos, bem como ao tamanho amostral. Portanto, faz-se necessário que novos estudos possam se embasar nestes dados de sENG e possam replicá-los futuramente em um grupo de caso-controle maior e coletados em mesmo período.

7.2.5 Conclusão

Este estudo apresenta evidências de que os níveis de sENG circulante no momento do diagnóstico de pacientes pediátricos com LLA-B encontram-se elevados. Se faz necessário que novos estudos possam replicar esta análise em populações maiores, e com maior tempo de seguimento do estudo para melhor avaliar as consequências da doença no curso do tratamento dos pacientes em relação à presença da sENG.

8 DISCUSSÃO GERAL

A endoglina vem sendo um alvo de maior interesse no campo das neoplasias hematológicas, especialmente na investigação das leucemias agudas nos últimos anos (FONSATTI et al., 2001; CATCHPOOLE et al. 2007; DOURADO et al., 2017; COSIMATO et al., 2018, POREBA et al., 2006; ELKHOLY et al. 2021; KAUER et al. 2019; XU et al., 2017), devido à sua função na angiogênese, apresentando grande impacto nos tumores sólidos de diferentes sítios e, devido sua expressão em HSC-LT, podendo repercutir no comprometimento hematopoiético (BORGES et al., 2019; PERLINGEIRO, 2007). Neste trabalho analisamos a expressão gênica e o impacto funcional das variantes genéticas no gene *ENG*, bem como avaliamos o nível de s*ENG* em pacientes pediátricos com LLA-B.

Os resultados deste estudo estão consistentes com a média de idade da literatura (4,2 anos), mas a maioria dos pacientes apresentou cor da pele parda (55,6%) (Tabela 2), o que pode ser devido à alta miscigenação local.

Digno de nota, os achados indicam que as variantes genéticas analisadas neste estudo (rs11545664, rs35400405 e rs7865146) estão, muito provavelmente, relacionadas com importante atividade regulatória do gene em diversos tipos celulares, alterando motivos de DNA e a interação com diferentes TFs. O genótipo CT da variante rs11545664 apresenta maior expressão em sangue total de acordo com a base de dados de eQTL do Gtex, no entanto, essa diferença não foi observada na população estudada, provavelmente devido ao número amostral. Foi encontrada diferença significativa no aumento dos níveis de plaquetas para o genótipo TT do rs7865146, o que pode ser plausível devido o envolvimento de *ENG* na integridade endotelial. No entanto, não houve correlação entre as frequências genotípicas e alélicas e os diferentes grupos de genótipos, possivelmente devido ao número amostral.

Diferentes tipos celulares com expressão de *ENG* no microambiente da MO podem contribuir para sustentar os altos níveis de s*ENG* circulante, que são correlacionados à mal prognóstico em câncer (FONSATTI et al., 2001; HAWINKELS et al., 2010; LI et al., 2000). Foi relatada anteriormente um aumento da vascularização da MO significativa na LLA quando comparadas com biópsias de controles (PEREZ-ATAYDE et al., 1997; AGUAYO etl., 2000). Tendo em vista o relato de maior secreção de s*ENG* no seguimento da LLA por Dourado et al. (2017), constatamos que ao momento do diagnóstico, os níveis de s*ENG* em pacientes com LLA-B encontram-se elevados em relação a crianças controles, sem neoplasia ($P < 0,0001$).

As limitações do presente estudo se referem ao número pequeno de participantes, o que impossibilita que haja um efeito e poder estatístico robusto para observar os fenômenos mais adequadamente, bem como à medição de sENG em grupo controle transversal. Indica-se estender a duração do acompanhamento para avaliar a expressão de ENG na recidiva do tratamento a longo prazo, bem como a medição de sENG em pacientes com LLA-B no seguimento da doença para melhor avaliar as consequências no curso do tratamento dos pacientes.

9 CONCLUSÃO GERAL

A endoglinta é um potencial marcador prognóstico de pacientes pediátricos com LLA-B, como os estudos mais recentes vêm sugerindo. Foi encontrada diferença significativa no aumento dos níveis de plaquetas para o genótipo TT do rs7865146, o que pode ser plausível devido o envolvimento de ENG na integridade endotelial. Os dados *in silico* da plataforma Haploreg indicam que as variantes genéticas analisadas neste estudo estão, muito provavelmente, relacionadas com atividade regulatória do gene em diferentes tipos celulares.

Este estudo relata, ainda, evidências sobre os níveis aumentados de sENG circulante ao momento diagnóstico de pacientes pediátricos com LLA-B.

É necessária a condução de estudos adicionais para avançarmos na compreensão dos mecanismos exatos pelos quais ENG influencia as neoplasias hematológicas. Se faz necessário que novos estudos possam replicar esta análise em populações maiores e com maior tempo de seguimento do estudo para melhor avaliar a evolução da doença no curso do tratamento dos pacientes.

10 REFERÊNCIAS

ABDALLA SA. et al. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. **Journal of Medical Genetics**. n. 43, mai. 2005. p. 97-110.

Disponível em: <https://jmg.bmj.com/content/43/2/97>. Acesso em: 13 set. 2024.

ABDALLA SA, LETARTE M. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: Current views on genetics and mechanisms of disease. **J Med Genet**. 2006;43(2):97–110.

ABBOUD C., LICHTMAN M. Structure of the marrow.

E Beutler, MA Lichtman, BS Coller, TJ Kipps (Eds.), **Hematology** (5th ed.), McGraw Hill, New York (1995), p. 25 apud AGUAYO A, KANTARJIAN H, MANSHOURI T, GIDEL C, ESTEY E, THOMAS D, KOLLER C, ESTROV Z, O' BRIEN S, KEATING M, FREIREICH E, ALBITAR M. 2000. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96:2240–2245.

AGUAYO A, KANTARJIAN H, MANSHOURI T, et al. 2000. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. **Blood**. 96:2240–2245.

AHLUWALIA M. S. et al. Endoglin inhibitor TRC105 with or without bevacizumab for bevacizumab-refractory glioblastoma (ENDOT): a multicenter phase II trial.

Commun Med. Londres, v. 3, n. 120, set. 2023. 7 p. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/s43856-023-00347-0> . Acesso em: 13 set. 2024.

ALT A, MIGUEL-ROMERO L, DONDERIS J, et al. Structural and functional insights into endoglin ligand recognition and binding. **PLoS One**. 2012;7(2).

ANDERBEG, Charlotte. et al. Deficiency for endoglin in tumor vasculature weakens the endothelial barrier to metastatic dissemination. In: **Journal of Experimental Medicine**. vol. 210, n. 3. p. 563-579. Disponível em: <https://portal.research.lu.se/en/publications/deficiency-for-endoglin-in-tumor-vasculature-weakens-the-endothel>. Acesso em: 13 set. 2024.

ARBER DA Orazi. et al. The 2016 Revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. v. 127, n. 20, mai. 2016. p. 2391–2405.

Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/127/20/2391/35255/The-2016-revision-to-the-World-Health-Organizatio>. Acesso em: 13 set. 2024.

ARISTORENA M, GALLARDO-VARA E, VICEN M, et al. MMP-12, Secreted by Pro-Inflammatory Macrophages, Targets Endoglin in Human Macrophages and Endothelial Cells. **Int J Mol Sci**.2019;20(3107):1–19.

ARTHUR HM. et al. Endoglin, an ancillary TGF β receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. **Developmental Biology**. v. 217, n. 1, jan. 2000. p. 42-53. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160699995349>. Acesso em: 13 set. 2024.

BARBARA NP, WRANA JL, LETARTE M, BARBARA NP, WRANA JL, LETARTE M. Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex of

Multiple Members of the Transforming Growth Factor- β Endoglin Is an Accessory Protein That Interacts with the Signaling Receptor Complex. **J Biol Chem.** 1999;274(2):584–94.

BARNETT J.M., SUAREZ S., MCCOLLUM G.W., PENN J.S. Endoglin promotes angiogenesis in cell- and animal- based models of retinal neovascularization. **Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.** 2014;55:6490–6498. doi: 10.1167/iovs.14-14945.

BARRETO ML, CUNHA SS, ALCÂNTARA-NEVES N, CARVALHO LP, CRUZ ÁA, STEIN RT, et al. Risk factors and immunological pathways for asthma and other allergic diseases in children: background and methodology of a longitudinal study in a large urban center in Northeastern Brazil (Salvador-SCAALA study). **BMC Pulm Med.** 2006 Dec 23;6(1):15.

BELLÓN T, CORBI A, LASTRES P, CALÉS C, CEBRIÁN M, VERA S, et al. Identification and expression of two forms of the human transforming growth factor- β -binding protein endoglin with distinct cytoplasmic regions. **Eur J Immunol.** 1993;23(9):2340–5.

BELSON, M. et al. Risk factors for acute leukemia in children: a review. **Environ Health Perspect.** v.115, n. 1. jan. 2007. p. 138-45. Disponível em: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.9023>. Acesso em: 17 set. 2024.

BENNET J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukemias. **British Journal of Haematology.** v.8, n.8, aug.2017. p. 451- 458. Disponível: <https://www.researchgate.net/publication/15633644> Proposals for the immunological classification of acute leukemias European Group for the Immunological Characterization of Leukemias EGIL. Acesso em: 13 set. 2024.

BERNABEU C. et al. The emerging role of TGF- β superfamily coreceptors in cancer. **BBA.** v.1792, n. 10, out 2009. p. 954-973. Disponível em: Acesso em: 13 set. 2024.

BERNABEU C, Blanco. et al. Involvement of the TGF-beta superfamily signalling pathway in hereditary haemorrhagic telangiectasia. **J Appl Biomed.** v. 8 n. 3, abr. 2010. p. 169-17. Disponível em: <https://digital.csic.es/handle/10261/49489?locale=en>. Acesso: 13 set. 2024.

BERTOLINO P. et al. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. **Chest.** v. 93, n. 6, dez. 2005. p. 580-586. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0012369215310072> Acesso: 13 set. 2024.

BORGES L. et al. Serial transplantation reveals a critical role for endoglin in hematopoietic stem cell quiescence. **Blood.** v. 133, n. 7, fev. 2019. p. 688–696. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/133/7/688/260572/Serial-transplantation-reveals-a-critical-role-for?searchresult=1>. Acesso: 13 set. 2024.

BOURDEAU A, A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **J Clin Invest.** 1999;104(10):1343-1351.

BOURDEAU A, FAUGHNAN ME, MCDONALD ML, PATERSON AD, WANLESS IR, LETARTE M. Potential role of modifier genes influencing transforming growth factor-beta1

levels in the development of vascular defects in endoglin heterozygous mice with hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Am. J. Pathol.** 2001;158:2011–2020.

BOYLE AP, HONG EL, HARIHARAN M, et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research** 2012, 22(9):1790-1797. PMID: 22955989.

BRUM, S. T. et al. Endoglin is Highly Expressed in Human Mast Cells. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.** 2019.

BÜHRING HJ, MÜLLER CA, LETARTE M, et al. Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow. **Leukemia.** 1991;5(10):841.

CATCHPOOLE D., et al. Gene expression profiles that segregate patients with childhood acute lymphoblastic leukaemia: An independent validation study identifies that endoglin associates with patient outcome. **Leuk. Res.** 2007;31:1741–1747. doi: 10.1016/j.leukres.2007.04.021.

CASTONGUAY R et al. Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. **J Biol Chem.** 2011;286(34):30034–46.

CARVALHO PMAA, FROTA MA, MARANHÃO TA, PINTO NV. Um estudo da prevalência e da caracterização da mortalidade em crianças e adolescentes por leucemia no Nordeste do Brasil. **Arq. ciências saúde UNIPAR;** 27(3): 1437-1456, 2023. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1426471>. Acesso em 30 de maio de 2024.

CHAKHACHIRO Zaher I. et al. ENG (endoglin) is highly overexpressed in a subset of cases of acute myeloid leukemias. **Am J Clin Pathol.** v. 140, n. 3, set. 2013. p. 370–378. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article/140/3/370/1766906>. Acesso: 13 set. 2024.

CHEIFETZ S. et al. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. **The Journal of Biological Chemis.** v. 25, n. 267. Set.1992. p.19027-19030. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)41732-2/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)41732-2/pdf). Acesso em: 17 set. 2024.

CHEN C.Z. et al. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. **PNAS.** v. 99, n. 24, nov. 2002. p. 15468-15473. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/epdf/10.1073/pnas.202614899>. Acesso em: Acesso: 13 set. 2024.

COSIMATO V. et al. Surface endoglin (ENG) expression on acute leukemia blast cells: an extensive flow cytometry study of 1002 patients. **Leukemia & Lymphoma.** v. 59, n. 9, jan. 2018. p. 2242–2245. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10428194.2017.1416366> Acesso em: 13 set. 2024.

CHO S. K., BOURDEAU A., LETARTE M., ZUNIGA-PFLUCKER J. C. (2001). Expression and function of ENG during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. **Blood** 98, 3635-3642

DALLAS NA, et al. Endoglin (ENG): a marker of tumor vasculature and potential target for therapy. **Clinical Cancer Research**. 2008;14:1931–1937. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4478.

DAVIES Stella M. et al. Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility, and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia.

Blood. v. 100, n. 1, jul. 2002. p. 67–71. Disponível em:

<https://ashpublications.org/blood/article/100/1/67/133930/Glutathione-S-transferase-genotypes-genetic>. Acesso em: 13 set. 2024.

DELLA Porta M. et al. Flow cytometry evaluation of erythroid dysplasia in patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia**. v. 20, n. 4, fev, 2006. p.549–555. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/2404142> Acesso em: 13 set. 2024.

DELLA Starza I. et al. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: Technical and clinical advances. **Front. Oncol**. v. 9, n. 726. ago. 2019. P.17. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6692455/pdf/fonc-09-00726.pdf>. Acesso em: 13 set. 2024.

DESCHLER, B. et al. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**. v. 107, n. 9. nov. 2006. p. 2099- 2107. Disponível em:

<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22233>. Acesso em: 13 set. 2024.

DERYNCK R, MIYAZONO K. The TGF-b family. **Cold Spring Harb**. 2008;1114 p.

DIAS A, KENDERIAN SJ, WESTIN GF, LITZOW MR. Novel Therapeutic Strategies in Acute Lymphoblastic Leukemia. **Curr Hematol Malig Rep**. 2016;11(4):253-264.

DIGIUSEPPE, J. A., & WOOD, B. L. (2019). Applications of Flow Cytometric Immunophenotyping in the Diagnosis and Posttreatment Monitoring of B and T Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*, 96(4), 256–265. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21833>

DIOUF B. et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. **JAMA**. v. 313, n. 815, set. 2015. p. 815–823. Disponível em:

<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.22233>. Acesso em: 13 set. 2024.

DONG, M., BLOBE, G.C. Role of transforming growth factor- β in hematologic malignancies **Review In Translational Hematology**. (2006) 107 (12): 4589–4596. doi.org/10.1182/blood-2005-10-4169.

DONG, S., ZHAO, N., SPRAGINS, E., et al.. Annotating and prioritizing human non-coding variants with RegulomeDB. **In bioRxiv**. 2022

DOURADO KMC. et al. Endoglin: a novel target for therapeutic intervention in acute leukemias revealed in xenograft mouse models. **Blood**. v. 129, n. 18, mai. 2017. p. 2526-2536. Disponível em: <https://ashpublications.org/blood/article/129/18/2526/36271/Endoglin-a-novel-target-for-therapeutic>. Acesso em: 13 set. 2024.

EINSIEDEL HG, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: Results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin–Frankfurt–Munster Group 87. **J. Clin. Oncol.** 2005;23:7942–7950. doi: 10.1200/JCO.2005.01.1031

ELKHOLY R A. et al. Impact of ENG Flow-Cytometric Expression on Childhood B-Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Blood Medicine**. v. 12, mar. 2021. p. 147-156. Disponível em: <https://www.dovepress.com/article/download/63112>. Acesso em: 13 set. 2024.

FARHADFAR N, LITZOW MR. New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. **Leuk Res**. 2016;49:13-21.

FERNÁNDEZ-RUIZ E, ST-JACQUES S, BELLÓN T, LETARTE M, BEMABÉU C. Assignment of the human endoglin gene (End) to 9q34→qter. **Cytogenet Genome Res**.1993;64(3–4):204–7.

FIGUEIREDO CA, ALCANTARA-NEVES NM, AMORIM LD, SILVA NB, CARVALHO LCP DE, COOPER PJ, et al. Evidence for a modulatory effect of IL-10 on both Th1 and Th2 cytokine production: the role of the environment. **Clin Immunol**. 2011 Apr;139(1):57–64.

FONSATTI E, VECCHIO LD, ALTOMONTE M, et al. Endoglin: an accessory component of the TGF- β -binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. **J Cell Physiol**. v.188, n.1, jul. 2001. p. 1-7. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcp.1095>. Acesso em: 13 set. 2024.

FONSATTI E. et al. Emerging role of endoglin (ENG) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. **Curr Cancer Drug Targets**. v. 3, n. 6, jan. 2004. p. 427- 432. Disponível em: <https://www.eurekaselect.com/article/8058>. Acesso em: 13 set. 2024.

FONSATTI E., A. P. JEKUNEN, K. J. KAIREMO, S. et al. 'Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model', **Clin Cancer Res**, 2000, 6: 2037-43.

FONSATTI E, L SIGALOTTI, P ARSLAN, M ALTOMONTE, M MAIO. Emerging role of endoglin (ENG) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies. **Curr Cancer Drug Targets**. 2003; 3: 427-432

GALLARDO-VARA E, TUAL-CHALOT S, BOTELLA LM, ARTHUR HM, BERNABEU C. Soluble endoglin regulates expression of angiogenesis-related proteins and induction of arteriovenous malformations in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. **Dis Model Mech**. 2018;11(9):dmm034397.

GALLIONE CJ. et al. A combined syndrome of juvenile polyposis and hereditary haemorrhagic telangiectasia associated with mutations in MADH4 (SMAD4). **Lancet**. v.363, n. 941, mar. 2004. p. 852–859. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(04\)15732-2/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(04)15732-2/abstract). Acesso em: 13 set. 2024.

GORDON K.J. et al. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. **Biochim. Biophys. Acta**. v. 1782, n. 4, abr. 2008. p. 197–228. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092544390800029X?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2024.

GOUGOS, A. e LETARTE M. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. **J Immunol**. v. 141, n. 6, set. 1988. pp. 1925–1933. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/141/6/1925/21120/Identification-of-a-human-endothelial-cell-antigen>. Acesso em: 13 set. 2024.

GOUGOS A, LETARTE M. Primary Structure of Endoglin, an RGD-containing Glycoprotein of Human Endothelial Cells*. **J Biol Chem**. 1990;265(15):8361–4.

GOUGOS A., ST JACQUES S., GREAVES A., et al.. Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts. **Int. Immunol**. 1992;4:83–92. doi: 10.1093/intimm/4.1.83.

GORDON K.J., BLOBE G.C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. **Biochim. Biophys. Acta**. 2008;1782:197–228. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.01.006.

GREGORY AL, XU G, SOTOV V, LETARTE M. Review: The enigmatic role of endoglin in the placenta. **Placenta**. 2014;35(SUPPL):S93-99.

GUERRERO-ESTEO M, SÁNCHEZ-ELSNER T, LETAMENDIA A, BERNABÉ C. Extracellular and Cytoplasmic Domains of Endoglin Interact with the Transforming Growth Factor- β Receptors I and II*. **J Biol Chem**. 2002;277(9):29197–209.

HAFERLACH T. U. et al. Schnittger, and C. Haferlach. 2007. 'Diagnostic pathways in acute leukemias: a proposal for a multimodal approach'. **Ann Hematol**. v. 86, fev. 2007. p. 311-27. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-007-0253-2>. Acesso em: 13 set. 2024.

HAWINKELS LJAC, et al. Matrix metalloproteinase-14 (MT1-MMP)-mediated endoglin shedding inhibits tumor angiogenesis. **Cancer Res**. 2010;70(10):4141–50.

HELDIN CH, MOUSTAKAS A. Signaling receptors for TGF- β family members. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 2016;8(8):1–33.

HELDIN C.H., MOUSTAKAS A. Role of Smads in TGF β signaling. **Cell Tissue Res**. 2012;347:21–36. doi: 10.1007/s00441-011-1190-x.

HONSAWEK S, TANAVALLEE A, YUKTANANDANA P. Elevated Circulating and Synovial Fluid Endoglin Are Associated with Primary Knee Osteoarthritis Severity. **Arch59 Med Res.** 2009;40(7):590–4.

INABA H. et al. Acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet.** v. 381. Jun. 2013. p.1943–1955. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(12\)62187-4/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(12)62187-4/abstract). Acesso em: 17 set. 2024.

INABA H. et al. Advances in the Diagnosis and Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. **J Clin Med.** v. 10, n. 9, abr. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/9/1926>. Acesso em: 13 set. 2024.

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019, 120 p.

JABBOUR E. et al. New insights into the pathophysiology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. **Cancer.** v. 121, n. 15, ago. 2015. p. 2517–2528. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/toc/10970142/2015/121/15>. Acesso em: 13 set. 2024.

JABBOUR E. et al. Adult acute lymphoblastic leukemia. **Mayo Clinic Proceedings,** v. 80, n. 11, nov. 2005. p. 1517–1527. Disponível em: [https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196\(11\)61447-X/abstract](https://www.mayoclinicproceedings.org/article/S0025-6196(11)61447-X/abstract). Acesso em: 13 set. 2024.

JAIN RK; et al. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. **Annu Rev Biomed Eng.** v. 16, n. 321, jul. 2014. P. 321–346. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-bioeng-071813-105259>. Acesso em: 13 set. 2024.

JENG KS, SHEEN IS, LIN SS, LEU CM, CHANG CF. The role of endoglin in hepatocellular carcinoma. **Int. J. Mol. Sci.** 2021;22(6):3208. doi: 10.3390/ijms22063208.

JERKIC M., LETARTE M. Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. **FASEB J.** 2015;29:3678–3688. doi: 10.1096/fj.14-269258.

JERKIC M; et al. Reduced angiogenic responses in adult endoglin heterozygous mice. **Cardiovasc Res.** v. 69, n. 4, mar. 2006. pp. 845-854. Disponível em: <https://academic.oup.com/circres/article/69/4/845/345626?login=false>. Acesso em: 13 set. 2024.

JIN Y., MUHL L., BURMAKIN M., WANG Y., DUCHEZ A.C., BETSHOLTZ C., ARTHUR H.M., JAKOBSSON L. Endoglin prevents vascular malformation by regulating flow-induced cell migration and specification through VEGFR2 signalling. **Nat. Cell Biol.** 2017;19:639–652. doi: 10.1038/ncb3534.

JONES RL. et al. Efficacy and Safety of TRC105 Plus Pazopanib vs Pazopanib Alone for Treatment of Patients With Advanced Angiosarcoma: a Randomized Clinical Trial. **JAMA Oncol** v. 8, n. 5, mai. 2022. pp. 740-747. Disponível em:

<https://jamanetwork.com/journals/jamaoncology/fullarticle/2790727>. Acesso em: 13 set. 2024.

JOVINE L, DARIE CC, LITSCHER ES, WASSARMAN PM. Zona Pellucida Domain Proteins. **Annu Rev Biochem.** 2005;74(1):83–114.

KAHN JM. et al.: An investigation of toxicities and survival in Hispanic children and adolescents with ALL: Results from the Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocol 05-001. **Pediatr Blood Cancer.** v. 65, n. 3, mar. 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.26871>. Acesso em: 13 set. 2024.

KAUER J. et al. CDR 105 ENG (Endoglin) as negative prognostic factor in AML. **Sci Rep.** v. 9, n. 1, dez. 2019. P.11. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-54767-x>. Acesso em: 16 set. 2024.

KOLEVA RI, CONLEY BA, ROMERO D, et al. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor- β receptors. **J Biol Chem.** 2006;281(35):25110–23.

KRAJINOVIC M. et al. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leucemia. **The Lancet.** v. 359, n. 9311. p.1033-1034. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(02\)08065-0/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(02)08065-0/abstract). Acesso em: 16 set. 2024.

KOUMAKIS E., WIPFF J., DIEUDE P., et al. TGFbeta receptor gene variants in systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension: Results from a multicentre EUSTAR study of European Caucasian patients. **Ann. Rheum. Dis.** 2012;71:1900–1903. doi: 10.1136/annrheumdis-2012-201755.

KUMAR P, WANG JM, BERNABEU C. CD 105 and angiogenesis. **J Pathol.** 1996 Apr;178(4):363-6. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199604)178:4<3.0.CO;2-8

LASTRES P, MARTÍN-PEREZ J, LANGA C, BERNABÉU C. Phosphorylation of the human-transforming-growth-factor-beta-binding protein endoglin. **Biochem J.** 1994 Aug 1;301 (Pt 3)(Pt 3):765-8. doi: 10.1042/bj3010765.

LASTRES P, et al. Endoglin modulates cellular responses to TGF- β 1. **J Cell Biol.** 1996;133(5):1109–21.

LASTRES P, et al. Regulated expression on human macrophages of endoglin, an Arg-Gly-Asp-containing surface antigen. **European journal of immunology.** 1992;22:393–397. doi: 10.1002/eji.1830220216.

LEI B. et al. C59T mutation in exon 2 of monocytic leukemia-associated antigen-34 gene indicates a high risk of recurrence of acute myeloid leukemia. **Oncol Lett.** v. 14, n. 1 jul. 2017. p. 55-62. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6110>. Acesso em: 16 set. 2024.

- LEE NY, BLOBE GC. The interaction of endoglin with β -arrestin2 regulates transforming growth factor- β -mediated ERK activation and migration in endothelial cells. **J Biol Chem**. 2007;282(29):21507–17.
- LEBRIN F. et al. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF- β /ALK1 signal transduction. **EMBO J**. v. 23, n. 20, out. 2004. p. 4018–4028. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC524335/>. Acesso em: 16 set. 2024.
- LETAMENDIA A. et al. Role of endoglin in cellular responses to transforming growth factor- β . A comparative study with betaglycan. **The Journal Of Biological Chemistry**. v. 273, n. 9. dez. 1998. p. 33011-33019. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)58977-3/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)58977-3/fulltext). Acesso em: 16 set. 2024.
- LI C., HAMPSON I.N., HAMPSON L., et al. ENG antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor β 1 on human vascular endothelial cells. **FASEB J**. 2000; 14: 55-64
- LI DY, SORENSEN LK, BROOKE BS, URNESS LD, DAVIS EC, TAYLOR DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. **Science**. 1999;284(5419):1534–7.
- LI C, GUO B, BERNABEU C, KUMAR S. Plasma levels of soluble ENG correlate with metastasis in patients with breast cancer. **Int J cancer**. 2000 Mar 20;89(2):122–6.
- LI C, GUO B, BERNABEU C, KUMAR S. No Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor beta and ENG. **Microsc Res Tech**. 2001;52:437–49.
- LIU Y, et al. Endoglin Targeting: Lessons Learned and Questions That Remain. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 25, n. 1. dez. 2020. p. 147. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/1/147>. Acesso em: 17 set. 2024.
- LLORCA O, TRUJILLO A, BLANCO FJ, BERNABEU C. Structural Model of Human Endoglin, a Transmembrane Receptor Responsible for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. **J Mol Biol**. 2007;365(3):694–705.
- LOGES S, HEIL G, BRUWELEIT M, et al. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. **J Clin Oncol**. 2005, 23: 1109-1117. 10.1200/JCO.2005.05.058.
- LÓPEZ-CASILLAS F. et al. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- β receptor system. **Cell**. v. 67, n. 4, nov. 1991. pp. 785–795. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674\(91\)90073-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867491900738%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(91)90073-8?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F0092867491900738%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 16 set. 2024.
- LÓPEZ - NOVOA. et al. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. **Am J Physiol Circ Physiol**. v. 299, n. 4, out. 2010. p. 959–974. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpheart.01251.2009>. Acesso em: 16 set. 2024.

MALLET C, LAMRIBET K, GIRAUD S, et al. Functional analysis of endoglin mutations from hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1 patients reveals different mechanisms for endoglin loss of function. **Hum Mol Genet.** 2015;24(4):1142–54.

MASSAGUÉ J. TGF β signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2012 Oct;13(10):616–30. doi: 10.1038/nrm3434.

MCALLISTER K A, GROGG KM, JOHNSON DW, et al. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. **Nat Genet.** 1994;8(4):345–51.

MEDINGER M, SKODA R, GRATWOHL A, et al. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor-/receptor expression in myeloproliferative neoplasms: correlation with clinical parameters and JAK2-V617F mutational status. **Br J Haematol.** 2009, 146: 150-157. 10.1111/j.1365-2141.2009.07726.x.

MELO, M. **Leucemias & Linfomas: Atlas do Sangue Periférico.** 1 ed. São Paulo: LMP Editora, 2008, 168 p.

Meng QJ, Lux A, Holloschi A, Li J, Hughes JMX, Foerg T, et al. Identification of Tctex2 β , a novel dynein light chain family member that interacts with different transforming growth factor- β receptors. *J Biol Chem.* 2006;281(48):37069–80.

MOUSTAKAS A, HELDIN CH. Non-Smad TGF-beta signals. **J Cell Sci.** 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84. doi: 10.1242/jcs.02554.

MU Y., GUDEY S.K., LANDSTROM M. Non-Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res.** 2012;347:11–20. doi: 10.1007/s00441-011-1201-y.

NIH, National Library of Medicine - **Medline Plus.** What are single nucleotide polymorphisms (SNPs). Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/genomicresearch/snp>>. Acesso em 20 de mar. 2024.

NCI, National Cancer Institute. Age-Adjusted and Age-Specific SEER Cancer Incidence Rates, 2014–2018. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/results_merged/sect_02_childhood_cancer_iccc.pdf>. Acesso em 21 de Julho de 2021.

NOH J-Y. et al. Immunotherapy in Hematologic Malignancies: Emerging Therapies and Novel Approaches. **Int. Journal of Molecular Sciences.** v. 21, n. 21. out. 2020. p. 23. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/21/8000>. Acesso em: 17 set. 2024.

PECE Bárbara. et al. Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.** USA, v. 274, n. 274, jan. 1999. p. 584–594. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819883163>. Acesso em: 13 set. 2024.

O'CONNELL P.J., MCKENZIE A., FISICARO N., et al. Endoglin: A 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. **Clin. Exp. Immunol.** 1992;90:154–159. doi: 10.1111/j.1365-2249.1992.tb05848.x.

OLLAURI-IBÁÑEZ C, AYUSO-ÍÑIGO B, PERICACHO M. Hot and Cold Tumors: Is Endoglin (ENG) a Potential Target for Vessel Normalization? **Cancers (Basel)**. 2021 Mar 28;13(7):1552. doi: 10.3390/cancers13071552.

OLLAURI-IBÁÑEZ C, NÚÑEZ-GÓMEZ E, EGIDO-TURRIÓN C, et al. Continuous endoglin (ENG) overexpression disrupts angiogenesis and facilitates tumor cell metastasis. **Angiogenesis**. 2020 May;23(2):231-247. doi: 10.1007/s10456-019-09703-y.

PAAUWE M., TEN DIJKE P., HAWINKELS L.J. Endoglin for tumor imaging and targeted cancer therapy. **Expert. Opin. Ther. Targets**. 2013;17:421–435. doi: 10.1517/14728222.2013.758716.

PAPAEMMANUIL E, HOSKING FJ, VIJAYAKRISHNAN J, et al. Loci on 7p12.2, 10q21.2 and 14q11.2 are associated with risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. **Nat Genet**. 2009, 41(9):1006-10.

PEREZ-ATAYDE AR, SALLAN SE, TEDROW U, et al. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. **Am J Pathol.**, 150 (1997), p. 815

PERLINGEIRO RC. Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. **Development**. 2007;134(16):3041-3048.

PICHUANES S, VERA S, BOURDEAU A, et al. Mapping epitopes to distinct regions of the extracellular domain of endoglin using bacterially expressed recombinant fragments. **Tissue Antigens**. 1997;50(3):265–76.

PIRELLI L, et al. CD34+/ENG+ cells are enriched in primitive circulating progenitors residing in the G0 phase of the cell cycle and contain all bone marrow and cord blood CD34+/CD38low/- precursors. **Br J Haematol**. 2000;108(3):610–620. doi: 10.1046/j.1365-2141.2000.01869.x.

PÉREZ-GÓMEZ E, DEL CASTILLO G, SANTIBÁÑEZ JF, et al. The Role of the TGF- β Coreceptor Endoglin in Cancer. **Sci World J**. 2010 Dec 14;10:2367–84.

POREBA M. et al. Expression of ENG antigen in patients with acute leukemia, malignant lymphoma, and multiple myeloma in active phase of the disease. **Adv Clin Exp Med**. v. 15, n. 6. nov. 2006. p. 1023–1028. Disponível em: <https://advances.umw.edu.pl/en/article/2006/15/6/1023/>. Acesso em: 17 set. 2024.

PUI CH, et al. Acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet**. v. 22, n. 371. Mar. 2008. 1030-1043. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(08\)60457-2/abstract](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(08)60457-2/abstract). Acesso em: 17 set. 2024.

PUI CH, et al. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Clinical Oncology*. v. 227, n. 4. abr. 2019. p. 227-240. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41571-018-0136-6>Acesso em: 17 set. 2024.

PUI CH, PEI D, SANDLUND JT, et al.: Long-term results of St Jude Total Therapy Studies 11, 12, 13A, 13B, and 14 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2010 Feb;24(2):371-82. doi: 10.1038/leu.2009.252.

QUACKENBUSH E J; LETARTE M. Identification of several cell surface proteins of non-T, non-B acute lymphoblastic leukemia by using monoclonal antibodies. *J Immunol*. v. 134, n. 2, fev.1985. p. 1276 –1285. Disponível em: <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/134/2/1276/18411/Identification-of-several-cell-surface-proteins-of?redirectedFrom=PDF>. Acesso em: 17 set. 2024.

QUINTANILHA M. et al. Expression of the TGF-beta coreceptor endoglin in epidermal keratinocytes and its dual role in multistage mouse skin carcinogenesis. *Oncogene*. v. 4, n. 22. set. 2003. p. 5676–5685. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/1206841>. Acesso em: 17 set. 2024.

RASHED, WAFAA M.; HAMZA, et al. MicroRNA as a prognostic biomarker for survival in childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review. *Cancer And Metastasis Reviews*, [S.L.], v. 38, n. 4, p. 771-782, dez. 2019. **Springer Science and Business Media LLC**.

RAUSCHER R, IGNATOVA Z. Timing during translation matters: Synonymous mutations in human pathologies influence protein folding and function. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(4):937–44.

REYMOND N, D'ÁGUA BB, RIDLEY AJ. Crossing the endothelial barrier during metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2013;13:858–870. doi: 10.1038/nrc3628.

Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014;16:321–346. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071813-105259.

RÍUS C, SMITH JD, ALMENDRO N, et al. Cloning of the Promoter Region of Human Endoglin, the Target Gene for Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia Type 1. *Blood*. 1998;92(12):4677–90. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/92/12/4677.full.pdf>

ROKHLIN OW, COHEN MB, KUBAGAWA H, et al. Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol*. 1995;154(9):4456–4465.

ROMERO D., O'NEILL C., TERZIC A., et al. Endoglin regulates cancer-stromal cell interactions in prostate tumors. *Cancer Res*. 2011;71:3482–3493. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2665.

ROSEN L.S., GORDON M.S., ROBERT F., MATEI D.E. Endoglin for targeted cancer treatment. *Curr. Oncol. Rep*. 2014;16:365. doi: 10.1007/s11912-013-0365-x.

ROSSI E, PERICACHO M, BACHELOT-LOZA C, et al. Human endoglin as a potential new partner involved in platelet-endothelium interactions. **Cell Mol Life Sci.** 2018 Apr;75(7):1269-1284. doi: 10.1007/s00018-017-2694-7. Epub 2017 Oct 28.

SAMPAIO GP. **Análise da expressão de cd105 (endoglina) em precursores linfoides normais e em blastos neoplásicos de pacientes pediátricos com Leucemia Linfoblástica Aguda de células precursoras B no Estado da Bahia.** 2013. 85p. Tese (Doutorado em Imunologia) - Programa de Pós-Graduação de Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2023. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/handle/ri/37643>. Acesso em: 17 set. 2024.

SAITO T, BOKHOVE M, CROCI R, et al. Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction: Insights into BMP Signaling and HHT1. **Cell Rep.** 2017;19(9):1917–28.

SEON BK, HABA A, MATSUNO F, et al. Endoglin-targeted cancer therapy. **Curr Drug Deliv.** 2011 Jan;8(1):135-43. doi: 10.2174/156720111793663570.

SEIF, A. E. Pediatric leukemia predisposition syndromes: clues to understanding Leukemogenesis. **Cancer Genet.** v. 204, n. 5. mai 2011. p. 227-44. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210776211001141?via%3Dihub>. Acesso em: 17 set. 2024.

SCHMIEGELOW K. et al. Thiopurine methyltransferase activity is related to the risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia: results from the NOPHO ALL-92 study. **Leukemia.** v. 23, n.3. mar. 2009. p. 557–564. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/leu2008316>. Acesso em: 17 set. 2024.

SCHMITTGEN TD, LIVAK KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. **Nat Protoc** 3(6):1101–1108

SCHOONDERWOERD M.J.A., GOUMANS M.T.H., HAWINKELS L. Endoglin: Beyond the Endothelium. **Biomolecules.** 2020;10:289. doi: 10.3390/biom10020289.

SMITH M, ARTHUR D, CAMITTA B, et al.: Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. **J Clin Oncol** 14 (1): 18-24, 1996.

ST-JACQUES S., CYMERMAN U., PECE N., LETARTE M. Molecular characterization and in situ localization of murine endoglin reveal that it is a transforming growth factor-beta binding protein of endothelial and stromal cells. **Endocrinology.** 1994;134:2645–2657. doi: 10.1210/endo.134.6.8194490.

STEVEN HS et al. WHO: classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edição. **Lyon: WHO, 2017.**

TAYLOR, G. M.; BIRCH, J. M. The hereditary basis of human leukemia. **Leukemia,** v. 6, p. 210-245, 1996.

TEACHEY DT, PUI CH. Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Lancet Oncol.** 2019 Mar;20(3):e142-e154. doi: 10.1016/S1470-2045(19)30031-2.

TEN DIJKE P, GOUMANS MJ, PARDALI E. Endoglin in angiogenesis and vascular diseases. **Angiogenesis.** 2008;11(1):79-89. doi: 10.1007/s10456-008-9101-9. Epub 2008 Feb 19.

TZANKOV A, HEISS S, EBNER S, et al. Angiogenesis in nodal B cell lymphomas: a high throughput study. **J Clin Pathol.** 2007, 60: 476-482. 10.1136/jcp.2006.038661.

VACCA A, RIBATTI D, PRESTA M, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. **Blood.** 1999, 93: 30643073-

VANDER ARK A., CAO J., LI X. TGF-beta receptors: In and beyond TGF-beta signaling. **Cell. Signal.** 2018;52:112–120. doi: 10.1016/j.cellsig.2018.09.002.

VAREJCKOVA M, GALLARDO-VARA E, VICEN M, et al. Soluble endoglin modulates the pro-inflammatory mediators NF- κ B and IL-6 in cultured human endothelial cells. Vol. 175, **Life Sciences.** Elsevier Inc;2017. 52–60 p.

VENKATESHA S, TOPORSIAN M, LAM C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. **Nat Med.** 2006 Jun 4;12(6):642–9.

WAKEFIELD L, HILL C. Beyond TGF β : Roles of other TGF β superfamily members in cancer. **Nat Rev Cancer.** 2013;13:328–341.

WANG JM, KUMAR S, PYE D, VAN AGTHOVEN AJ, KRUPINSKI J, Hunter RD. 1993. A monoclonal antibody detects heterogeneity in vascular endothelium of tumours and normal tissues. **Int J Cancer** 54: 363–370.

WARD E. et al. A. Childhood and adolescent cancer statistics. **CA Cancer J Clin.** v. 64, n. 2. mar. 2014. p. 83–103. Disponível em: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21219> Acesso em: 17 set. 2024.

WIEMELS J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. **Chem Biol Interact.** v. 196, n. 3. abr. 2012. p. 59-67. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009279712000178?via%3Dihub>. Acesso em: 17 set. 2024.

WRANA J. et al. TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. **Cell.** v. 71, n. 6. dez.1992. pp. 1003–1014. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674\(92\)90395-S?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749290395S%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/abstract/0092-8674(92)90395-S?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749290395S%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 17 set. 2024.

WRANA J. et al. Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. **Nature.** v. 4, n. 370. ago. 1994. pp. 341–347. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/370341a0>. Acesso em: 17 set. 2024.

WU J. et al. Study on the association of the polymorphism of HLA-II gene with leukemia. **Oncol Lett.** v. 14, n.1. jul. 2017. pp. 224-228. Disponível em: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.6136>. Acesso em: 17 set. 2024.

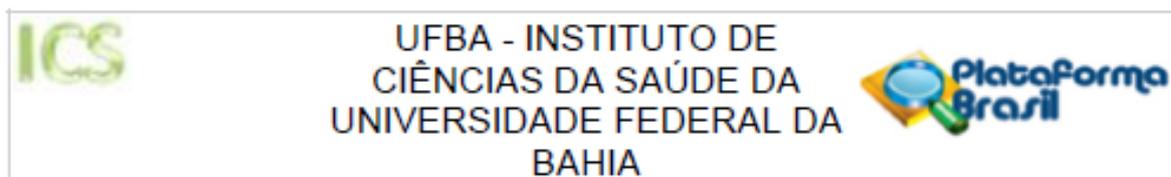
YANG JJ. et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. **Journal of Clinical Oncology.** v.33, n.11. abr. 2015. pp. 1235–1242. Disponível em: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.59.46716>. Acesso em: 17 set. 2024.

XU P. et al. The association between hypoxia inducible factor 1 α and multidrug resistance of acute myeloid leukemia. **Transl Cancer Res.** V. 6, n.1. fev. 2017. p. 198–205. Disponível em: <https://tcr.amegroups.org/article/view/11945/pdf>. Acesso em: 17 set. 2024.

ZABANEH D, BALDING DJ. A genome-wide association study of the metabolic syndrome in Indian Asian men. **PLoS One.** 2010 Aug 4;5(8):e11961. doi: 10.1371/journal.pone.0011961.

ZEMPLIN, M. et al. Regulation and chance in the ontogeny of B and T cell antigen receptor repertoires. **Immunol Res**, v. 26, p. 265-278, 2002

ANEXOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Análise da frequência de variantes genéticas no gene da endoglina e expressão do CD105 em pacientes com leucemia linfóide aguda B infantil

Pesquisador: CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FONTANA

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 8

CAAE: 03826318.2.0000.5662

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.684.349

Apresentação do Projeto:

A emenda enviada tem como objetivo incluir novos membros na pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto estudará em pacientes com Leucemia linfóide aguda, a frequência de variantes genéticas no gene da endoglina, uma glicoproteína associada ao receptor do TGF-beta. Atualmente, a análise do cariótipo dos blastos leucêmicos é um dos fatores prognósticos mais importantes no acompanhamento das leucemias e na resistência ao tratamento.

Para a expressão imunofenotípica do CD 105 (endoglina) em crianças portadoras Leucemia Linfóide Aguda de células B, serão utilizadas 44 amostras de crianças (0 a 10 anos), sendo 22 com suspeita clínica leucemia linfóide aguda B e 22 amostras de crianças sem LLA, excluindo-se as causas secundárias (HIV1-2, Lupus Eritematoso Sistêmico, etc). As amostras advêm de pacientes do Hospital Martagão Gesteira, Aristides Maltez e INCA e foi calculada para um nível de confiança de 95% e poder de 80%, baseada em estudo anterior. Os métodos analíticos incluem a citometria de fluxo para dosagens das citocinas por CBA (cytometry bead array), perfil e caracterização imunofenotípica dos linfócitos totais (B, T, NK e NKT) e o perfil de expressão de CD105 nas células B neoplásicas e em maturação, seguindo padronização do Laboratório de Imunobio do ICS-UFBA. A análise citogenética dos pacientes com LLA será realizada no laboratório de Citogenética do INCA

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br



UFBA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 5.684.349

(Instituto Nacional do Câncer). O estudo contará com a utilização de banco de dados individuais online e públicos e serão feitas análises in silico a partir de plataformas online. Será realizado um estudo de caso-controle, em que o grupo de estudo consistirá em 276 pacientes (0 a 10 anos), sendo 65 pacientes com LLA (casos) e 65 pacientes sem leucemia (controles) para um nível de confiança de 99,99% e poder de 90%. Como não existem dados da frequência do polimorfismo em ENG nos indivíduos com LLA, empregouse para o cálculo do tamanho da amostra os dados referentes à frequência da molécula avaliada por citometria de fluxo (81,9%) em indivíduos diagnosticados com LLA-B que serão posteriormente genotipados e sequenciados para identificação e análise das variantes genéticas. A seguir, será avaliada a expressão da endoglina por citometria de fluxo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos relacionados a este estudo se devem à eventual identificação do registro do participante. A equipe proponente prevê a confecção de um banco de dados que identificará as amostras com números e o cadastro desses números só será acessado pelo grupo de pesquisa, garantindo, desta forma, o anonimato do participante.

Benefícios:

Podem não ocorrer benefícios clínicos diretos para o(a) paciente, mas sua participação poderá colaborar para a comunidade médica e científica na melhor compreensão da leucemia linfóide aguda B e seus tratamentos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Documentos e modificações corretos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Sim. Documento de equipe detalhada com os novos membros e inclusão dos mesmos na plataforma estão em conformidade.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br



**UFBA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA**



Continuação do Parecer: 5.684.349

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2006436_E6.pdf	25/09/2022 20:35:04		Aceito
Outros	Carta_de_emenda_1_2022.pdf	25/09/2022 20:32:43	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Equipe_detalhada_emenda1_2022.pdf	25/09/2022 20:30:52	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_Hospital_Manoel_Novaes.pdf	17/11/2021 15:35:09	CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FONTANA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_ENG_emenda1_2021.pdf	17/11/2021 15:24:18	CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FONTANA	Aceito
Cronograma	12_Cronograma_de_execucao_modificado.pdf	09/09/2020 13:58:28	CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FONTANA	Aceito
Outros	8_Termo_de_assentimento_modificado.pdf	19/04/2020 21:45:58	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maioresde18anos_emenda.pdf	19/04/2020 21:40:00	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	7_TCLE_Responsavel_legal_modificado.pdf	19/04/2020 21:39:52	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	Atestadocoraute declarada.pdf	25/06/2019 15:21:34	CAMILA ALEXANDRINA VIANA DE FIGUEIREDO FONTANA	Aceito
Orçamento	13_Orçamento.pdf	30/11/2018 13:17:35	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	11_Carta_de_Anuencia_INCA.pdf	30/11/2018 13:17:13	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE	Aceito

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3263-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br



UFBA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA
BAHIA



Continuação do Parecer: 5.684.349

Outros	11_Carta_de_Anuencia_INCA.pdf	30/11/2018 13:17:13	ALMEIDA	Aceito
Outros	10_Carta_Anuencia_Laboratorio.pdf	30/11/2018 13:16:00	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	9_Termo_de_Compromisso_Dados_Pro ntuario.pdf	30/11/2018 13:15:30	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	6_Termo_de_Compromisso_do_investig ador.pdf	30/11/2018 13:14:50	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	5_Declaracao_de_Confidencialidade_do _sujeito.pdf	30/11/2018 13:14:27	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Outros	1_Carta_de_Encaminhamento.pdf	30/11/2018 13:13:28	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito
Folha de Rosto	2_Folha_de_rosto.pdf	30/11/2018 13:11:26	YASMIM CRISTINA FERREIRA DE ALMEIDA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SALVADOR, 05 de Outubro de 2022

Assinado por:
Roberto Paulo Correia de Araújo
(Coordenador(a))

Endereço: Miguel Calmon

Bairro: Vale do Canela

UF: BA

Telefone: (71)3283-8951

Município: SALVADOR

CEP: 40.110-902

E-mail: cepics@ufba.br